



УДК 577.113.(4+7)

# СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ 2',4'-ЗАМКНУТЫЕ НУКЛЕОТИДНЫЕ ЗВЕНЬЯ

© 2025 г. Е. С. Дюдеева\*, #, П. К. Ляпин\*, \*\*, Е. В. Дмитриенко\*, \*\*

\* ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН,  
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

\*\* Новосибирский научно-исследовательский государственный университет,  
Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 30.10.2024 г.

После доработки 14.11.2024 г.

Принята к публикации 15.11.2024 г.

Представлен новый вариант синтетических аналогов олигонуклеотидов, содержащих одновременно два типа модификаций – фосфорилгуанидиновую (PG) межнуклеотидную группу и 2',4'-замкнутые фрагменты рибозы (LNA) – в составе одного нуклеотидного звена. Показано, что при наличии PG-LNA-звеньев снижается электрофоретическая подвижность олигонуклеотидов, что прежде всего связано с электронейтральностью PG-группы. Также PG-LNA-модификации увеличивают гидрофобность олигонуклеотидов, вследствие чего они характеризуются большим временем удерживания при обращенно-фазовой хроматографии. Исследована термическая стабильность комплементарных дуплексов, содержащих PG-LNA-олигонуклеотиды. Показано, что температура плавления возрастает на 1.5–4.0°C на модификацию в зависимости от расположения модифицированного звена и ионной силы раствора. При этом методом спектрополяриметрии кругового дихроизма установлено, что пространственная структура комплексов, образованных PG-LNA, отличается от B-формы, что может быть обусловлено наличием LNA-фрагментов, имеющих 3'-эндо-конформацию рибозного кольца. Таким образом, PG-LNA-олигонуклеотиды можно рассматривать как новый частично незаряженный структурный аналог РНК. Основываясь на полученных данных, можно заключить, что PG-LNA-олигонуклеотиды могут быть перспективным инструментом для различных методов выделения и анализа нуклеиновых кислот.

**Ключевые слова:** модифицированные олигонуклеотиды, замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA), фосфорилгуанидиновые (PG) олигонуклеотиды, температура плавления модифицированных дуплексов

**DOI:** 10.31857/S0132342325020101, **EDN:** LBSOGZ

## ВВЕДЕНИЕ

Подходы к синтезу и химической модификации олигонуклеотидов активно развивались в течение второй половины XX века, и на сегодняшний день, на первый взгляд, доступно множество вариантов модифицированных ДНК и РНК, использующихся в научных исследованиях. В зависимости от решаемой задачи к олигонуклео-

тическому инструментарию может предъявляться ряд различных требований – например, повышенная гибридизационная способность, возможность преодолевать клеточные барьеры для доставки олигонуклеотидов к мишениям, устойчивость к действию нуклеаз, но в то же время способность взаимодействовать с другими ферментами, процессирующими нуклеиновые кислоты (полимеразами, лигазами и др.). Наиболее

Сокращения: ESI MS – масс-спектрометрия с электrosпрай-ионизацией; LNA – замкнутые нуклеиновые кислоты (locked nucleic acids); PG – фосфорилгуанидиновая группа; КД – круговой дихроизм; ОФХ – обращенно-фазовая хроматография. При написании последовательностей олигодезоксирибонуклеотидов префикс “d” (дезокси) опущен для краткости.

# Автор для связи: (эл. почта: jenyadudeeva@gmail.com).

распространенные в современных исследовательских работах варианты модифицированных олигонуклеотидов (тиофосфатные олигонуклеотиды, олигонуклеотиды с 2',4'-замкнутым рибозным оством, 2'-*O*-алкилированные олигорибонуклеотиды и др.), как правило, обладают лишь некоторыми из этих качеств: так, например, тиофосфатные олигонуклеотиды, использующиеся на сегодняшний день для терапии некоторых генетических заболеваний [1], устойчивы к действию нуклеаз [2], однако обладают пониженной гибридизационной способностью [3] и цитотоксичны, вероятно, вследствие неспецифических взаимодействий с белками [4].

Возможный путь к усовершенствованию олигонуклеотидного инструментария и, соответственно, к повышению эффективности методик, в которых они задействованы, – это создание так называемых “химерных” олигонуклеотидов, содержащих одновременно несколько типов модификаций, выполняющих разные функции. Примером одобренного в клинике олигонуклеотидного препарата, сочетающего два типа модификаций – по рибозному фрагменту и межнуклеотидной фосфодиэфирной связи, – выступает спинраза (Нусинерсен), лекарство против

спинальной мышечной атрофии. Действующее вещество – олигонуклеотид, содержащий 2'-*O*-2-метоксиэтилированные остатки рибозы и тиофосфатные межнуклеотидные связи [5]. Примером препарата, находящегося на стадии клинических испытаний, служит Miravirsen, потенциальное лекарство против вируса гепатита С (antiMIR-122) [6, 7]. Действующее вещество представляет собой 15-звенный олигонуклеотид, в составе которого присутствуют модификации рибозы: 2'-*O*-метилированные и 2',4'-замкнутые звенья, способствующие повышению гибридизационной способности [8]. Все фосфодиэфирные фрагменты при этом также заменены на тиофосфатные.

Целью данной работы был синтез нового типа химерных олигонуклеотидов, содержащих одновременно 2',4'-замкнутые рибозные фрагменты (LNA) и незаряженные фосфорилгуанидиновые группы (PG), в том числе в составе одного нуклеотидного звена (рис. 1), изучение основных физико-химических свойств полученных олигонуклеотидов и оценка перспективности их использования в качестве инструмента для молекулярной диагностики.

