

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Государственный научный центр Российской Федерации  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук  
(ГНЦ ИБХ РАН)**

На правах рукописи

**Аралов Андрей Владимирович**

**Молекулярные инструменты на основе неканонических  
структур нуклеиновых кислот**

Специальность 1.4.9 – «биоорганическая химия»

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора химических наук

Научный консультант  
доктор химических наук  
Варижук Анна Михайловна

Москва – 2025 г.

## Оглавление

|   |     |
|---|-----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....  | 3   |
| ВВЕДЕНИЕ.....   | 6   |
| Глава 1. Обзор литературы.....  | 17  |
| 1.1. 1,3-Диаза-2-оксофеноксазин и его производные .....   | 17  |
| 1.2. Неканонические структуры нуклеиновых кислот .....  | 35  |
| 1.3. Соединения, взаимодействующие с G4 и иМ.....   | 43  |
| 1.4. Аптамеры .....   | 51  |
| 1.5. Генетические кодируемые метки на основе РНК-аптамеров .....  | 57  |
| Глава 2. Обсуждение результатов .....   | 64  |
| 2.1. Оптические зонды для визуализации биомолекул.....  | 64  |
| 2.2. Регуляторы стабильности G4 и псевдоузла.....   | 114 |
| 2.3. Химическая модификация иМ для создания рН-сенсоров и систем скрининга<br>низкомолекулярных модуляторов стабильности иМ ..... | 164 |
| 2.4. Химическая модификация аптамеров для определения структуры и регуляции сродства .....  | 255 |
| Глава 3. Экспериментальная часть .....  | 274 |
| 3.1 Химический синтез .....   | 274 |
| 3.2 Биофизические и биохимические методы.....   | 308 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 332 |
| ВЫВОДЫ.....   | 334 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....  | 336 |
| БЛАГОДАРНОСТИ .....   | 387 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

|        |  |
|--------|--|
| АМФ    | – аденозинмонофосфат                                       |
| АТФ    | – аденозинтрифосфат  |
| АТФУ   | – ангидрид трифторуксунной кислоты                         |
| БСИ    | – биослойная интерферометрия                               |
| ВИЧ    | – вирус иммунодефицита человека                            |
| ВФИ    | – вытеснение флуоресцентного интеркалятора                 |
| ВЭЖХ   | – высокоэффективная жидкостная хроматография               |
| ГКР    | – гигантское комбинационное рассеяние                      |
| ДБУ    | – 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен                        |
| ДЕАД   | – диэтилазодикарбоксилат                                   |
| ДИАД   | – диизопропилазодикарбоксилат                              |
| ДИПЭА  | – диизопропилэтиламин                                      |
| ДЛТ    | – двойной люциферазный тест                                |
| ДМАП   | – <i>N,N</i> -диметиламинопиридин                          |
| ДМСО   | – диметилсульфоксид  |
| ДМФА   | – диметилформамид  |
| ДНК    | – дезоксирибонуклеиновая кислота                           |
| ДСП    | – дифференциальные спектры поглощения                      |
| дцДНК  | – двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота            |
| дЦТФ   | – 2'-дезокситидинтрифосфат                                 |
| ЖХ     | – жидкостная хроматография                                 |
| иМ     | – i-мотив (мотив интеркалированных параллельных дуплексов) |
| ИФ     | – интенсивность флуоресценции                              |
| КД     | – круговой дихроизм  |
| МС     | – масс-спектрометрия                                       |
| МСТ    | – микромасштабный термофорез                               |
| НК     | – нуклеиновая кислота                                      |
| НСБ    | – неструктурный белок                                      |
| ОДН    | – олигодезоксирибонуклеотид                                |
| ОН     | – олигонуклеотид   |
| ОПФ    | – метод остановленного потока с контролем по флуоресценции |
| ОТ-ПЦР | – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией     |
| оцДНК  | – одноцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота            |

РНК – рибонуклеиновая кислота

РСРС – рибосомный сдвиг рамки считывания

ТБАФ – фторид тетрабутиламмония

ТГФ – тетрагидрофуран

ТИЭП – тест на изменение электрофоретической подвижности

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФУ – трифторуксусная кислота

ТЭА – триэтиламин

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

BHQ – тушитель флуоресценции типа "черная дыра"

Вос – трет-бутоксикарбонил

CC<sub>50</sub> – полумаксимальная цитотоксическая концентрация

DFHBI – 3,5-дифтор-4-гидроксibenзилиденимидазолинон

DMS – диметилсульфат

DMTr – 4,4'-диметокситритил

DMTr-Cl – 4,4'-диметокситритилхлорид

$\epsilon$  – коэффициент молярной экстинкции

EC<sub>50</sub> – полумаксимальная эффективная концентрация

ESI – ионизации электрораспылением

FAM – 6-флуоресцеининил-6-карбоксамидогексил

$\Phi^F$  – Квантовый выход флуоресценции

GFP – зеленый флуоресцентный белок

G4 – G-квадруплекс

HMBC – гетероядерная многоквантовая корреляционная спектроскопия

HRMS – масс-спектрометрия высокого разрешения

HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия

IC<sub>50</sub> – полумаксимальная ингибирующая концентрация

LNA – конформационно-запертая нуклеиновая кислота

MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция

MTT-тест — колориметрический тест для оценки метаболической активности

клеток

NaCNBH<sub>3</sub> – цианоборгидрид натрия

NBS – *N*-бромсукцинимид

NM — *N*-метилимидазол

NMM – *N*-метилмезопорфирин IX



OD – оптическая плотность

PBS – фосфатно-солевой буфер

PDS – пиридостатин

Ph – фенил

SARS-CoV-2 – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-2

SELEX – систематический отбор лигандов при экспоненциальном обогащении

$T_{пл}$  – температура плавления

$T_o$  – температура отжига

TBA – тромбин-связывающий аптамер

TBDPS – трет-бутилдифенилсилил

TBTA – трис(бензилтриазилилметил)амин

ThT – тιοфавин Т

TIPDSiCl<sub>2</sub> – 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисилоксан

TPS-Cl – 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид

## ВВЕДЕНИЕ

С момента открытия классической В-формы ДНК в начале 1960-х годов ведутся интенсивные поиски альтернативных структур нуклеиновых кислот. Способность нуклеиновых кислот сворачиваться во вторичные структуры, такие как шпильки, триплексы, G-квадруплексы и i-мотивы, позволяет контролировать многие клеточные процессы, в том числе изменять уровни экспрессии генов, связанных со многими генетическими заболеваниями человека, включая рак и неврологические расстройства. Например, ДНК- и РНК-последовательности, содержащие длинные повторы, часто образуют шпилечные или крестообразные структуры, которые могут являться причиной тяжелых неврологических заболеваний. Кроме того, неканонические структуры участвуют в поддержании длины теломерных участков, часто обнаруживаются в элементах, регулирующих репликацию, транскрипцию и трансляцию, и связаны с повреждением ДНК и геномной нестабильностью, общими факторами патогенеза некоторых видов рака. С другой стороны, неканонические структуры нуклеиновых кислот находят широкое применение в нанотехнологии, где они стали мощным инструментом для конструирования биосенсоров, логических устройств и материалов с регулируемыми свойствами. Использование реагирующих на стимулы неканонических структур нуклеиновых кислот обеспечивает многообещающий подход к регулированию пространственной организации и иерархической сборки наноструктур. В связи с этим, неканонические структуры нуклеиновых кислот рассматриваются в настоящее время как потенциальные терапевтические мишени при различных генетических заболеваниях и активно используются в качестве элементов различных молекулярных инструментов.

Настоящая работа посвящена дизайну и разработке схем синтеза оптических зондов, изменяющих свои свойства при взаимодействии с неканоническими структурами нуклеиновых кислот, а также инструментов оптической визуализации биомолекул и иных молекулярных инструментов на основе нуклеиновых кислот и зондов к ним. В контексте данного исследования, идеальные оптические зонды должны генерировать при взаимодействии сильный, специфический и стабильный сигнал. При наличии подобных свойств зонд может найти применение в разработке быстрых и недорогих методов установления структуры последовательностей нуклеиновых кислот, обнаруженных в результате, например, *in silico* или клеточных исследований. Кроме того, подобные зонды могут быть пригодны в качестве внешних генерирующих сигнал элементов в паре с ДНК- и генетически кодируемыми РНК-аптамерами для создания биосенсоров и систем

визуализации нуклеиновых кислот. Наши разработки в этом направлении представлены в разделе «Оптические зонды для визуализации биомолекул».

Однако, органические молекулы также способны изменять свойства взаимодействующих с ними неканонических структур нуклеиновых кислот. Подход к регулированию свойств подобных структур выглядит перспективным, учитывая полученные на данный момент многочисленные данные о роли неканонических структур эукариотических, бактериальных и вирусных геномов в регуляции репликации и всех стадий экспрессии генов. На настоящий момент выявлено большое количество перспективных мишеней и показано, что воздействие на них может оказывать как противоопухолевый и нейропротекторный, так и противовирусный и антибактериальный эффект. Разработке и оценке *in vitro* высоко- и низкомолекулярных соединений, способных эффективно воздействовать на G-квадруплексы (G4) из теломерных участков/промоторов онкогенов и псевдоузел (ПУ) из РНК-генома вируса SARS-CoV-2, посвящен раздел «Регуляторы стабильности G-квадруплексов и псевдоузла».

В упомянутых разделах дизайн соединений проводили в основном с учетом их предполагаемых взаимодействий с G4, образующимися в G-богатых последовательностях. Однако, структура, сворачивающаяся в комплементарной C-богатой последовательности и называемая интеркалированным мотивом (иМ) или i-мотивом, также привлекает внимание исследователей в связи с возрастающим количеством данных об ее участии в регуляции транскрипции. Кроме того, чувствительность иМ к изменениям pH стала основой для создания наноустройств от pH-сенсоров до наноконтейнеров и гидрогелей. Таким образом, представляет интерес как разработка методов направленной регуляции стабильности и сборки иМ и создание на их основе наноустройств, так и поиск селективных лигандов. Разработкам в этом направлении посвящен раздел, озаглавленный «Химическая модификация i-мотивов для создания pH-сенсоров и систем скрининга низкомолекулярных модуляторов стабильности иМ».

Наконец, представляет интерес разработка подхода к выявлению роли различных фрагментов аптамеров в узнавании мишени и устранению полиморфизма для последующего установления структуры конформационно однородного аптамера. Данный подход основан на использовании нуклеотидной модификации, минимально изменяющей структуру аптамера и обладающей чувствительной к микроокружению флуоресценцией, и малобороздочных тетрад GTGT, устраняющих эффект проскальзывания цепей иМ. Результаты данных исследований, вместе с разработкой нуклеотидной модификации, позволяющей регулировать сродство аптамера TBA15 к тромбину при добавлении ионов

$\text{Ag}^+$ , представлены в разделе «Химическая модификация аптамеров для определения структуры и регуляции сродства».

**Целью** настоящей работы является дизайн, синтез, скрининг и изучение свойств лигандов и нуклеотидных модификаций неканонических структур нуклеиновых кислот и создание на их основе молекулярных инструментов.

В рамках данной цели были сформулированы следующие задачи:

- провести дизайн и синтез соединений-кандидатов в оптические зонды и изучить применимость лидерных соединений в качестве зондов для установления вторичной структуры нуклеиновых кислот и в качестве элементов молекулярных инструментов;
- провести дизайн, синтез и исследование свойства *in vitro* высоко- и низкомолекулярных соединений, влияющих на термическую стабильность неканонических структур нуклеиновых кислот;
- разработать подходы к регуляции термодинамических и кинетических параметров иМ и создать на их основе рН-сенсоры, способные определять небольшие изменения рН вблизи физиологических значений и имеющие различную внутриклеточную локализацию;
- разработать системы надежного скрининга низкомолекулярных соединений на способность влиять на термическую стабильность неканонических структур;
- разработать подходы к установлению сайта связывания и регуляции сродства аптамеров на основе неканонических структур нуклеиновых кислот к мишени.