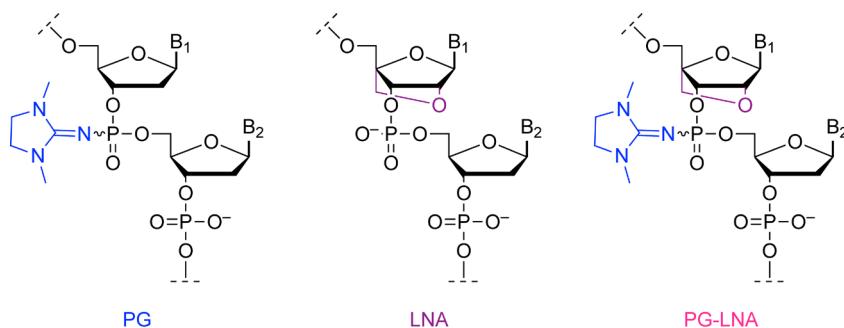


Рис. 1. Структурные формулы фрагментов PG- и/или LNA-модифицированных олигонуклеотидов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Синтез модельных модифицированных декануклеотидов.** В качестве модельной системы были синтезированы пять 10-звенных олигонуклеотидов, отличающиеся типом и расположением модификаций, а также их нативный аналог (табл. 1). Олигонуклеотиды 1Р и 1L содержат одну PG- или LNA-модификацию соответственно, олигонуклеотиды 1PL и 1P1L – обе рассматриваемые модификации, однако в случае

1PL они входят в состав одного нуклеотидного звена, в то время как в 1P1L они отделены друг от друга. Олигонуклеотид 3PL содержит три PG-LNA-модификации подряд.

Все олигонуклеотиды были синтезированы в рамках стандартного фосфитамида под подхода на автоматическом ДНК-синтезаторе с использованием коммерчески доступных мономеров и полимерных носителей. В случае LNA-фосфорамидитов на этапе автоматического синтеза

**Таблица 1.** Нативный и модифицированные декануклеотиды

Название	Последовательность (5'-3')
N	TGTTTGGCGC
1P	TGTTT*GGCGC
1L	TGTT <u>T</u> GGCGC
1PL	TGTT <u>T</u> *GGCGC
1P1L	TGT* <u>T</u> GGCGC
3PL	TGT* <u>T</u> * <u>T</u> *GGCGC

Примечание: N – нативный нуклеотид; N – LNA-нуклеотид; N\* – PG-модифицированный нуклеотид; N\* – PG-LNA-модифицированный нуклеотид. При написании последовательностей олигодезоксирибонуклеотидов префикс “d” (дезокси) опущен для краткости.

были пролонгированы стадии конденсации мономера и окисления фосфиттриэфира. Введение PG-группы осуществляли согласно протоколам, описанным ранее [9]. Выделение олигонуклеотидов из реакционной смеси проводили методом оФВЭЖХ (данные не приведены). Очищенные олигонуклеотиды анализировали методами гель-электрофореза в денатурирующем ПААГ, аналитической ОФХ, масс-спектрометрии с электrosпрай-ионизацией, термической денатурации комплементарных ДНК-дуплексов с оптической регистрацией сигнала и спектрополяриметрии кругового дихроизма.

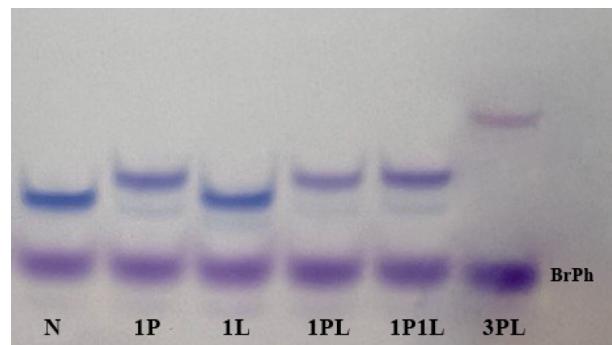
**Анализ модифицированных декануклеотидов методами денатурирующего гель-электрофореза и ОФХ.** Выделенные декануклеотиды анализировали в 20%-ном денатурирующем ПААГ, результаты электрофореза визуализировали, окрашивая гель реактивом StainsAll. Видно (рис. 2), что фосфорилгуванидиновые производные (1P, 1PL, 1P1L, 3PL) характеризуются более

низкой подвижностью в геле в сравнении с нативным аналогом (N), что наиболее вероятно связано с уменьшением общего отрицательного заряда олигонуклеотида при введении PG-группы. Можно отметить, что подвижность 1PL и 1P1L, содержащих один и тот же набор модификаций, но в разном расположении, практически не отличается. Одиночная LNA-модификация, в свою очередь, не оказывает существенного влияния на электрофоретическую подвижность декануклеотида.

Также данные декануклеотиды были проанализированы методом ОФХ. В качестве неподвижной фазы использовали ProntoSIL-120-5-C18, хроматографию проводили в линейном градиенте вода–ацетонитрил. Было обнаружено (рис. 3), что все модифицированные производные, содержащие PG-группу (1P, 1PL, 1P1L, 3PL), характеризуются большим временем удерживания на обращенной фазе, чем нативный олигонуклеотид. Единичная LNA-модификация (1L) на время удерживания практически не влияет.