Данная работа имеет очевидную научную новизну. В результате проведенного исследования впервые предложены принципы дизайна оптических зондов на основе бензотиазолового оранжевого для первичной оценки вторичной структуры различных ДНК- и РНК-последовательностей. Впервые оценено влияние длины дуплексного модуля на спектральные свойства аналогов хромофора GFP в комплексе с двухмодульными (дуплекс+G4) ДНК- и РНК-структурами. Впервые разработан эффективный метод синтеза красителей для аптамеров семейства Манго и получен перспективный краситель, флуоресцирующий в красной области видимого диапазона. Разработана уникальная генетически кодируемая платформа с активирующей флуоресценцию низкомолекулярного красителя меткой минимального размера, которая впервые использована для визуализации малой некодирующей РНК (мнкРНК) в сложной системе прокариот-эукариот. Впервые предложен принцип дизайна Раман-активных молекул с высоким сродством к элементам аптамеров и продемонстрирована применимость соединения-лидера в создании простых и технологичных аптасенсоров. Впервые разработаны принципы дизайна эффективных и селективных G4-лигандов на основе 1,3-диаза-2-оксофеноксазина, обладающих повышенной токсичностью для опухолевых клеток по сравнению с клетками

неопухолевого происхождения *in vitro*. Впервые опробован имидазолоновый остов из структуры хромофора зеленого флуоресцентного белка (GFP) для создания селективных и эффективных стабилизаторов уникальной двухмодульной структуры LTR-III G4 из ДНК генома вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1). Впервые продемонстрировано, что подобные соединения обладают противовирусной активностью *in vitro*. Впервые проведен дизайн антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на расплетение псевдоузла в РНК-геноме SARS-CoV-2, и продемонстрирована их способность подавлять репликацию вируса *in vitro*. Получен ряд уникальных нуклеотидных модификаций, позволяющих регулировать термодинамические и кинетические параметры иМ. Одна из модификаций (i-clamp) демонстрирует наибольшую на настоящий момент термическую стабилизацию иМ. Впервые предложены принципы дизайна быстрых рН-сенсоров на основе мономолекулярных иМ, позволяющих определять изменения рН в физиологически релевантном диапазоне. Впервые предложен подход для регулирования локализации данных рН-сенсоров в живых клетках. Впервые разработана платформа для профилирования низкомолекулярных соединений на способность модулировать термическую стабильность иМ. Впервые продемонстрирована применимость синтетического миметика цитозина для установления сайта связывания аптамера с гемагглютинином вируса гриппа А. Разработан уникальный флуоресцентный миметик тимина и продемонстрирована его применимость для контролируемой регуляции сродства антитромбинового аптамера к мишени.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

В ходе выполнения работы автором предложен ряд принципов дизайна органических соединений и/или их комплексов с фрагментами нуклеиновых кислот, которые могут быть использованы исследователями в создании молекулярных инструментов и кандидатов в терапевтические агенты. В работе проведено изучение связи структуры и спектральных свойств набора производных красителя бензотиазоловый оранжевый и предложен флуоресцентный зонд, превосходящий по ряду параметров широко используемые аналоги и применимый для предварительной оценки вторичной структуры нуклеиновых кислот. Предложены принципы дизайна комплексов флуорогенных красителей с двухмодульными (дуплекс+G4) ДНК- и РНК-структурами с повышенной яркостью, которые могут быть использованы при конструировании аптамеров для флуоресцентной визуализации и гибридизационных зондов. Разработана платформа, состоящая из сверхкороткой метки на основе аптамера Манго II и флуорогенного красителя и применимая для флуоресцентного мечения мнкРНК в живых клетках. Предложены принципы дизайна Раман-активных молекул с высоким сродством к аптамерам и

продемонстрирована их применимость в составе аптасенсоров в качестве внешних генераторов сигнала. Использование внешнего генератора сигнала позволит исключить метки, вводимые на стадии синтеза аптамеров, что снизит общую стоимость сенсоров. Получены данные о связи структуры и эффективности/селективности ряда G4-лигандов и выявлены перспективные кандидаты для дальнейшей модификации и исследований *in vivo*. Разработаны принципы дизайна антисмысловых олигонуклеотидов, которые нацелены на расплетение регулирующего трансляцию высокоструктурированного элемента в геноме вируса SARS-CoV-2. Как результат, отобраны перспективные для дальнейших исследований кандидаты, обладающие низкой токсичностью и проявляющие противовирусную активность *in vitro* в наномолярном диапазоне концентраций. Разработан ряд нуклеотидных модификаций, позволяющих регулировать термодинамические и кинетические параметры иМ. Результаты могут найти применение в нанотехнологии в связи с достаточно частым применением иМ в качестве элементов различных наноустройств. Предложены принципы дизайна и продемонстрирована применимость *in vitro* рН-сенсоров, позволяющих определять небольшие изменения рН вблизи физиологических значений различной продолжительности в различных клеточных компартментах. Полученные индикаторы представляют собой перспективную альтернативу генетически кодируемым рН-сенсорам, например, для измерения рН в медленно делящихся и неделящихся клетках. Разработана платформа надежного профилирования низкомолекулярных соединений на способность влиять на термическую стабильность иМ. Поскольку все большее количество данных свидетельствует о роли данных структур в регуляции экспрессии генов, особенно онкогенов, разработанная система может стать основой для скрининга и отбора кандидатов, например, в противоопухолевые агенты. Впервые продемонстрирована применимость флуоресцентного миметика цитозина  $tC^O$  в установлении сайта связывания аптамера, состоящего из иМ и дуплексного модулей, с белком-мишенью. Данные способствуют лучшему пониманию роли иМ в специфическом распознавании белков в физиологических условиях и могут стимулировать поиски аптамеров среди С-богатых последовательностей. Разработан флуоресцентный миметик тимина оксо- $\epsilon A$ , образующий комплексы с ионами  $Ag^+$  в составе дуплексов и G4 и позволяющий регулировать сродство аптамера ТВА15 к человеческому тромбину. Полученные данные могут найти применение в нанотехнологии для создания устройств с регулируемыми свойствами.

#### **Методология и методы исследования.**

Работа находится на стыке химии и биологии и посвящена синтезу органических молекул с заранее заданными свойствами и проверке их свойств *in vitro*. Для синтеза

соединений использованы современные методы органической химии и оригинальные авторские методики. Для установления структуры и целостности низкомолекулярных соединений применялись масс-спектрометрия высокого разрешения и ЯМР-спектроскопия на ядрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  и  $^{19}\text{F}$ . Модифицированные олигонуклеотиды охарактеризованы ВЭЖХ, масс-спектрометрией и, в некоторых случаях, ЯМР-спектроскопией. Принципы дизайна соединений и методики их синтеза представлены в соответствующих разделах настоящей работы. Соединения и их комплексы с нуклеиновыми кислотами охарактеризованы методами УФ-, КД-, Рамановской и флуоресцентной спектроскопии и микромасштабного термофореза. Перспективные кандидаты были исследованы на клеточных культурах с использованием методов флуоресцентной микроскопии (pH-сенсоры и визуализация биомолекул), методов оценки цитотоксичности (кандидаты в противовирусные и противоопухолевые агенты) и подавления вызванного вирусом цитопатического эффекта (кандидаты в противовирусные агенты). Полученные результаты и протоколы проведения данных экспериментов также представлены в соответствующих разделах настоящей диссертации.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Осуществлен дизайн и синтез флуоресцентных зондов с улучшенной способностью отличать G4 от других вторичных структур нуклеиновых кислот по сравнению с используемыми стандартными зондами - тιοфлавином Т (ThT) и тиазоловым оранжевым ТО;
2. Предложены принципы увеличения яркости комплексов аналогов хромофора GFP с двухмодульными структурами G4+дуплекс за счет варьирования длины дуплексного модуля;
3. Разработан высокоэффективный подход к синтезу красителей для аптамеров семейства Манго, используемых для визуализации РНК в живых системах. Продемонстрирована применимость платформы, включающей оптимизированную сверхкороткую метку на основе аптамера Манго II и новый флуорогенный краситель, флуоресцирующий в красной области видимого спектра, для визуализации мнкРНК микобактерии в инфицированных макрофагах;
4. Осуществлен дизайн и синтез Раман-активных красителей на основе каркаса семейства тушителей флуоресценции типа "черная дыра" (Black Hole Quencher, BHQ) с высокой аффинностью к ансамблям из остатков гуанина, применимых в качестве внешнего генерирующего сигнал элемента высокочувствительных аптасенсоров на основе поверхностно-усиленной Рамановской спектроскопии;

5. Проведен дизайн и синтез специфичных и эффективных стабилизаторов G4 на основе 1,3-диаза-2-оксофеноксазинового каркаса с повышенной цитотоксичностью для опухолевых клеток *in vitro*;

6. Осуществлены скрининг аналогов хромофора GFP на способность стабилизировать уникальную двухмодульную ДНК-мишень LTR-III G4 из генома ВИЧ-1 и выявлено высокоспецифичное соединение, обладающее анти-ВИЧ активностью *in vitro*;

7. Проведен дизайн антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих остатки G-clamp или конформационно-запертых нуклеиновых кислот (LNA), которые способны расплетать псевдоузел в геномной РНК SARS-CoV-2 и подавлять репликацию вируса *in vitro*;

8. Разработан ряд нуклеотидных модификаций, позволяющих регулировать термодинамические и кинетические параметры иМ;

9. Разработан набор рН-сенсоров на основе мономолекулярных иМ, позволяющих отслеживать небольшие изменения рН вблизи физиологических значений в различных клеточных отделах;

10. Разработана платформа для надежной оценки способности низкомолекулярных соединений влиять на термическую стабильность иМ;

11. Впервые продемонстрирована применимость нуклеотидной модификации tC<sup>0</sup> в установлении сайта связывания аптамера, содержащего иМ-модуль, к гемагглютиниру вируса гриппа А;

12. Разработана нуклеотидная модификация, флуоресцентный миметик тимидина, для регуляции средства аптамера к тромбину *in vitro*.

### **Список публикаций автора по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 21 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus.

1. Bychenko OS, Khrulev AA, Svetlova LI, Tsvetkov VB, Kamzeeva PN, Skvortsova YV, Tupertsev BS, Ivanov IA, Aseev LV, Khodarovich YM, Belyaev ES, Kozlovskaya LI, Zatsepin TS, Azhikina TL\*, Varizhuk AM\*, **Aralov AV\*** (\*corresponding authors). Red light-emitting short Mango-based system enables tracking a mycobacterial small noncoding RNA in infected macrophages. *Nucleic Acids Res.* 2023; 51(6): 2586–2601. doi.org/10.1093/nar/gkad100.

2. **Aralov AV\***, Gubina N, Cabrero C, Tsvetkov VB, Turaev AV, Fedeles BI, Croy RG, Isaakova EA, Melnik D, Dukova S, Ryazantsev DY, Khrulev AA, Varizhuk AM, González C, Zatsepin TS\*, Essigmann JM. 7,8-Dihydro-8-oxo-1,*N*<sup>6</sup>-ethenoadenine: an exclusively Hoogsteen-paired thymine mimic in DNA that induces A→T transversions in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2022; 50 (6): 3056–3069. doi.org/10.1093/nar/gkac148.



3. Tsvetkov VB, Zatsepin TS, Belyaev ES, Kostyukevich YI, Shpakovski GV, Podgorsky VV, Pozmogova GE, Varizhuk AM\*, **Aralov AV\***. i-Clamp phenoxazine for the fine tuning of DNA i-motif stability. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(6): 2751–2764. doi.org/10.1093/nar/gky121.
4. Tsvetkov V, Mir B, Alieva R, Arutyunyan A, Oleynikov I, Novikov R, Boravleva E, Kamzeeva P, Zatsepin T, **Aralov A\***, González C\*, Zavyalova E\*. Unveiling the unusual i-motif-derived architecture of a DNA aptamer exhibiting high affinity for influenza A virus. *Nucleic Acids Res.* 2025; 53(1): gkae1282. doi.org/10.1093/nar/gkae1282.
5. Turaev AV, Tsvetkov VB, Tankevich MV, Smirnov IP, **Aralov AV\***, Pozmogova GE\*, Varizhuk AM. Benzothiazole-based cyanines as fluorescent “light-up” probes for duplex and quadruplex DNA. *Biochimie.* 2019; 162: 216–228. doi.org/10.1016/j.biochi.2019.04.018.
6. Zaitseva SO, Baleeva NS, Zatsepin TS, Myasnyanko IN, Turaev AV, Pozmogova GE, Khrulev AA, Varizhuk AM, Baranov MS, **Aralov AV\***. Short Duplex Module Coupled to G-Quadruplexes Increases Fluorescence of Synthetic GFP Chromophore Analogues. *Sensors (Basel).* 2020; 20(3): 915. doi.org/10.3390/s20030915.
7. Zavyalova E\*, Tikhonova D, Zhdanov G, Rudakova E, Alferova V, Moiseenko A, Kamzeeva P, Khrulev A, Zalevsky A, Arutyunyan A, Novikov R, Kukushkin V, **Aralov A\***. SERS-based biosensor with Raman-active external responsive element for rapid determination of adenosine monophosphate. *Anal Chim Acta.* 2022; 1221: 340140. doi.org/10.1016/j.aca.2022.340140.
8. Zhdanov G, Nyhrikova E, Meshcheryakova N, Kristavchuk O, Akhmetova A, Andreev E, Rudakova E, Gambaryan A, Yaminsky I, **Aralov A**, Kukushkin V, Zavyalova E\*. A Combination of Membrane Filtration and Raman-Active DNA Ligand Greatly Enhances Sensitivity of SERS-Based Aptasensors for Influenza A Virus. *Front Chem.* 2022; 10: 937180. doi.org/10.3389/fchem.2022.937180.
9. Lizunova SA, Tsvetkov VB, Skvortsov DA, Kamzeeva PN, Ivanova OM, Vasilyeva LA, Chistov AA, Belyaev ES, Khrulev AA, Vedekhina TS, Bogomazova AN, Lagarkova MA, Varizhuk AM\*, **Aralov AV\***. Anticancer activity of G4-targeting phenoxazine derivatives *in vitro*. *Biochimie.* 2022; 201: 43–54. doi.org/10.1016/j.biochi.2022.07.001.
10. Tsvetkov VB, Varizhuk AM, Lizunova SA, Nikolenko TA, Ivanov IA, Severov VV, Belyaev ES, Shitikov EA, Pozmogova GE\*, **Aralov AV\***. Phenoxazine-based scaffold for designing G4-interacting agents. *Org Biomol Chem.* 2020; 18(31): 6147–6154. doi.org/10.1039/D0OB00983K.
11. Ryazantsev DY, Myshkin MY, Alferova VA, Tsvetkov VB, Shustova EY, Kamzeeva PN, Kovalets PV, Zaitseva ER, Baleeva NS, Zatsepin TS, Shenkarev ZO, Baranov MS,