Примечательно, что время удерживания PG-LNA-олигонуклеотидов 1PL, 1P1L и PG-олигонуклеотида 1P не совпадает. Это указывает на то, что на гидрофобность олигонуклеотида влияет не только тип и число модификаций, но и их взаимное расположение в углеводоfosфатном остове. Также в случае олигонуклеотида 1PL, содержащего PG и LNA в составе одного нуклеотидного звена, наблюдается частичное разделение сигнала на два перекрывающихся хроматографических пика. С ростом числа PG-LNA-модификаций разделение становится более явным, а также наблюдается уширение хроматографических пиков (рис. 3, 3PL). Для олигонуклеотида 3PL провели аналитическую ОФХ в более “плавном” градиенте ацетонитрила (7.5–22.5% за 16.5 мин), и в этом случае наблюдали четыре частично перекрывающихся хроматографических пика (рис. 4). Вероятно, это обусловлено различием в гидрофобности диастереомерных форм, возникающих вследствие хиральности PG-групп, и взаимным расположением PG-групп и 2',4'-оксиметиленового фрагмента LNA.

Дополнительно был проведен масс-спектрометрический анализ PG-LNA-олигонуклеотидов 1PL и 3PL (данные не приведены), в спектре не наблюдалось сигналов, указывающих на де-



**Рис. 2.** Результат электрофоретического анализа модифицированных декануклеотидов в 20%-ном денатурирующем ПААГ. BrPh – бромфеноловый синий.

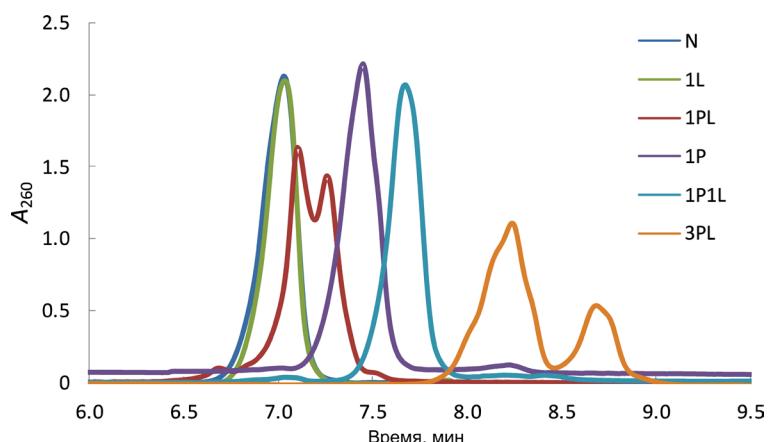


Рис. 3. Результаты ОФХ синтезированных олигонуклеотидов в линейном градиенте ацетонитрила (0–30%, 15 мин).

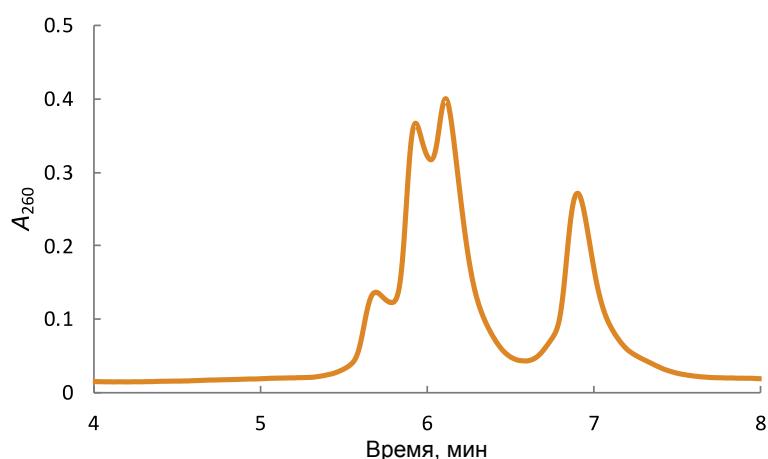


Рис. 4. Результаты ОФХ олигонуклеотида 3PL в линейном градиенте ацетонитрила (7.5–22.5% за 16.5 мин).

градацию олигонуклеотидов – расчетные массы (3171.6 и 3418.5 Да для 1PL и 3PL соответственно) не отличались от теоретических (3173.2 и 3419.5 Да для 1PL и 3PL соответственно).

**Термическая стабильность и структурная организация комплементарных ДНК-комплексов с участием PG-LNA.** Известно, что химические модификации нуклеиновых кислот могут влиять на их гибридизационную способность, а также на структуру образующихся комплементарных комплексов [10]. Согласно литературным данным, введение LNA-звеньев, характеризующихся С3-эндо-конформацией рибозы, существенно стабилизирует двойную спираль – температура плавления возрастает на 3–9°C в зависимости от типа азотистого основания и ближайшего нуклеотидного окружения [11]. При этом LNA-дуплексы характеризуются А-формой двойной спирали, характерной для РНК [12]. Фосфорилгуаниди-

новая модификация, как было показано ранее [13, 14], практически не влияет на пространственную структуру двойной спирали. Установлено, что PG-группа умеренно стабилизирует комплементарные комплексы в растворах с низкой ионной силой (~1.5°C на модификацию в 10 мМ растворе NaCl), в случае растворов с высокой ионной силой (1 М NaCl) наблюдается снижение температуры плавления, предположительно за счет нарушения сольватации комплекса или стерических затруднений [15].

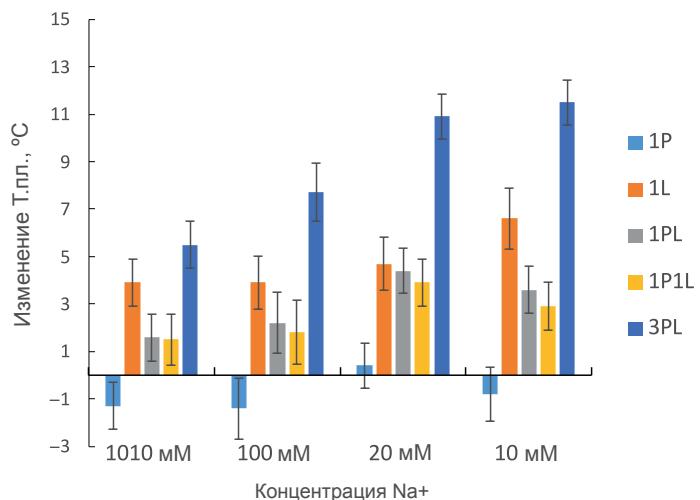
Для исследования совместного влияния PG- и LNA-модификаций на стабильность и структуру комплементарных ДНК-дуплексов проводили термическую денатурацию комплексов, образованных нативным олигонуклеотидом 5'-GCGCCAAACA-3' с каждым из модифицированных олигонуклеотидов, представленных в табл. 1. Температуру плавления комплексов

определяли в водных растворах с различной ионной силой, полученные значения представлены в табл. 2. Для каждого из вариантов модификации вычислили изменение температуры плавления дуплекса по сравнению с нативным аналогом (рис. 5).

Видно (табл. 2), что для каждого из рассматриваемых комплексов понижение ионной силы раствора влечет за собой уменьшение температуры плавления, однако с различной амплитудой. Так, разница в температурах плавления нативного дуплекса при концентрации  $\text{Na}^+$  1010 и 10 мМ составляет  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , для комплекса с участием фосфорилгидинового 1P –  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , для LNA-модифицированного 1L –  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , для PG-LNA-олигонуклеотидов 1PL и 1P1L –  $21.5 \pm 0.8^\circ\text{C}$  и  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  соответственно. Комплекс с участием 3PL, содержащий 3 PG-LNA-звена, проявляет наибольшую термостабильность во всех рассматриваемых вариантах ионной силы, разница между температурой плавления в растворе с вы-

сокой и низкой ионной силой составляет  $17.5 \pm 0.9^\circ\text{C}$ . Примечательно, что PG-LNA-комплексы 1PL и 1P1L характеризуются близкими температурами плавления, несмотря на различное расположение модификаций в углеводо-фосфатном остове. При этом PG-LNA-олигонуклеотиды демонстрируют несколько меньшую термостабильность по сравнению с 1L, содержащим только LNA-модификацию. Предположительно, это может быть связано либо со стерическими затруднениями в том случае, если обе модификации входят в состав одного нуклеотидного звена, либо с нарушением сольватации комплекса и изменением гибридизационных свойств за счет снижения активности молекул воды при формировании комплементарного комплекса [15, 16].

В дополнение к модельным декануклеотидам были рассмотрены комплементарные комплексы с участием 17-звенных олигонуклеотидов с большим числом модификаций (табл. 3). В данном случае часть олигонуклеотидов имеют струк-



**Рис. 5.** Изменение температуры плавления модифицированных ДНК-дуплексов по сравнению с нативным аналогом в растворах с различной ионной силой.

**Таблица 2.** Температуры плавления ( $^\circ\text{C}$ ) ДНК-дуплексов с участием модифицированных декануклеотидов в растворах с различной ионной силой. Комплементарная цепь – 5'-GCGCCAAACA-3'

Концентрация $\text{Na}^+$ , мМ	Олигонуклеотид					
	N	1P	1L	1PL	1P1L	3PL
1010	$58.9 \pm 0.7$	$57.6 \pm 0.7$	$62.8 \pm 0.7$	$60.5 \pm 0.5$	$60.4 \pm 0.8$	$64.4 \pm 0.7$
110	$52.0 \pm 1.0$	$50.6 \pm 0.8$	$55.9 \pm 0.5$	$54.2 \pm 0.8$	$53.8 \pm 0.9$	$59.7 \pm 0.7$
20	$38.8 \pm 0.8$	$39.2 \pm 0.5$	$43.5 \pm 0.8$	$43.2 \pm 0.5$	$42.7 \pm 0.6$	$49.7 \pm 0.5$
10	$35.4 \pm 0.8$	$34.6 \pm 0.8$	$42.0 \pm 1.0$	$39.0 \pm 0.6$	$38.3 \pm 0.6$	$46.9 \pm 0.5$

**Таблица 3.** Нативный и модифицированные 17-звенные олигонуклеотиды, а также их температуры плавления

Название	Последовательность (5'-3')	Число PG	Число LNA	Т. пл., °C
S_N	CCGGTGGTGCAGATGAA	0	0	64.6 ± 0.2
S_6P	<b>C*C*G*GTGGTGCAGAT*G*A*A</b>	6	0	63.3 ± 0.2
S_8L	<b>CCGGTGGTGCAGAT<u>GAA</u></b>	0	8	85.0 ± 0.9
S_6PL	<b>C*C*G*GTGGTGCAGAT*G*A*A</b>	6	8	82.0 ± 1.0
S_1-1	<b>C*CG*GT*GG*TGC*AG*AT*GA*A</b>	8	8	89.3 ± 0.2
S_1-2	<b>C*CGG*TGG*TGC*AGA*TGA*A</b>	6	6	73.4 ± 0.1
S_1-3	<b>C*CGGT*GGTGCAG*ATGA*A</b>	5	5	72.5 ± 0.2

Примечание: N – нативный нуклеотид; N – LNA-нуклеотид; N\* – PG-модифицированный нуклеотид; N\* – PG-LNA-модифицированный нуклеотид. При написании последовательностей олигодезоксирибонуклеотидов префикс “d” (дезокси) опущен для краткости. Температура плавления указана при концентрации  $\text{Na}^+$  110 мМ.