Kozlovskaya LI\*, **Aralov AV\***. Probing GFP chromophore analogs as anti-HIV agents targeting LTR-III G-quadruplex. *Biomolecules*. 2021; 11(10): 1409. doi.org/10.3390/biom11101409.

12. Knizhnik E, Chumakov S, Svetlova J, Pavlova I, Khodarovich Y, Brylev V, Severov V, Alieva R, Kozlovskaya L, Andreev D, **Aralov A\***, Varizhuk A\*. Unwinding the SARS-CoV-2 Ribosomal Frameshifting Pseudoknot with LNA and G-Clamp-Modified Phosphorothioate Oligonucleotides Inhibits Viral Replication. *Biomolecules*. 2023; 13(11): 1660. doi.org/10.3390/biom13111660.

13. Petrunina NA, Shtork AS, Lukina MM, Tsvetkov VB, Khodarovich YM, Feofanov AV, Moysenovich AM, Maksimov EG, Shipunova VO, Zatsepin TS, Bogomazova AN, Shender VO, **Aralov AV**, Lagarkova MA\*, Varizhuk AM\*. Ratiometric i-Motif-Based Sensor for Precise Long-Term Monitoring of pH Micro Alterations in the Nucleoplasm and Interchromatin Granules. *ACS Sens*. 2023; 8(2): 619–629. doi.org/10.1021/acssensors.2c01813.

14. Petrunina NA, Lebedev VV, Kirillova YG, **Aralov AV**, Varizhuk AM, Sardushkin MV\*. DNA Intercalated Motifs with Non-Nucleoside Inserts. *Russ J Bioorg Chem*. 2021; 47(6): 1341–1344. doi.org/10.1134/S1068162021060212.

15. Turaev AV, Isaakova EA, Severov VV, Bogomazova AN, Zatsepin TS, Sardushkin MV, **Aralov AV**, Lagarkova MA, Pozmogova GE, Varizhuk AM\*. Genomic DNA i-motifs as fast sensors responsive to near-physiological pH microchanges. *Biosens Bioelectron*. 2021; 175: 112864. doi.org/10.1016/j.bios.2020.112864.

16. Tsvetkov VB, Turaev AV, Petrunina NA, Melnik DM, Khodarovich YM, Pozmogova GE, Zatsepin TS, Varizhuk AM\*, **Aralov AV\***. Phenoxazine pseudonucleotides in DNA i-motifs allow precise profiling of small molecule binders by fluorescence monitoring. *Analyst (Lond)*. 2021; 146(146): 4436–4440. doi.org/10.1039/D1AN00660F.

17. Tsvetkov VB, Zatsepin TS, Turaev AV, Farzan VM, Pozmogova GE, **Aralov AV\***, Varizhuk AM\*. DNA i-Motifs With Guanidino-i-Clamp Residues: The Counterplay Between Kinetics and Thermodynamics and Implications for the Design of pH Sensors. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019; 17: 527–536. doi.org/10.1016/j.csbj.2019.04.006.

18. Varizhuk AM, Zatsepin TS\*, Golovin AV, Belyaev ES, Kostyukevich YI, Dedkov VG, Shipulin GA, Shpakovski GV, **Aralov AV\***. Synthesis of oligonucleotides containing novel G-clamp analogue with C8-tethered group in phenoxazine ring: Implication to qPCR detection of the low-copy Kemerovo virus dsRNA. *Bioorg Med Chem*. 2017; 25(14): 3597–3605. doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.062.

19. Schönrrath I, Tsvetkov VB, Barceló-Oliver M, Hebenbrock M, Zatsepin TS, **Aralov AV\***, Müller J\*. Silver(I)-mediated base pairing in DNA involving the artificial nucleobase 7,8-

dihydro-8-oxo-1,*N*<sup>6</sup>-ethenoadenine. *J Inorg Biochem.* 2021; 219: 111369. doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111369.

20. Shtork A, Tsvetkov V, Slushko G, Lushpa V, Severov V, Kamzeeva P, Varizhuk A\*, Aralov A\*. Diversifying i-motif-based pH sensors: Labeling patterns tune the intracellular localization. *Sens Actuators B Chem.* 2024; 411: 135747. doi.org/10.1016/j.snb.2024.135747

21. Ryazantsev DY, Meshcheryakova NF, Alferova VA, Kamzeeva PN, Ryabukhina EV, Zatsepin TS, Zavyalova EG, Aralov AV\*. Cytosine mimic azophenoxazine tC<sup>O</sup><sub>Azo</sub> quenches FAM fluorescence and provides concentration-dependent Raman quenching upon molecular beacon hybridization. *Bioorg Med Chem Lett.* 2025; 120: 130131. doi.org/10.1016/j.bmcl.2025.130131.

### Степень достоверности и апробация результатов.

Основные результаты работы включают химический синтез высоко- и низкомолекулярных соединений с заранее заданными свойствами. Все полученные модифицированные высокомолекулярные соединения охарактеризованы масс-спектрометрией, а низкомолекулярные - ЯМР-спектроскопией и масс-спектрометрией высокого разрешения. Для всех флуоресцентных и Раман-активных соединений в свободном состоянии и в комплексе/смеси с неканоническими структурами нуклеиновых кислот, а также флуоресцирующих нуклеотидных модификаций, оценены спектральные характеристики с использованием УФ-, флуоресцентной или Рамановской спектроскопии. Для лигандов и нуклеотидных модификаций оценена также способность влиять на термическую стабильность неканонических структур нуклеиновых кислот с помощью флуоресцентной и КД-спектроскопии. Оценка селективности осуществлена с привлечением методов конкурентного плавления с отслеживанием изменения флуоресцентного или рамановского сигнала, для оценки сродства – титрование мишени с регистрацией флуоресценции, микромасштабный термофорез, биослойная интерферометрия и эксперименты с вытеснением флуоресцентного интеркалятора. Клеточные эксперименты проводились с генотипированными линиями клеток. В экспериментах в качестве положительных контролей применялись соединения со свойствами, сходными к тем, что ожидалось от предложенных в диссертации соединений. В качестве отрицательных контролей использовались соединения, для которых предполагается или известно отсутствие исследуемой в каждом конкретном случае активности (например, олигонуклеотиды со случайной последовательностью).

Для всех результатов продемонстрирована воспроизводимость в независимых экспериментах. Для биофизических, биохимических и клеточных экспериментов проведен анализ с применением методов статистики.

Все работы выполнены на современном оборудовании. Реактивы приобретались у ведущих мировых производителей.

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 21 статье в рецензируемых зарубежных и отечественных научных журналах. Отдельные результаты работы были представлены на российских и международных научных конференциях, например, на 17ом Симпозиуме по химии нуклеиновых кислот (XVIIIth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid SCNAC, Чески-Крумлов, Чехия) в 2017 году, Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» ГНЦ ИБХ РАН (Москва, Россия) в 2017 г и Молодежной конференции ФНКЦ ФХМ ФМБА (Москва, Россия) в 2021 году, 64ой Всероссийской научной конференции МФТИ (Долгопрудный, Россия) в 2021 году, Всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, Россия) в 2022 году и V Всероссийской конференции «Физико-химическая биология» (Новосибирск, Россия) в 2024 г.

#### **Личный вклад автора.**

Автору принадлежит одна из ключевых ролей в концептуализации исследований, дизайне экспериментов, анализе и опубликовании полученных результатов. Большинство представленных в диссертации результатов получено автором лично, при его непосредственном руководстве или при его участии. Результаты, полученные в рамках сотрудничества и приведенные для иллюстрации применимости разработанных диссертантом соединений и подходов, представлены в обсуждении результатов с указанием исполнителей.

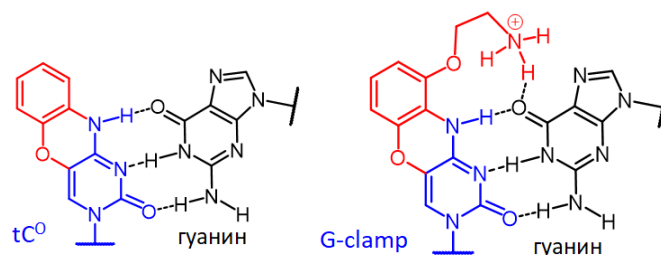
#### **Структура и объем работы.**

Диссертация включает список сокращений, введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальную часть, список литературы и благодарности. Диссертация изложена на 387 страницах, содержит 19 схем, 40 таблиц, 150 рисунков и 619 источника литературы.

## Глава 1. Обзор литературы

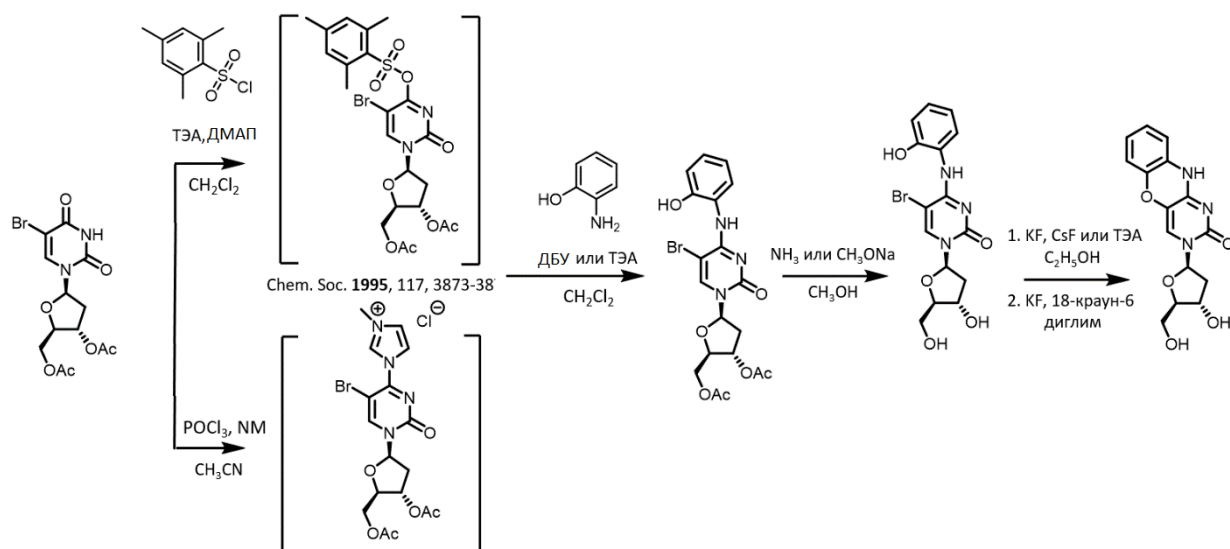
### 1.1. 1,3-Диаза-2-оксофеноксазин и его производные

Синтетическое нуклеиновое основание 1,3-диаза-2-оксофеноксазин ( $tC^O$ ) представляет собой миметик цитозина с расширенной ароматической системой (**Рисунок 1.1.1**). Данная модификация была впервые синтезирована в лаборатории Марка Маттуччи с целью увеличения термической стабильности дуплексов за счет максимизации ее стэкинг-взаимодействий с соседними нуклеиновыми основаниями [1].



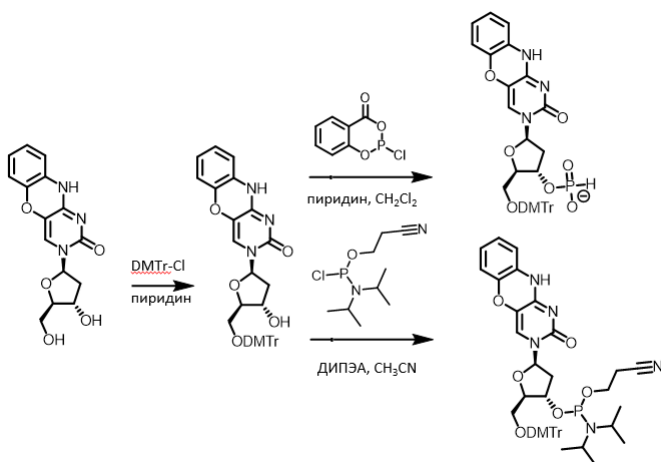
**Рисунок 1.1.1.** Структура и схема образования водородных связей 1,3-диаза-2-оксофеноксазиновой ( $tC^O$ ) модификации и ее 2-аминоэтоксисодержащего аналога (G-clamp) с гуанином.

В оригинальной методике синтез нуклеозида  $tC^O$  (верхняя ветвь, выход 54%) начинался с активации С4 атома урацильного кольца 5',3'-*O*-ацетил-защищенного 5-бром-2'-дезоксидеоксиуридина обработкой его мезитиленсульфохлоридом в присутствии ДМАП и ТЭА, с последующим замещением мезитиленсульфогруппы 2-аминофенольной в присутствии ДБУ (**Схема 1.1.1**). Удаление ацетильных защитных групп метанольным аммиаком и сборка феноксазиновой системы при кипячении *N*-замещенного цитозинового производного в абсолютном этаноле в присутствии фторида цезия давали целевой нуклеозид  $tC^O$ . Позднее, для повышения эффективности введения аминофенольной группы был предложен альтернативный путь (нижняя ветвь, выход 84%) [2]. Ключевой стадией этого подхода было получение промежуточной *N*-метилимидазолиевой соли обработкой исходного нуклеозида смесью оксихлорида фосфора и *N*-метилимидазола [3]. Метод замыкания феноксазиновой системы с использованием вместо этанола более высококипящего растворителя диглима позволил сократить время конденсации с 48-72 часов до 70 минут [4].



**Схема 1.1.1.** Синтетические пути для получения нуклеозида  $tC^0$ .

Затем, проводят стандартное 5'-*O*-диметокситритилирование с последующим получением *H*-фосфоната [2] или фосфорамидита [3,4] для твердофазного синтеза ОДН (Схема 1.1.2).

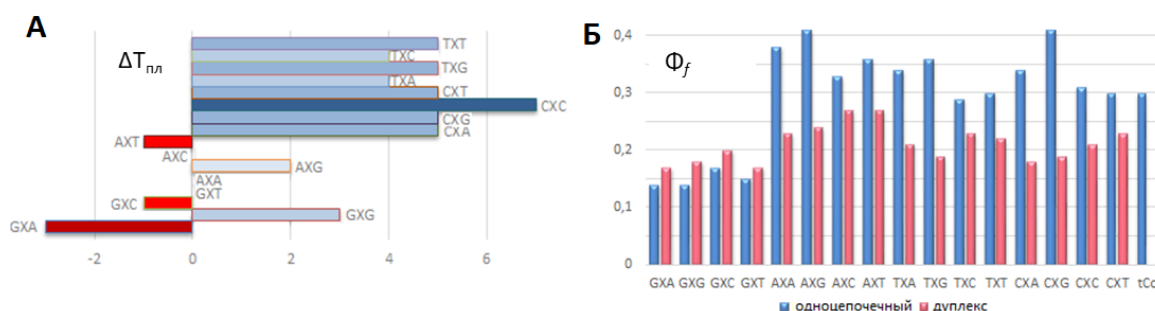


**Схема 1.1.2.** Синтез *H*-фосфоната и фосфорамидита нуклеозида  $tC^0$ .

Поскольку первоначально Маттуччи планировал использовать модификацию в составе антисмысловых ОДН, были проверены гибридизационные свойства  $tC^0$  в составе гибридных ДНК/РНК дуплексов в экспериментах по термической денатурации.

Трициклический гетероцикл специфически гибридизовался с комплементарным гуанином и обладал способностью различать гуанин и аденин ( $\Delta T_{пл}$  14,5 °C), сравнимой с 5-метилцитозином ( $\Delta T_{пл}$  16,5 °C). В качестве миметика цитозина,  $tC^0$  обладал стабилизирующими свойствами, зависящими от количества идущих подряд модификаций ( $\Delta T_{пл}$  от 1,0 °C/мод. для одного модифицированного остатка до 5,0 °C/мод. для трех идущих

подряд вставок) [2]. Повышенная термическая стабильность дуплекса, содержащего три расположенных подряд остатка  $tC^O$ , согласуется с максимальным перекрытием  $\pi$ -орбиталей соседних ароматических систем. Согласно результатам молекулярного моделирования, две соседние феноксазиновые системы, смоделированные на канонической А-форме спирали, обладают существенным перекрытием между центральных оксазиновым кольцом одного трицикла и бензольным кольцом соседнего  $tC^O$ . Такое перекрытие невозможно в гетероциклических системах, состоящих менее чем из трех колец, например, между соседними остатками цитозина. Аналогичные стабилизирующие и дискриминирующие свойства были зафиксированы для ДНК/ДНК дуплексов [3]. Также было изучено влияние фланкирующих оснований на термическую стабилизацию, оказывающую  $tC^O$  (Рисунок 1.1.2А) [5]. В последовательностях, где 5'-фланкирующее азотистое основание представляло собой пурин,  $tC^O$  оказывала умеренный стабилизирующий (AXG и GXG) или дестабилизирующий (GXA, GXC и AXT) эффект, или вообще не оказывала его (AXA и AXC). Наиболее стабилизированные дуплексы содержали  $tC^O$ , фланкированную 5'-цитозином ( $\Delta T_{пл}$  5,5-8,5 $^{\circ}C$ ), в то время как  $tC^O$ -модифицированные дуплексы с 5'-Т в среднем давали чуть меньшую стабилизацию ( $\Delta T_{пл}$  4,0-5,0  $^{\circ}C$ ). Стоит также отметить, что КД-спектры  $tC^O$ -содержащих ДНК-дуплексов демонстрировали характерный профиль В-формы и не обнаруживали существенных отличий от немодифицированных ДНК-дуплексов. Во всех случаях наблюдались положительная полоса с максимумом при 280 нм и отрицательная полоса при 250 нм.



**Рисунок 1.1.2.** Влияние фланкирующих нуклеиновых оснований на стабилизирующую способность  $tC^O$  в дуплексном контексте (А) и квантовый выход флуоресценции  $tC^O$  в одноцепочечных ОДН и ДНК-дуплексах (Б).

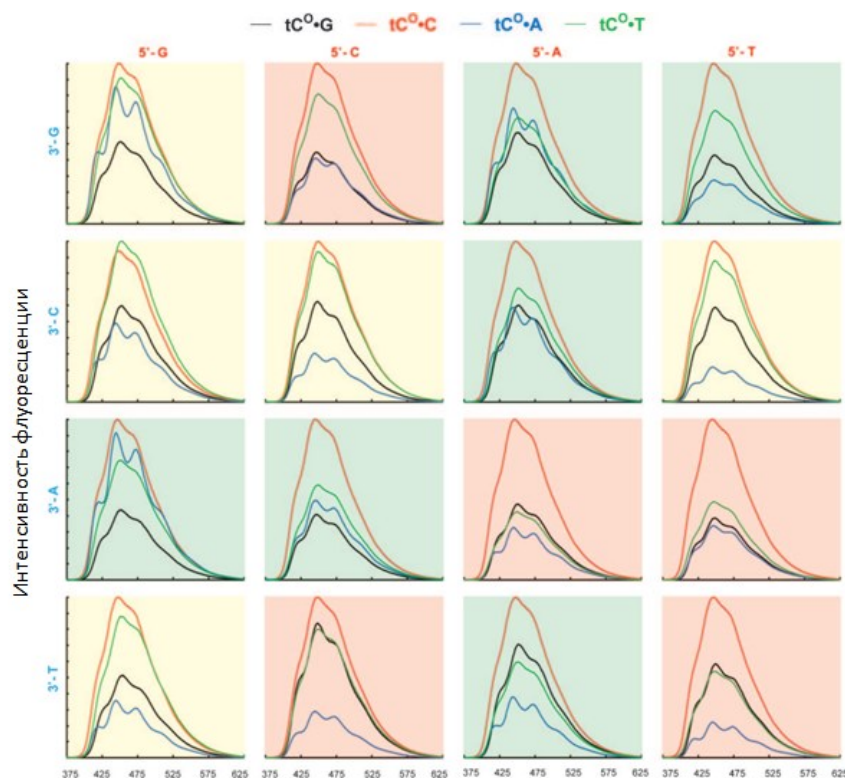
Поскольку модификация обладала флуоресценцией, были детально исследованы ее спектральные свойства [6]. Полоса низкоэнергетического поглощения нуклеозида  $tC^O$  сосредоточена в районе 360 нм ( $\epsilon = 9000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), а максимум эмиссии находится при 465 нм. Квантовый выход флуоресценции  $\Phi^F$  и время жизни  $\tau$  в водном буфере при pH 7,5 составляли 0,30 и 3,4 нс соответственно. Ни спектр поглощения, ни спектр эмиссии не

проявляли существенных изменений в диапазоне pH от 5 до 9 и при концентрации  $\text{Na}^+$  от 50 мМ до 1 М. При этом интенсивность излучения линейно снижалась примерно на 30% при повышении температуры от 10 до 90°C.

На **Рисунке 1.1.2Б** приведены квантовые выходы флуоресценции  $\Phi^F$  для  $\text{tC}^{\text{O}}$  в составе одноцепочечных и двухцепочечных ДНК-фрагментов. Квантовый выход флуоресценции последовательностей с 5'-G (GXG, GXA, GXT и GXC) составлял примерно половину ( $\Phi^F = 0,15$ ) от величины  $\Phi^F$  нуклеозида ( $\Phi^F = 0,30$ ) и других последовательностей ( $\Phi^F = 0,29\text{--}0,41$ ). Все остальные одноцепочечные варианты имели более высокие квантовые выходы флуоресценции, и варианты с 3'-фланкирующим гуанином были самыми яркими. Квантовые выходы флуоресценции в дуплексном контексте демонстрировали значительно меньшую зависимость от фланкирующих оснований по сравнению с одноцепочечными вариантами и находились в диапазоне  $0,22 \pm 0,05$  для всех последовательностей.

Также было исследовано влияние фланкирующей последовательности на способность  $\text{tC}^{\text{O}}$  обнаруживать однонуклеотидные замены на основе сравнения площадей под кривыми эмиссии 64 возможных комбинаций (16 полностью комплементарных дуплексов с  $\text{tC}^{\text{O}}$ -G парой и 48 дуплексов с однонуклеотидной заменой на C, A или T напротив модификации) [7]. Максимальная интенсивность излучения наблюдалась для дуплексов с  $\text{tC}^{\text{O}}$ -C парой оснований. Характеристичная кривая с тремя пиками в случае  $\text{tC}^{\text{O}}$ -A позволяла провести ее однозначную идентификацию. Как результат,  $\text{tC}^{\text{O}}$  была способна отличать однонуклеотидные замены от гуанина в 11 из 16 фланкирующих последовательностей и позволяла идентифицировать конкретную однонуклеотидную замену в 6 вариантах окружения  $\text{tC}^{\text{O}}$  (**Рисунок 1.1.3**).