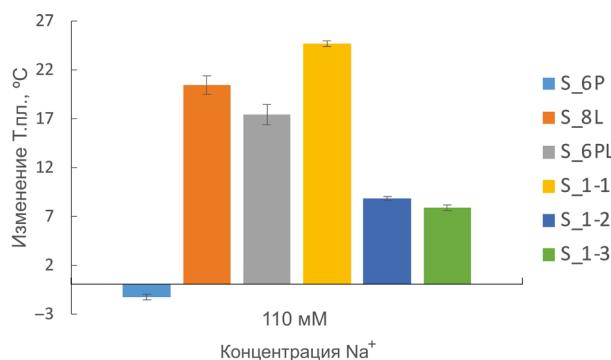
туру гапмера (S\_6P, S\_6L, S\_6PL), концевые фрагменты которого содержат PG-, LNA- или PG-LNA-модификации. Остальные олигонуклеотиды (S\_1-1, S\_1-2, S\_1-3) содержат только PG-LNA-модификации, распределенные вдоль всего углеводофосфатного остова на разном расстоянии друг от друга (структура “миксера”).

Температуру плавления комплексов с участием 17-звенных олигонуклеотидов регистрировали только в растворе с концентрацией  $\text{Na}^+$  110 мМ, результаты приведены в табл. 3, на рис. 6 представлено изменение температуры плавления относительно нативного комплекса. В данном случае также наблюдается умеренное снижение температуры плавления PG-модифицированного комплекса, изменение температуры плавления составило  $-1.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$  при введении 6 PG-групп. LNA-гапмер S\_8L, содержащий 8 LNA-нуклеотидов, стабильнее нативного комплекса на  $20.4 \pm 0.9^\circ\text{C}$ . Гапмер S\_6PL, сочетающий

8 LNA-звеньев и 6 PG-групп, стабильнее на  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ , т.е. также наблюдается небольшое снижение стабилизирующего эффекта при переходе от LNA- к PG-LNA-модификациям, вероятно, за счет стерических затруднений.

Миксера S\_1-1, S\_1-2 и S\_1-3, содержащие только PG-LNA-модификации, но отличающиеся числом модификаций (8, 6 и 5 соответственно) и их расположением в нуклеотидной цепи, образуют комплементарные комплексы с температурой плавления  $89.3 \pm 0.2$ ,  $73.4 \pm 0.1$  и  $72.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  соответственно. Вклад PG-LNA-модификации в температуру плавления явно нелиней, поскольку изменение температуры плавления в пересчете на одну модификацию в случае S\_1-1 составит около  $3^\circ\text{C}$ , а в случае S\_1-2 и S\_1-3 – около  $1.5\text{--}1.6^\circ\text{C}$ . Это свидетельствует о том, что, вероятно, на стабилизирующем эффекте PG-LNA-модификации оказывает влияние ближайшее нуклеотидное окружение, что характерно для каждой из рассматриваемых модификаций в отдельности [15, 17].

Таким образом, можно заключить, что PG-LNA-модификация, так же как и LNA-модификация, стабилизирует комплементарные комплексы, однако с меньшей эффективностью – изменение температуры плавления составляет около  $1.5\text{--}4.0^\circ\text{C}$  на модификацию, в зависимости от ионной силы раствора и расположения модификации в структуре олигонуклеотида (рис. 5, 6). Тем не менее уменьшение стабилизирующего эффекта – это неизбежно недостаток, поскольку “избыточная” термостабильность может провоцировать нежелательное образование внутримолекулярных комплементарных связей, что характерно для LNA [18].



**Рис. 6.** Изменение температуры плавления комплексов с участием модифицированных 17-звенных олигонуклеотидов относительно нативного аналога в растворе с концентрацией  $\text{Na}^+$  110 мМ.

Для олигонуклеотида 3PL, содержащего три PG-LNA-звена подряд, и нативного комплекса регистрировали спектры кругового дихроизма (КД) с целью установить влияние PG-LNA на пространственное строение двойной спирали. Согласно полученным ранее данным [12, 13], PG-группы в отдельности практически не влияют на структуру комплементарных дуплексов – даже комплекс с участием полностью модифицированного электронейтрального декануклеотида сохранял В-форму двойной спирали. Наличие LNA-звеньев, в свою очередь, оказывает влияние на профиль спектров КД: наблюдается смещение положительного и отрицательного пиков в коротковолновую область и заметное увеличение их интенсивности [16, 19], что может указывать на искажение формы двойной спирали (переход из В-формы в А-форму).

Спектр КД для комплекса, образованного PG-LNA-декануклеотидом 3PL и нативной комплементарной ДНК, выраженно отличается от такого для нативного ДНК-ДНК-дуплекса (рис. 7). Относительно спектра нативного дуплекса, наблюдается смещение положительного пика в сторону меньших длин волн: абсцисса точки максимума меняется с 285 на 275 нм, при этом также возрастает интенсивность пика. Отрицательный пик в области 250 нм, в свою очередь,

смещается слабее, интенсивность его умеренно снижается. Также в случае комплекса с участием PG-LNA возрастает интенсивность положительного сигнала в районе 220 нм.

Полученные данные согласуются с литературными сведениями о влиянии LNA на структуру комплементарных дуплексов [20], из чего можно предположить, что воздействие PG-LNA-модификации определяется главным образом наличием LNA-фрагмента. Тем не менее также известно, что на спектры КД комплексов оказывает влияние и пространственная структура LNA-звена (конформация модифицированного рибозного фрагмента, аномерного атома углерода) [21]. Введение PG-модификации, в свою очередь, приводит к возникновению еще одного асимметрического центра и росту числа диастереомерных форм PG-LNA, что само по себе может стать причиной искажений в спектрах КД. Таким образом, полученные данные в целом указывают на частичный переход конформации дуплекса из В- в А-форму при введении PG-LNA, однако для установления точного влияния данной модификации на пространственную структуру комплекса требуются дополнительные исследования конкретных диастереомерных форм, в том числе при помощи других спектральных методов.

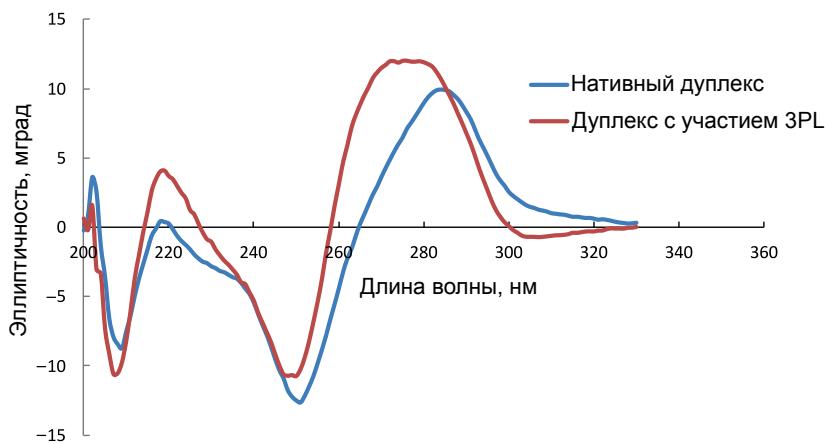


Рис. 7. Спектры кругового дихроизма PG-LNA-модифицированного и нативного ДНК-комплексов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** В работе использовали уксусную кислоту, толуол, иод (Реахим, Россия); метилимидазол (Carl Roth, США); ацетонитрил (Fluka, Швейцария); ацетон, мочевину, акриламид, персульфат аммония (Диам, Россия); аммиак (кон-

центрированный раствор) (Аурат, Россия); пропионовый ангидрид, перхлорат лития (Acros, США); *N,N'*-метиленбисакриламид, бромфеноловый синий, борную кислоту, ЭДТА, ксиленцианол, тетраметилэтилендиамин, какодилат натрия (Sigma, США); ДНКаз I (Fermentas, США);

коммерчески доступные дезоксирибонуклеозидные (ChemGenes, США), а также LNA-модифицированные фосфитамиды (Biolabmix, Россия); гексафторфосфат 2-азид-1,3-диметилимидазолиния (TCI, США); универсальный твердофазный носитель CPG, этилтиотетразол (ChemGenes, США); пиридин, тетрагидрофуран, трихлоруксусную кислоту, дихлорметан (PanReac, Испания); 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (Tris) (Helicon, Россия).

Абсолютизирование растворителей проводили посредством выдерживания над молекулярными ситами (Thermo Fisher Scientific, США) или гидридом кальция (Sigma-Aldrich, США). Фосфитамиды, этилтиотетразол и гексафторфосфат 2-азид-1,3-диметилимидазолиния осушали над оксидом фосфора(V) при пониженном давлении.

**Синтез олигонуклеотидов.** Синтез олигонуклеотидов проводили на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM800 (Биоссет, Россия) согласно стандартному протоколу 2-цианэтильного фосфитамида метода. Олигонуклеотиды, содержащие фосфорилгуанидиновые звенья, синтезировали с использованием протокола, описанного ранее в работах [9, 14, 22]. Для синтеза LNA-фрагментов готовили 0.05 М растворы LNA-мономеров в абсолютном ацетонитриле (для LNA-A, LNA-G, LNA-T) или смеси 1 : 1 по объему абсолютного ацетонитрила и хлористого метилена (для LNA-C). Время контакта растворов LNA-мономера с полимером составляло 10 мин, окисление LNA-фрагментов проводили при помощи 0.02 М раствора иода в смеси ТГФ/вода/пиридин (90 : 9 : 1 по объему) в течение 80 с.

**Хроматография.** Препаративное выделение олигонуклеотидов осуществляли методом оффВЭЖХ на хроматографе 1200 series (Agilent, США). Использовали колонку (4.6 × 150 мм) с сорбентом Eclipse XDB-C18 (5 мкм) (Agilent, США), элюировали в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–80%) в 0.02 М растворе триэтиламмоний ацетата за 40 мин, скорость потока 1.5 мл/мин.

Для анализа выделенных олигонуклеотидов проводили аналитическую ОФХ на хроматографе Милихром А02 (Эконова, Россия) с использованием колонки (2 × 75 мм) ProntoSIL-120-5-C18 (Эконова, Россия), элюировали в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–30%,

если не указано иное) в 0.02 М водном растворе триэтиламмоний ацетата за 15 мин, скорость потока 150 мкл/мин, температура термостата 35°C. Выход хроматографических пиков детектировали по интенсивности оптического поглощения на длине волны 260 нм.