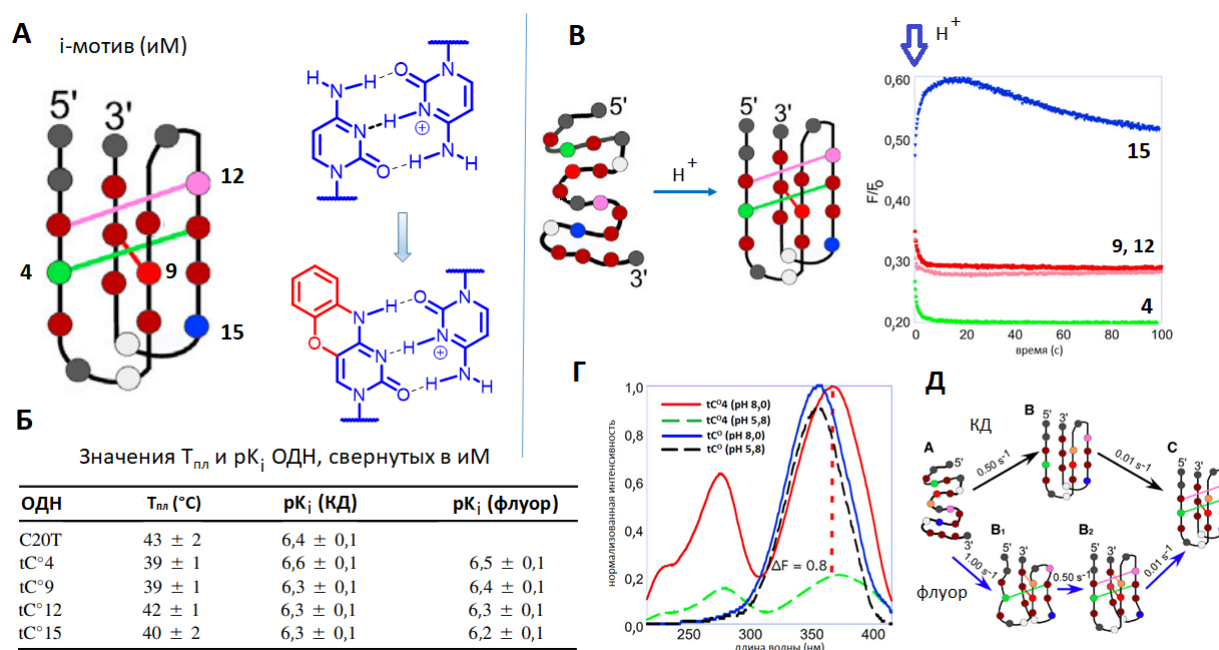




**Рисунок 1.1.3.** Относительная интенсивность эмиссии 64  $tC^0$ -содержащих дуплексов. Нуклеотиды, фланкирующие 5'- и 3'-сторону  $tC^0$ , выделены красным и синим цветом соответственно. Контекст, который позволяет легко различить всех партнеров по спариванию оснований, имеет зеленый фон, тогда как последовательности, которые позволяют идентифицировать только наличие однонуклеотидной замены или комплементарного партнера, имеют желтый фон. Последовательности, в которых  $tC^0$  не способна распознать спаренный вариант, имеют красный фон. Каждую панель нормировали отдельно, принимая интенсивность эмиссии наиболее флуоресцентного дуплекса как 1,0. Зеленый фон использовался, если разница в площади под кривыми эмиссии превышала 15 % для всех дуплексов, за исключением случаев, когда можно использовать кривую эмиссии с тремя пиками, характерную для дуплексов, содержащих  $tC^0$ -A пару. Желтый фон соответствовал вариантам, для которых разница в площади под скорректированными кривыми эмиссии дуплексов с  $tC^0$ -C или  $tC^0$ -T парой не превышала 15%. Панели выделены красным, если площадь под кривой эмиссии для любого дуплекса с однонуклеотидной заменой не превышала 15 % от таковой для  $tC^0$ -G дуплекса, за исключением фланкирующих последовательностей, где можно использовать характерную кривую испускания с тремя пиками дуплексов с однонуклеотидной заменой на А, чтобы отличить его от полностью комплементарного дуплекса [7]. *Адаптировано из [7].*

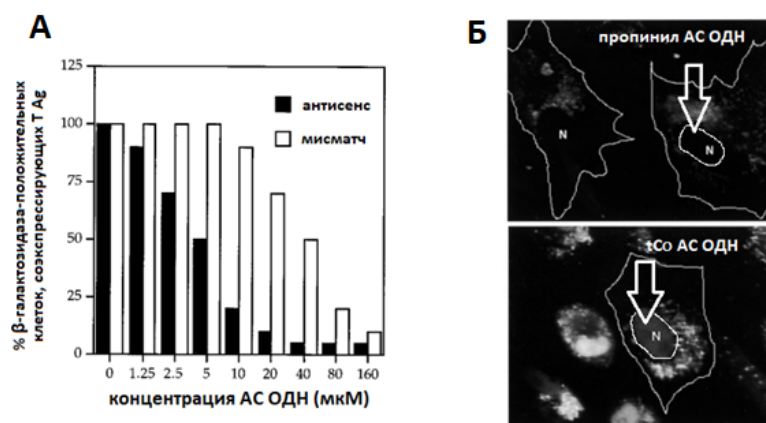
Феноксазиновая модификация была опробована в качестве флуоресцентного миметика цитозина для изучения локальных структурных изменений при сворачивании иМ

[8]. Сохранение цитозиновой Уотсон-Криковской грани и соответствующего ему паттерна образования водородных связей (**Рисунок 1.1.4А**), вместе с минимальным влиянием на стабильность и  $pH_{1/2}$  ( $pH$  перехода, при котором последовательность свернута в иМ на 50%) иМ (**Рисунок 1.1.4Б**) и наличием зависящих от окружения флуоресцентных свойств (**Рисунок 1.1.4В и Г**), позволило изучить механизм сворачивания иМ при индивидуальных заменах  $C \rightarrow tC^O$  (**Рисунок 1.1.4Д**). Действительно, метод остановленного потока с регистрацией изменения интенсивности флуоресценции (ИФ), в отличие от экспериментов с регистрацией КД-спектров, выявил поэтапную вовлеченность модифицированных остатков в образование С-трэка (первоначальное образование гемипротонированных пар в центральной части и со стороны первой и третьей петель, с последующим образованием терминальной пары со стороны 5' и 3'-концов и второй петли).



**Рисунок 1.1.4.** Феноксазиновая модификация  $tC^O$  с чувствительными к окружению флуоресцентными свойствами, минимально влияющая на стабильность и структуру иМ. (А) модельный иМ C20T и паттерны образования гемипротонированных пар  $C-C^+$  и  $tC^O-C^+$ ; (Б) таблица с  $T_{пл}$  и  $pH_{1/2}$  немеченного ОДН и его  $tC^O$ -содержащих аналогов; (В) общая схема перехода  $oc \rightarrow iM$  и кривые изменения интенсивности флуоресценции после подкисления среды; (Г) спектры флуоресценции ОДН с  $tC^O$  остатком в 4 положении и  $tC^O$ -нуклеотида, зарегистрированные до ( $pH$  8,0; красный и синий, соответственно) и после ( $pH$  5,8; пунктирный зеленый и пунктирный черный соответственно) скачка  $pH$ ; (Д) механизм сворачивания C20T иМ на основе КД (сверху, черные стрелки) и данных по тушению флуоресценции (снизу, синие стрелки) (Д). *Адаптировано из [8].*

Антисмысловые ОДН (АС ОДН), содержащие фосфоротиоатные связи и  $tC^O$  вместо С, были проверены на способность подавлять экспрессию большого Т-антигена (Tag) полиомовируса SV40 [9]. Включение четырех остатков  $tC^O$  в ранее оптимизированный АС ОДН повысило аффинность связывания *in vitro* с РНК-мишенью и эффективность расщепления гетеродуплекса РНКазой Н по сравнению с контролем. Лидерный АС ОДН проявил дозозависимую, специфичную для последовательности и избирательную по отношению к мишени антисмысловую активность после микроинъекции в клетки (**Рисунок 1.1.5А**). Инкубирование АС ОДН с CV-1 клетками (фибробласты почки обезьяны) в отсутствие трансфицирующих агентов привело к проникновению его в клетки и накоплению в ядре с последующим проявлением антисмысловой активности (**Рисунок 1.1.5Б**). Еще одним полезным свойством  $tC^O$  для разработки АС ОДН является его способность защищать ОДН с природными фосфодиэфирными связями от расщепления 3'-экзонуклеазами [10].

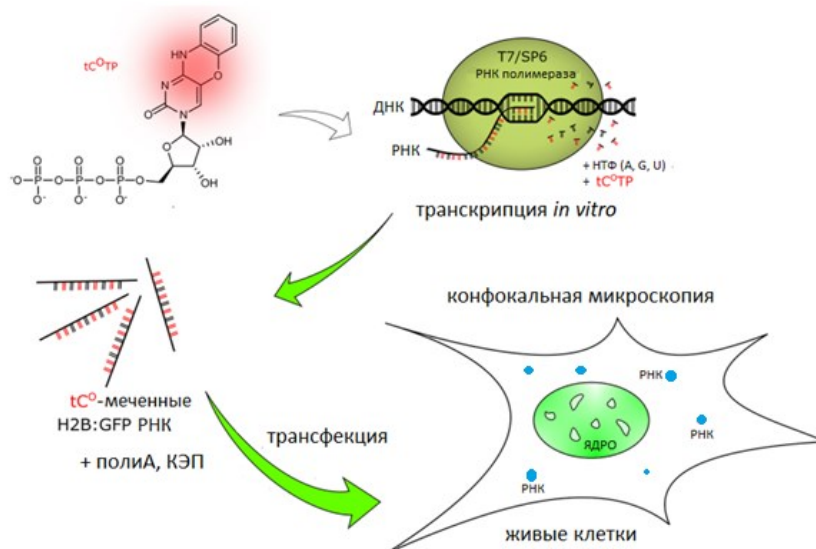


**Рисунок 1.1.5.** АС ОДН с четырьмя остатками  $tC^O$  демонстрирует специфичную по последовательности антисмысловую активность, самопроизвольное проникновение в клетки и накопление в ядре. (А) Ингибирование экспрессии Tag, нормированной на экспрессию  $\beta$ -галактозидазы, в зависимости от концентрации АС ОДН и контрольного ОДН с однонуклеотидной заменой в клетках CV-1. (В) Проникновение в клетки пропинил- и  $tC^O$ -модифицированных АС ОДН, меченных флуоресцеином, оцененное с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии. *Адаптировано из [9].*

Сохранение схемы образования водородных связей цитозина и минимальное нарушение структуры и физико-химических свойств нуклеиновых кислот сделало  $tC^O$  перспективным кандидатом для оценки его в качестве субстрата ДНК полимераз. С этой целью, был синтезирован 5'-трифосфат  $tC^O$  ( $tC^O$ ppp) и изучено его включение фрагментом Кленова ДНК полимеразы I [11]. Данный трифосфат встраивается с несколько более высокой эффективностью напротив гуанина, чем дЦТФ, но, в отличие от последнего, также

способен встраиваться напротив аденина. Трифосфат связывается с наномолярным сродством в активном центре ДНК-полимеразы, как установлено измерением анизотропии флуоресценции. Последний метод также показал применимость  $tC^O$ ppp для определения константы диссоциации природного или неприродного нуклеотида в экспериментах с конкурентным связыванием.

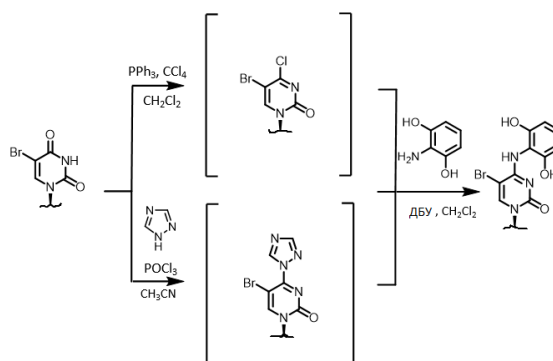
Использование 5'-трифосфата рибонуклеозида  $tC^O$  ( $rtC^O$ ppp) позволило разработать метод скрытого мечения РНК, который может эффективно и с высокой точностью генерировать РНК-транскрипты посредством ферментативного включения  $rtC^O$ ppp T7 РНК-полимеразой в бесклеточной системе [12] (**Рисунок 1.1.6**). Полная замена остатков  $rC$  на  $rtC^O$  до 100% в мРНК размером 1200 н.о., кодирующей гистон H2B, слитый с GFP (H2B:GFP), не влияет на эффективность ее трансляции и позволяет получить слитый белок H2B:GFP в клетках человека. Более того, флуоресценция транскриптов и продуктов трансляции обеспечивает их прямую и одновременную визуализацию в живых клетках.