**Масс-спектрометрия.** Молекулярные массы олигонуклеотидов определяли с помощью масс-спектрометрии с электrosпрай-ионизацией на приборе G6410A LCMS/MS (Agilent, США). Образцы готовили растворением олигонуклеотидов в 20 мМ ацетате триэтиламмония в 60%-ном водном ацетонитриле до концентрации 0.1 мМ и объема 10 мкл. Анализ проводили с использованием 80%-ного водного ацетонитрила в качестве элюента при скорости потока 0.1 мл/мин в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов.

**Гель-электрофорез.** Электрофоретический анализ в денатурирующих условиях проводили в 20%-ном ПААГ (акриламид : *N,N'*-метилен-бисакриламид (29 : 1), 8 М мочевина) в буфере TBE (89 мМ Tris-борат, pH 8.3, 2 мМ Na<sub>2</sub>EDTA) при напряжении 50 В/см. Для нанесения олигонуклеотидных образцов в гель использовали раствор, содержащий 8 М мочевину, 0.005% ксиленцианол и 0.005% бромфеноловый синий. Результаты электрофоретического разделения визуализировали окрашиванием с помощью реактива StainsAll (Acros, США).

**Термическая денатурация ДНК-дуплексов.** Термическую денатурацию комплементарных комплексов проводили на спектрофотометре Cary 300 Biomelt (Varian, Австралия), оснащенном терморегулируемой шестикюветной приставкой. Термическую стабильность всех комплексов определяли в водных растворах одного из следующих составов:

- 10 мМ какодилат натрия (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub>Na (сокр. CacNa), pH 7.2;
- 10 мМ CacNa, 10 мМ NaCl;
- 10 мМ CacNa, 100 мМ NaCl;
- 10 мМ CacNa, 1000 мМ NaCl.

Компоненты дуплексов в эквимолярном количестве помещали в буферный раствор (итоговая концентрация дуплекса – 10 мКМ), после чего осуществляли два раунда “нагрев–охлаждение” в диапазоне 5–95°C со скоростью изменения температуры 0.5°C/мин. Оптическое поглощение раст-

волов регистрировали на длинах волн 260, 270 и 300 нм. Температуру плавления дуплекса определяли как температуру, соответствующую максимуму первой производной зависимости оптического поглощения изучаемого раствора от температуры. Полученные данные усредняли, погрешность температуры плавления вычисляли как среднеквадратичное отклонение, величина погрешности не превышала 1°C. Для относительных значений – изменения температуры плавления – погрешность вычисляли по закону распространения случайных погрешностей.

**Спектрополяриметрия кругового дихроизма.** Спектры КД регистрировали, используя спектрополяриметр J-600 (Jasco, Япония), диапазон длин волн 200–330 нм с разрешением по длине волны 0.2 нм, ширина щели 1 нм, время интегрирования 1 с, скорость 50 нм/мин, пять проходов по длинам волн. Концентрация дуплекса в растворе составляла 10 мкМ, концентрация NaCl 100 мМ, в роли буферной компоненты использовали 10 мМ CacNa, pH 7.2. Погрешность определения эллиптичности составила  $\pm 0.2$  мград на длине волны 260 нм.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрен новый вариант химерных олигонуклеотидов, сочетающих одновременно два типа модификации – “замкнутые” рибозные звенья и незаряженные фосфорилгидиновые группы, в том числе в составе одного нуклеотидного звена. Показано, что PG-LNA-олигонуклеотиды характеризуются повышенной гидрофобностью и пониженной электрофоретической подвижностью, что связано, вероятно, с электронейтральностью PG-группы. Установлено, что PG-LNA обладают выраженным стабилизирующим эффектом – вклад в температуру плавления составляет  $\sim 1.5\text{--}4.0^\circ\text{C}$  на модификацию в зависимости от ионной силы раствора и расположения модификаций в нуклеотидной цепи. Также при анализе спектров кругового дихроизма было обнаружено, что при введении трех PG-LNA-фрагментов искажается структура двойной спирали, что может указывать на частичный переход из В- в А-форму за счет конформации LNA-фрагментов.

Таким образом, химерные PG-LNA-олигонуклеотиды можно считать новым частично незаряженным структурным аналогом РНК, на-

ряду с фосфорилгидиновыми 2'-ОМе и 2'-F-содержащими олигонуклеотидами [23]. По совокупности полученных данных можно заключить, что PG-LNA-олигонуклеотиды могут стать многообещающей платформой для создания эффективных инструментов для выделения и анализа нуклеиновых кислот.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.ф-м.н. В.М. Голышеву (ЛСТБ ИХБФМ СО РАН) за помощь в регистрации кривых плавления и спектров кругового дихроизма комплементарных комплексов, а также ЦКП ИХБФМ СО РАН за регистрацию масс-спектров модифицированных олигонуклеотидов.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 24-24-20105, <https://rscf.ru/project/24-24-20105/>) в рамках проекта, поддержанного Правительством Новосибирской области (соглашение № р-97).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Е.С. Дюдеева, П.К. Ляпин – проведение экспериментов и обработка результатов; Е.С. Дюдеева, Е.В. Дмитриенко – обсуждение результатов исследования; Е.С. Дюдеева – написание текста; Е.В. Дмитриенко – редактирование текста статьи, концепция и руководство работой.

## ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Agrawal S, Iyer R.P. // Curr. Opin. Biotechnol. 1995. V. 6. P. 12–19.*  
[https://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80003-4](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80003-4)

2. *Clafré S.A., Rinaldi M., Gasparini P., Seripa D., Bisceglia L., Zelante L., Farace M.G., Fazio V.M.* // Nucleic Acids Res. 1995. V. 23. P. 4134–4142. <https://doi.org/10.1093/nar/23.20.4134>
3. *Wang S.S., Xiong E., Bhadra S., Ellington A.D.* // PLoS One. 2022. V. 17. P. 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268575>
4. *Bailey J.K., Shen W., Liang X.H., Crooke S.T.* // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. P. 10649–10671. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx709>
5. *Metelev V.G., Oretskaya T.S.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 179–183. <https://doi.org/10.31857/S0132342321020172>
6. *Titze-de-Almeida R., David C., Titze-de-Almeida S.S.* // Pharm. Res. 2017. V. 34. P. 1339–1363. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2134-2>
7. *Setten R.L., Rossi J.J., Han S.P.* // Nat. Rev. Drug Discov. 2019. V. 18. P. 421–446. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>
8. *Fratczak A., Kierzek R., Kierzek E.* // Biochemistry. 2009. V. 48. P. 514–516. <https://doi.org/10.1021/bi8021069>
9. *Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A.* // Acta Naturae. 2014. V. 6. P. 116–118. <https://cyberleninka.ru/article/n/phosphoryl-guanidines-a-new-type-of-nucleic-acid-analogues>
10. *Freier S.M., Altmann K.H.* // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 4429–4443. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4429>
11. *Koshkin A.A., Singh S.K., Nielsen P., Rajwanshi V.K., Kumar R., Meldgaard M., Olsen C.E., Wengel J.* // Tetrahedron. 1998. V. 54. P. 3607–3630. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00094-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00094-5)
12. *Egli M., Minasov G., Teplova M., Kumar R., Wengel J.* // Chem. Commun. 2001. V. 1. P. 651–652. <https://doi.org/10.1039/B009447L>
13. *Lomzov A.A., Kupryushkin M.S., Shernyukov A.V., Nekrasov M.D., Dovydenco I.S., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019. V. 513. P. 807–811. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.024>
14. *Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 709–718. <https://doi.org/10.1134/S1068162019060153>
15. *Golyshev V.M., Pyshnyi D.V., Lomzov A.A.* // J. Phys. Chem. B. 2021. V. 125. P. 2841–2855. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c10214>
16. *Kaur H., Arora A., Wengel J., Maiti S.* // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 7347–7355. <https://doi.org/10.1021/bi060307w>
17. *Hull C., Szewczyk C., St. John P.M.* // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2012. V. 31. P. 28–41. <https://doi.org/10.1080/15257770.2011.639826>
18. *Wengel J., Koshkin A., Singh S.K., Nielsen P., Meldgaard M., Rajwanshi V.K., Kumar R., Skoulios J., Nielsen C.B., Jacobsen J.P., Jacobsen N., Olsen C.E.* // Nucleosides Nucleotides. 1999. V. 18. P. 1365–1370. <https://doi.org/10.1080/07328319908044718>
19. *Kypr J., Kejnovská I., Renčík D., Vorlíčková M.* // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. P. 1713–1725. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp026>
20. *Marin V., Hansen H.F., Koch T., Armitage B.A.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2004. V. 21. P. 841–850. <https://doi.org/10.1080/07391102.2004.10506974>
21. *Vivek K., Rajwanshi V.K., Håkansson A.E., Sørensen M.D., Pitsch S., Singh S.K., Kumar K., Nielsen P., Wengel J.* // Angewandte Chemie. 2000. V. 112. P. 1722–1725. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3757\(20000502\)112:9<1722::AID-ANGE1722>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3757(20000502)112:9<1722::AID-ANGE1722>3.0.CO;2-Z)
22. *Stetsenko D.A., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V.* // Int. Application WO2016028187A1, 2016.
23. *Pavlova A.S., Yakovleva K.I., Epanchitseva A.V., Kupryushkin M.S., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V., Ryabchikova E.I., Dovydenco I.S.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 9784. <https://doi.org/10.3390/ijms22189784>

# Synthesis and Properties of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides Containing 2',4'-Locked Nucleotides

E. S. Dyudeeva\*, #, P. K. Lyapin\*, \*\*, and E. V. Dmitrienko\*, \*\*

# *Phone: +7 (952) 916-77-81; e-mail: jenyadudeeva@gmail.com*

\* *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch RAS,  
prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

This work presents a new version of synthetic analogues of oligonucleotides containing two types of modifications – phosphoryl guanidine (PG) internucleotide group and 2',4'-locked ribose fragments (LNA) – in one nucleotide unit. It has been shown the presence of PG-LNA linkages decreases the electrophoretic mobility of the oligonucleotides, primarily due to the electroneutrality of the PG group. Additionally, the PG-LNA modifications increase the hydrophobicity of the oligonucleotides, resulting in longer retention times during reversed-phase chromatography. The thermal stability of complementary duplexes containing PG-LNA oligonucleotides has been investigated. It was found the melting temperature increases by 1.5–4.0°C per modification, depending on the position of the modified unit and the ionic strength of the solution. Furthermore, circular dichroism spectropolarimetry revealed the secondary structure of the complexes formed by PG-LNA differs from the B-form, which may be attributed to the presence of LNA fragments exhibiting a 3'-endo conformation of the ribose ring. Thus, PG-LNA oligonucleotides can be considered as a new structural analogue of RNA with partially uncharged backbone. Based on the data obtained, it can be concluded that PG-LNA oligonucleotides can be considered as a promising tool for various methods of isolation and analysis of nucleic acids.

*Keywords:* modified oligonucleotides, locked units (locked nucleic acid) (LNA), phosphoryl guanidine (PG) oligonucleotides, melting point of modified duplexes