**Рисунок 1.1.6.** Схематическое изображение скрытого мечения для одновременной визуализации флуоресцентного РНК-транскрипта и синтезируемого флуоресцентно-меченного белка: бесклеточная транскрипция мРНК *H2B:GFP*, кэпирование и полиаденилирование с последующими трансфекцией и визуализацией живых клеток по флуоресценции GFP (продукт трансляции) и  $tC^O$  (мРНК) в зеленом и синем каналах соответственно. *Адаптировано из [12].*

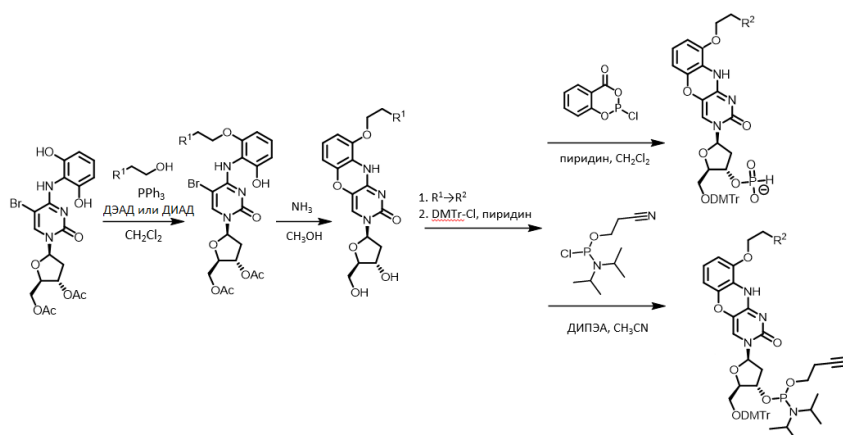
С целью дальнейшего повышения термической стабильности дуплексов Лин и Маттуччи предложили ввести протонированную 2-аминоэтокси группу в 8 положение феноксазиновой системы  $tC^O$ , что обеспечило бы образование дополнительной водородной связи с Об атомом комплементарного гуанина (**Рисунок 1.1.1**). Аналогично  $tC^O$ , синтез

гетероциклической системы начинался с активации С4 атома урацильного кольца через хлор-замещенное (верхняя ветвь, реакция Аппеля) [5,13,14] или триазольное производное (нижняя ветвь) [15] (**Схема 1.1.3**). Затем, полученное активированное производное обрабатывают 2-аминорезорцином в присутствии ДБУ, получая производное цитозина, замещенное по N4 атому остатком резорцина.



**Схема 1.1.3.** Синтетические пути для введения остатка резорцина по N4 атому цитозина.

Для введения по одному из гидроксильных резорцинового фрагмента аминоэтильной группы использовали 2-аминоэтанол ( $R^1CH_2CH_2OH$ ), несущий временную N-карбоксибензоильную защитную группу (CBz). Введение осуществляли в условиях реакции Мицунобу ( $PPh_3$ , ДЭАД или ДИАД), в которой роль спиртовой компоненты выполнял N-защищенный 2-аминоэтанол, а роль кислой компоненты – цитозиновое производное, содержащее кислый фенольный гидроксил в резорциновом кольце (**Схема 1.1.4**). Далее проводили одновременную циклизацию трициклической системы и удаление ацетильных защитных групп с гидроксильных обработкой насыщенным раствором аммиака в метаноле в течение 3 дней при комнатной температуре. Замену ( $R^1 \rightarrow R^2$ ) CBz на флуоренилметоксикарбонильную (FMOC) [5,13] или трифторацетильную [14] защитную группу проводили удалением CBz каталитическим гидрированием и обработкой высвободившегося амина FMOC-NHS или этилтрифторацетатом соответственно в присутствии ДМАП. Стандартное 5'-O-диметокситриптирование и фосфитилирование или фосфорамидирование давали требуемый *H*-фосфонат [13] или фосфорамидит [5,13] соответственно для твердофазного синтеза ОДН.



**Схема 1.1.4.** Синтез *H*-фосфоната и фосфорамидита G-clamp нуклеозида.

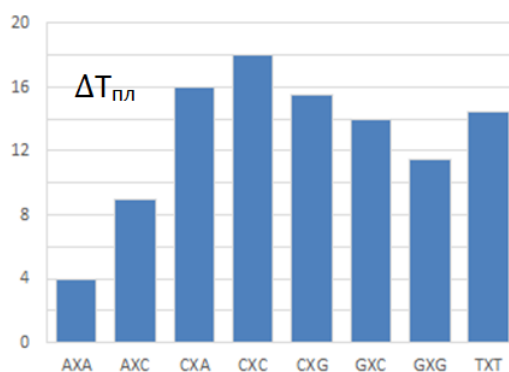
Специфическое взаимодействие с Хугстиновской гранью комплементарного гуанина приводило к повышению термической стабильности образующегося дуплекса. По сравнению с 5-метилцитозином G-clamp значительно повышал термическую стабильность содержащего его дуплекса ( $\Delta T_{пл} +18$  °C) и обладал большей способностью различать комплементарный гуанин и однонуклеотидные замены (А, Т и С) (Таблица 1.1.1).

Стабилизирующие свойства G-clamp зависят от контекста (Рисунок 1.1.7) [5]. Наиболее стабилизированные дуплексы ( $\Delta T_{пл}$  15,5–18 °C) содержали G-clamp, фланкированный цитозином на 5'-конце (СХА, СХС и СХG). Напротив, наименьшие эффекты наблюдались с 5'-пурином (АХА, АХС, GХG и GХС), причем 5'-гуанины оказывали значительно больший стабилизирующий эффект ( $\Delta T_{пл}$  11,5-14 °C), чем 5'-аденины ( $\Delta T_{пл}$  4-9 °C). Еще один эффект заключался в том, что для определенного 5'-остатка присутствие цитозина на 3'-стороне от G-clamp было более стабилизирующим, чем присутствие пурина, особенно когда 3'-пурин был аденином (АХС против АХА и СХС против СХА) и гораздо менее стабилизирующим, когда им был гуанин (GХС против GХG и СХС против СХG). Такое поведение, по всей видимости, связано с наличием протонированной аминоэтокси группы G-clamp, поскольку оно не наблюдалось для  $tC^O$ -содержащих дуплексов (Рисунок 1.1.2А), где различия между этими парами триплетов были менее значимыми. Следствием менее стабильных последовательностей с G-clamp, фланкированным 5'-пурином, было то, что присутствие 3'-цитозина лишь частично уравнивало негативное влияние 5'-пурина на аффинность связывания (АХС против АХА и GХС против GХG).

**Таблица 1.1.1.** Сравнение эффективности гибридизации при комплементарном спаривании и при однонуклеотидных заменах с помощью анализа  $T_{пл}$ <sup>a</sup>

| X              | $T_{пл}$ (°C) |             |             |             |
|----------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
|                | Y = G         | A           | T           | C           |
| 5-метилцитозин | 50,5          | 32,0 (18,5) | 30,0 (20,5) | 29,0 (21,5) |
| G-clamp        | 68,5          | 45,5 (23,0) | 41,0 (27,5) | 40,0 (28,5) |

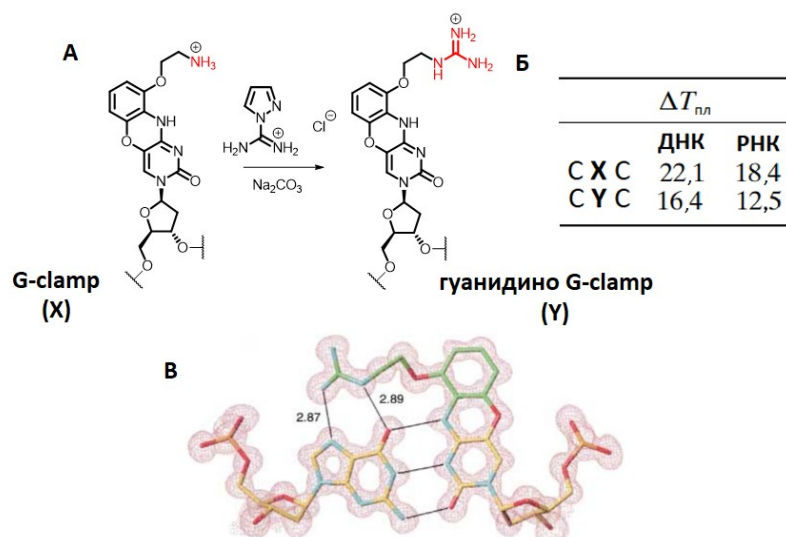
<sup>a</sup>Значения в скобках представляют собой разницу между  $T_{пл}$  дуплекса с комплементарным гуанином и  $T_{пл}$  дуплекса с указанной однонуклеотидной заменой. Исследуемый ОДН: 5'-TCTCXCTCTC-3'. Комплементарный ОДН: 3'-AGAGYGAGAGA<sub>5</sub>-5'.



**Рисунок 1.1.7.** Разница между значениями  $T_{пл}$  дуплексов, содержащих G-clamp и цитозин, в зависимости от фланкирующих оснований. Исследуемый ОДН: 5'-GCANXNTACG-3', X = G-clamp или цитозин, N – одно из четырех природных нуклеиновых оснований.

В попытке разработать аналог G-clamp с большей стабилизирующей способностью был проведен дизайн гуанидино-G-clamp модификации, обеспечивающей еще одну дополнительную водородную связь с N7 атомом Хугстиновской грани гуанина [16]. Модификация вводится постсинтетически обработкой G-clamp-содержащих ОДН гуанидилирующим агентом (гидрохлорид 1Н-пиразол-1-карбоксамидина) в присутствии карбоната натрия [17] (**Рисунок 1.1.8А**).





**Рисунок 1.1.8.** Гуанидино-G-clamp модификация. Условия постсинтетического введения модификации (А), таблица с температурами плавления ДНК/РНК- и ДНК/ДНК-дуплексов (Б) и карта электронной плотности центральной пары гуанидино-G-clamp:G додекамерного дуплекса (В) [16]. (Б,В) адаптированы из [9].

Карта электронной плотности центральной пары гуанидино-G-clamp:G после установления кристаллической структуры декамерного дуплекса действительно свидетельствовала о наличии данной дополнительной водородной связи (**Рисунок 1.1.8В**). Однако изучение термической стабильности дуплексов с РНК-мишенью выявило увеличение  $T_{пл}$  на 16 °С, что несколько ниже, чем  $T_{пл}$ , наблюдаемая для G-clamp (**Рисунок 1.1.8Б**). Меньшие стабилизирующие свойства гуанидино-G-clamp можно объяснить либо возникновением напряжения в структуре спирали, вызванного плоской гуанидиновой группой, либо отсутствием вторичных взаимодействий, наблюдаемых для аминогруппы оригинального G-clamp.

Позднее была продемонстрирована способность 3'-концевого G-clamp защищать ОДН с природными фосфодиэфирными связями от действия 3'-экзонуклеаз (фосфодиэстеразы змеиного яда и селезенки телят) [10].

Превосходные дуплекс-стабилизирующие и дискриминирующие свойства сделали G-clamp перспективным кандидатом для проверки в составе АС ОДН [18]. Одиночная замена цитозина на G-clamp в 15-звенном АС ОДН с фосфоротиоатными межнуклеотидными связями, нацеленном на ингибитор циклинзависимой киназы (p27kip1), увеличивала антисмысловую активность по сравнению с ранее оптимизированным C5-пропинил-модифицированным АС ОДН. При этом, наблюдалось дозозависимое и специфичное по последовательности ингибирование синтеза целевого белка при наномолярных концентрациях АС ОДН. Наличие одной одонуклеотидной

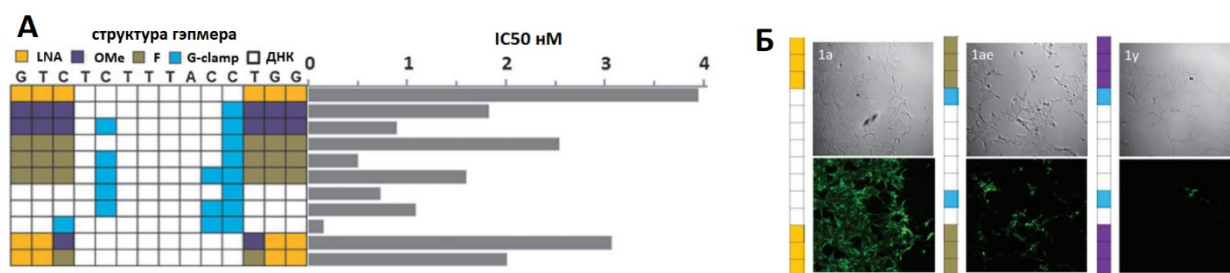


замены в G-clamp-содержащем АС ОДН снижало антисмысловую эффективность в пять раз, а наличие двух замен полностью устраняло активность, что подтверждало специфичность по последовательности. Введение G-clamp повышало эффективность расщепления РНКазой H и обеспечивало повышенную аффинность связывания *in vitro* с РНК-мишенью по сравнению с C5-пропинил-модифицированным вариантом.

Модификация использовалась также в составе 2'-ОМе олигонуклеотидов ОН для стерической блокировки взаимодействия трансактивационного реагирующего элемента (TAR) из длинных концевых повторов ВИЧ-1, имеющего структуру «стебель-петля», и белкового транс-активатора Tat, который регулирует элонгацию транскрипции интегрированного генома ВИЧ [14]. TAR присутствует на 5'-конце всех РНК транскриптов ВИЧ-1. Связывание с TAR РНК существенно усиливается для ОН с единичной G-clamp заменой в центре последовательности. Дважды замещенные 9- или 12-звенные 2'-ОМе анти-TAR ОН демонстрируют удивительно низкие константы связывания ( $K_D < 0,1$  нМ). G-clamp-содержащие ОН обеспечивали 50% ингибирования Tat-зависимой транскрипции в присутствии клеточного лизата при концентрации 25 нМ. Однако, введение одного или двух 2'-ОМе G-clamp остатков в неактивные в клетках 2'-ОМе ОН не придавало ингибирующей активности. Добавление 2'-ОМе G-clamp к 12-мерным химерным ОН, содержащим остатки LNA и 2'-ОМе нуклеотидов, поддерживало, но не усиливало ингибирование Tat-зависимой транскрипции *in vitro* и клеточной транс-активации в клетках HeLa. Таким образом, результаты продемонстрировали, что 2'-ОМе G-clamp обладает способностью улучшать связывание РНК, но эффективность ОН в ингибировании за счет стерического блокирования Tat-зависимой трансактивации как *in vitro*, так и в клетках, определяется факторами, более сложными, чем сродство к РНК-мишени.

Модификация также была опробована в составе гэпмеров [19]. Гэпмеры представляют собой олигонуклеотидные конструкции, содержащие «крылья» из модифицированных нуклеотидных остатков, придающие устойчивость к расщеплению клеточными нуклеазами, и центральную немодифицированную часть, ответственную за активацию РНКазы H. В исследовании использовались клинически релевантная мишень – РНК, кодирующая глюкокортикоидный рецептор, и ранее оптимизированная антисмысловая последовательность. Авторы провели систематическое исследование влияния различных модификаций (LNA, 2'-ОМе, 2'-F, 2'-MOE (метилоксиэтил) и G-clamp) гэпмеров на эффективность синтеза целевого белка. В случае использования трансфектанта G-clamp-модифицированные гэпмеры продемонстрировали повышенную активность (**Рисунок 1.1.9А**), в то время как неассистируемая доставка без использования трансфектанта привела к значительному снижению их активности. Исследование

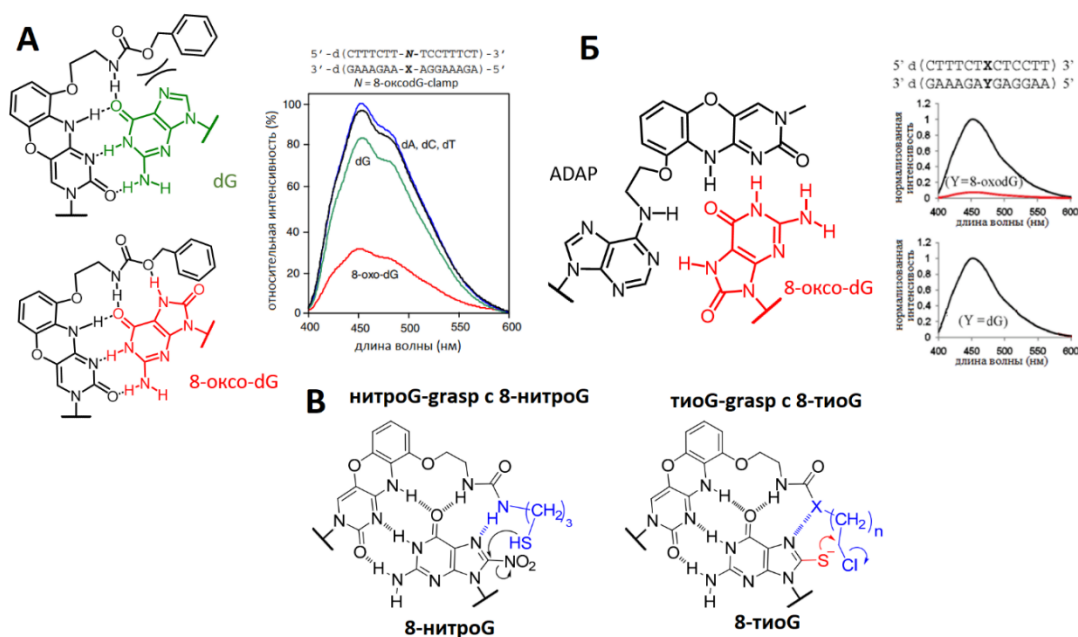
накопления флуоресцентно-меченных G-clamp-модифицированных гёпмеров в клетках с помощью конфокальной микроскопии выявило их плохое проникновение по сравнению с контролем, что может объяснить наблюдаемое понижение активности (**Рисунок 1.1.9Б**). Наконец, данные, полученные *in vivo*, коррелируют с результатами неассистированной доставки и свидетельствуют о проблемах с накоплением и распределением G-clamp-модифицированных гёпмеров в организме. Значительный прогресс в разработке эффективных агентов для доставки нуклеиновых кислот в целевые органы и ткани может в будущем позволить преодолеть указанную проблему.



**Рисунок 1.1.9.** Полуингибирующая концентрация ( $IC_{50}$ ) для G-clamp-модифицированных и контрольных гёпмеров в клетках НЕРЗВ (клетки человеческой аденокарциномы печени) с использованием трансфекции (А) и конфокальные изображения, демонстрирующие поглощение клетками НЕК293 (клетки почек эмбриона человека) 5'-FAM меченных G-clamp-модифицированных и контрольного гёпмеров в условиях без использования методов трансфекции (Б). *Адаптировано из [19].*

На основе G-clamp остова была разработана модификация 8-оксо-G-clamp (**Рисунок 1.1.10А**) для флуоресцентного обнаружения 7,8-дигидро-8-оксогуанина (8-оксоG) в виде нуклеозида [20–23] и нуклеозидтрифосфата [24,25], а также в составе фрагментов нуклеиновых кислот [26]. При взаимодействии с 8-оксоG наблюдалось специфическое снижение интенсивности флуоресценции. Позднее было изучено влияние включения модификации 8-оксо-G-clamp напротив 8-оксо-dG в дуплексе на скорость удаления повреждения ферментом – оксогуанингликозилазой (OGG1) [27].

В случае 8-оксо-G-clamp узнавание мишени осуществляется при ее анти-ориентации. Используя альтернативное спаривание 8-оксоG в син-конформации с аденином, авторы предложили вторую флуоресцентную феноксазин-содержащую модификацию Adar и оценили ее способность отличать повреждение от гуанина и других нуклеиновых оснований по специфическому тушению флуоресценции в составе ДНК и РНК дуплексов (**Рисунок 1.1.10Б**) [28–30]. Наконец, те же авторы предложили производные G-clamp для ковалентного связывания 8-нитро- и 8-тиогуанина [31–33] (**Рисунок 1.1.10В**).

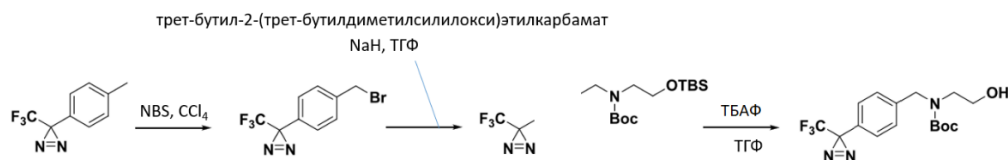


**Рисунок 1.1.10.** Аналоги модификации G-clamp для флуоресцентного обнаружения различных повреждений нуклеиновых кислот: специфическое взаимодействие 8-оксо-G-clamp с 8-оксо-dG в анти-конформации и графики кривых интенсивности флуоресценции модификации с различными основаниями напротив (А); изображение пары Adar с 8-оксо-dG в син конформации и графики кривых интенсивности флуоресценции модификации при спаривании с 8-оксо-dG и dG (Б); схематическое изображение реакции ковалентной сшивки нитроG-grasp (слева) и тиюG-grasp (справа) с соответствующими повреждениями (В). *Адаптировано из [26,28,31,32].*

На основе остова G-clamp была также разработана модификация ARAGON микроРНК для обнаружения внутриклеточных мРНК-мишеней [34]. Модификация содержит три структурных блока, остов G-clamp, улучшающий взаимодействия микроРНК с мРНК-мишенью, особенно слабые взаимодействия, диазириновый фрагмент, присоединенный по аминоэтоксигруппе G-clamp и обеспечивающий фотосшивку модифицированной микроРНК с мишенью при облучении на длине волны 365 нм, и алкинильную группу по 2'-ОН группе рибозного кольца, позволяющую провести «клик» реакцию с азидосодержащим производным биотина с последующим обогащением сшитой гибридной микроРНК-РНК и идентификацией мишени с помощью ПЦР.

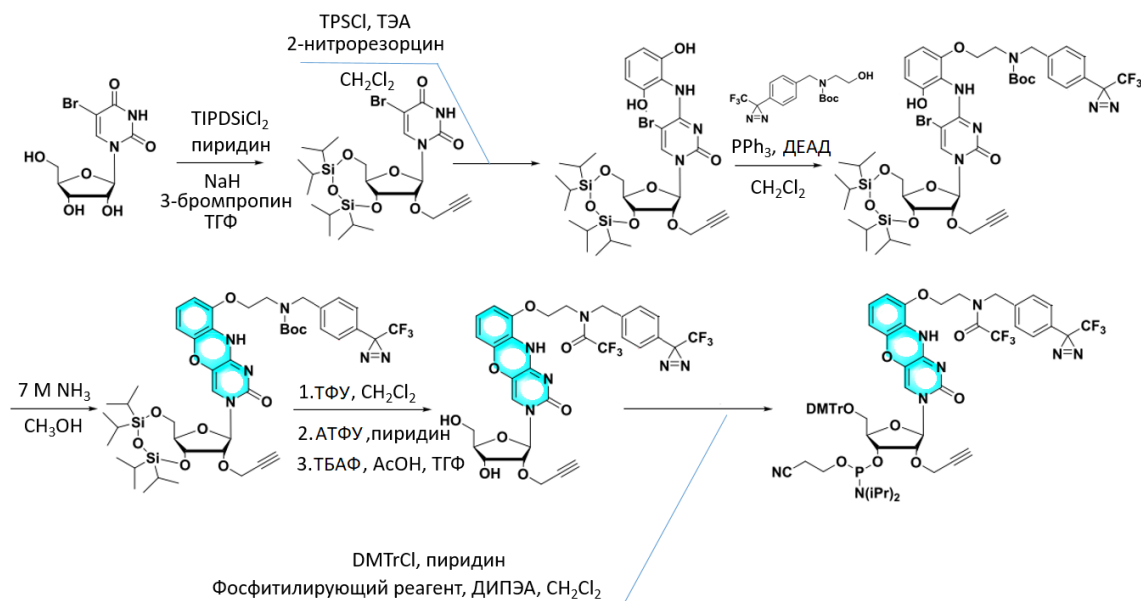
Синтез ARAGON фосфорамидита включал 2 основных этапа. На первом этапе проводили синтез соответствующего защищенного арилдиазирин-содержащего аминоэтанола (Схема 1.1.5). Бромирование ароматической метильной группы бензилдиазирина N-бромсукцинимидом (NBS) приводило к образованию 3-(4-

бромметилфенил)-3-трифторметилдиазирина, который, в свою очередь, использовался в реакции с *трет*-бутил-2-(*трет*-бутилдиметилсилилокси)этилкарбаматом в основных условиях. Удаление *трет*-бутилдиметилсилильной (TBS) защитной группы обработкой ТБАФ приводила к целевому арилдiazирину.



**Схема 1.1.5.** Синтез защищенного арилдiazирин-содержащего аминоэтанола.

Второй этап представлял собой синтез целевого фосфорамидита (**Схема 1.1.6**). На первой стадии проводили селективную защиту 3',5'-диольной группы 5-бромуридина обработкой 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисилоксаном (TIPDSiCl<sub>2</sub>) в пиридине с последующим добавлением пропаргилбромид в основных условиях. Затем, С4 атом урацильного основания активировали с помощью 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорида (TPSCl) в основных условиях и использовали в реакции с 2-аминорезорцином в присутствии 1-метилпиррола. Конденсацию полученного резорцин-содержащего цитидинового производного и арилдiazирин-содержащего аминоэтанола, полученного на первом этапе, проводили в условиях реакции Мицунобу. Циклизацию 1,3-диаза-2-оксофеноксазиновой системы проводили в 7 М растворе аммиака в метаноле. Поэтапное удаление 3',5'-*O*-силильной и трет-бутоксикарбонильной защитных групп с последующей защитой вновь образовавшейся вторичной аминогруппы трифторуксусным ангидридом приводило к получению соответствующего нуклеозидного производного. После двух последующих стадий 5'-*O*-диметокситритилрования и 3'-*O*-фосфитилирования был синтезирован фосфорамидитный мономер ARAGON для твердофазного синтеза ОН.



**Схема 1.1.6.** Синтез фосфорамидита ARAGON. *Адаптировано из [34].*

Схема использования ARAGON-зондов для идентификации мРНК-мишеней представлена на **Рисунке 1.1.11**. После дизайна и синтеза соответствующего двухцепочечного зонда проводят его трансфекцию в клетки. Затем, осуществляют фотосшивание зонда и мРНК при облучении светом с длиной волны 365 нм. Далее проводят экстракцию суммарной РНК, конъюгацию с азидо- и биотин-содержащей молекулой и обогащение целевыми РНК на колонке со стрептавидиновыми шариками. Анализ с помощью ОТ-ПЦР позволяет выявить мРНК-мишени.



**Рисунок 1.1.11.** Схема использования ARAGON-зондов для идентификации мРНК-мишеней. *Адаптировано из [34].*

После проверки свойств ARAGON-зондов посредством обогащения известными мишенями miR-106a, miR-21 и miR-101, они были использованы для скрининга ранее неизвестных мишеней различных микроРНК в различных клеточных линиях. Как результат, GAB1, GRB2-ассоциированный связывающий белок 1, был обнаружен в качестве мишени miR-101 в клетках рака легких H1299 и затем было показано, что подавление синтеза GAB1 miR-101 может способствовать апоптозу, указывая на онкогенный механизм GAB1. Таким образом, ARAGON предлагает надежный метод

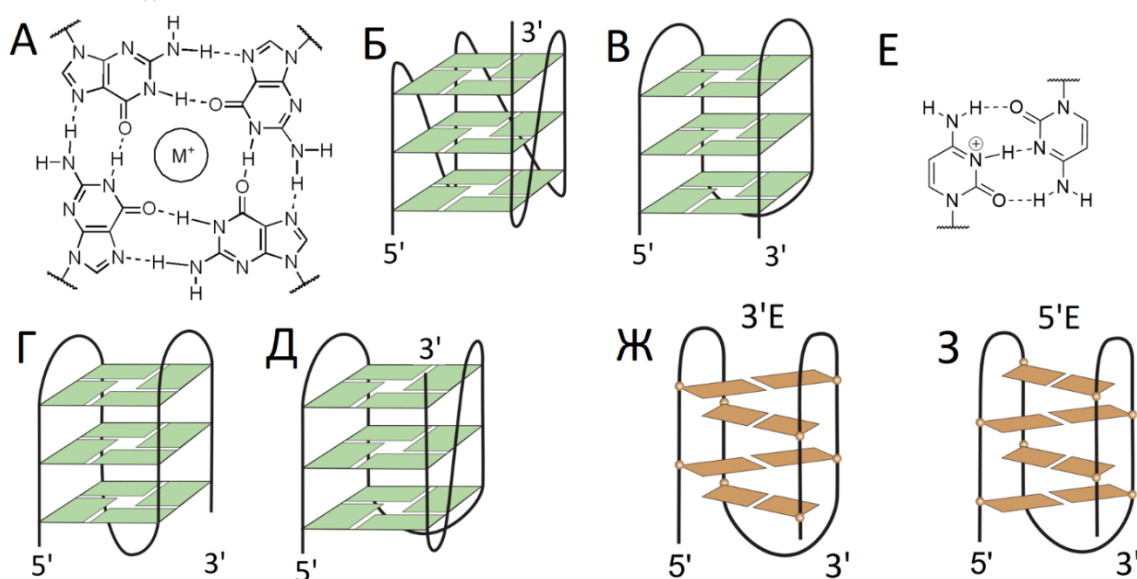
идентификации и исследования неизвестных мишеней микроРНК с физиологическими функциями, тем самым расширяя текущий набор инструментов для профилирования пар микроРНК-мРНК.

В заключение, 1,3-диаза-2-оксофеноксазиновый остов выглядит перспективным для создания на его основе спектральных меток и сшивающих агентов. С его использованием разработаны инструменты изучения структурных перестроек нуклеиновых кислот в кювете и транспорта РНК в живых клетках, а также обнаружения модифицированных нуклеиновых оснований и идентификации мРНК-мишеней микроРНК. Производные проявляют заметную термическую стабилизацию нуклеиновых кислот, увеличивают устойчивость к действию нуклеаз, повышает сродство ОН к мишени и активность РНКазы Н.

## 1.2. Неканонические структуры нуклеиновых кислот

В 1953 году в качестве структуры ДНК была предложена классическая двойная спираль [35]. Однако позже были накоплены сведения о формировании нуклеиновыми кислотами других вторичных структур, которые получили название неканонических. Несмотря на большое разнообразие структур типа шпилька, образованных Уотсон-Криковскими водородными связями, большой интерес для селективного воздействия представляют тетраплексные структуры, к которым относятся G4 и иМ [36].

G4 формируются в богатых гуанином участках ДНК и РНК и представляют собой стопку G-тетрад, удерживаемых вместе  $\pi$ -стэкинговыми взаимодействиями. В свою очередь, G-тетрады образованы четырьмя остатками гуанина, образующими восемь водородных связей своими Уотсон-Криковскими и Хугстиновскими гранями (**Рисунок 1.2.1А**).



**Рисунок 1.2.1.** Схематическое изображение G4 и иМ: (А) структура G-тетрады; (Б) параллельный G4; (В) антипараллельный G4 с конформацией кресла; (Г) антипараллельный G4 с конформацией корзины; (Д) гибридный (3 + 1) G4; (Е) гемипротонированная C-C<sup>+</sup> пара и 3'E (Ж) и 5'E (З) конформеры иМ.

В зависимости от ориентации цепей и типа петель выделяют несколько топологий G4. В параллельных G4 все цепи находятся в одинаковой ориентации и соединены петлями пропеллерного типа (**Рисунок 1.2.1Б**). В антипараллельных G4 две цепи направлены антипараллельно: при антипараллельно направленных соседних цепях образуется G4 типа кресло с тремя латеральными петлями (**Рисунок 1.2.1В**) или G4 типа корзина с одной диагональной и двумя пропеллерными латеральными петлями (**Рисунок 1.2.1Г**). В случае если в G4 только одна из четырех цепей направлена антипараллельно, образуется

гибридный (3+1) G4 с одной латеральной и двумя пропеллерными петлями (**Рисунок 1.2.1Д**).

Важную роль в стабилизации G4 играют моновалентные катионы. Так ионы калия ( $K^+$ ) стабилизируют G4, локализуясь между G-тетрадами и октаэдрически координируя атомы O6 гуанинов. Ионы натрия ( $Na^+$ ) способны стабилизировать G4 в меньшей степени, координируя только четыре атома O6, находясь в центре каждой G-тетрады. Стабилизирующие свойства также продемонстрированы ионами  $Rb^+$  [37],  $Pb^{2+}$  [38],  $Ba^{2+}$  [39] и  $Sr^{3+}$  [40].

иМ образуются в богатых цитозином участках ДНК и представляют собой два интеркалированных дуплекса, образованных гемипротонированными  $C-C^+$  парами (**Рисунок 1.2.1Е**). В отличие от G4, данные структуры реализуются только в ДНК, поскольку наличие дополнительных 2'-гидроксильных групп в РНК приводит к стерическому отталкиванию остатков рибозы в интеркалированном дуплексе и, как следствие, очень низкой термической стабильности иМ. Выделяют две топологии иМ на основании положения концевой  $C-C^+$  пары, на 3'- или 5'-конце - 3'Е и 5'Е соответственно (**Рисунок 1.2.1Ж и 3**). На стабильность данных структур влияет несколько факторов. Прежде всего, так как для формирования иМ необходимо частичное протонирование остатков цитозина, то большинство данных структур наиболее стабильны при слабокислом pH, что долгое время оставляло под вопросом их сборку при физиологических значениях pH. Другим фактором, регулирующим стабильность, являются длина и состав петель, а также длина C-тракта [41–43]. Было показано, что некоторые иМ стабильны при физиологическом pH [44], и метилирование цитозинов также может способствовать их стабилизации [45]. Кроме того, стабильность иМ повышается в условиях фазового исключения (молекулярного краудинга) и негативного суперскручивания, наблюдаемого при транскрипции. Таким образом, современные представления свидетельствуют о возможности образование иМ при физиологическом pH. Конфокальная микроскопия с использованием флуоресцентно-меченых иМ-специфичных антител iMab и *in cell* (внутриклеточные) ЯМР-эксперименты подтверждают возможность формирования иМ в живых клетках [46], хотя и в меньших количествах, чем предполагалось ранее [47].

Таким образом, G4 и иМ являются биологически релевантными неканоническими структурами нуклеиновых кислот и далее будут рассмотрены наиболее популярные мишени на их основе.

G4 могут формироваться в теломерах - концевых участках хромосом, состоящих из 5-10000 tandemных повторов, которые предотвращают потерю генетической информации



из-за недорепликации. Взаимодействие с шелтерином и специфическая вторичная структура защищают теломеры от распознавания в качестве двухцепочечных разрывов и слияния с другими хромосомами [48]. В связи с необходимостью праймера для синтеза ДНК-полимеразой ДНК-копии, теломеры укорачиваются с каждым клеточным делением, и пролиферация соматических клеток останавливается после достижения теломерами определенной длины, соответствующей лимиту Хейфлика [49,50]. Однако в стволовых и эмбриональных, а также ряде опухолевых клеток, существуют механизмы обхода этого ограничения. Одним из них является использование теломеразы, обратной транскриптазы, способной удлинять 3'-концы ДНК в теломерных участках и, таким образом, обеспечивать неограниченное число клеточных делений и иммортализацию клеток. Данный фермент, активный только в опухолевых, стволовых и эмбриональных клетках, представляет собой перспективную мишень для противоопухолевой терапии.

В клетках позвоночных теломеры содержат tandemный повтор (TTAGGG)<sub>n</sub>, который образует дуплекс с комплементарной цепью (CCCTAA)<sub>n</sub>. Однако 3'-конец теломер состоит из 15–200 неспаренных оснований, способных образовывать внутримолекулярный G4 [51]. В зависимости от условий, в том числе концентрации K<sup>+</sup> и Na<sup>+</sup> и фазового исключения (молекулярного краудинга), повторы могут формировать G4 параллельной, антипараллельной и гибридной топологии. ЯМР-эксперименты с привлечением молекулярно-динамических расчетов показали, что 22-мерная последовательность d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>] образует G4 с топологией антипараллельного типа в присутствии Na<sup>+</sup> [52]. В свою очередь, рентгеноструктурный анализ обнаружил для этой же последовательности топологию параллельного типа в присутствии K<sup>+</sup> [53]. Теломерный G4 в растворе, содержащем K<sup>+</sup>, имеет гибридную топологию, отличную от топологии в кристалле. Для ЯМР-исследований использовались модифицированная последовательность d[TAGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>A] с добавлением аденина на 3'-конец немодифицированной последовательности [54], последовательность d[AAAGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>AA] [55] и последовательность d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>], содержащая четыре или пять остатков 8-бромгуанина [56]. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что теломерная последовательность принимает топологию гибридной формы в растворе, содержащем K<sup>+</sup>. В свою очередь, d[TAGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>TT] с заменой 15-го гуанина на 8-бромгуанин в растворе, содержащем K<sup>+</sup>, образует топологию иной гибридной формы [57,58].

Существует несколько белков, которые связываются с теломерными G4 и расплетают их, поддерживая длину и целостность теломер. В частности, субъединица шелтерина - POT1 связывается с 3'-выступом теломерных повторов и регулирует, вместе с

субъединицей TPP1, расплетение G4. Первоначально было показано, что связывание POT1–G4 является селективным для антипараллельных G4 [59]. Однако позднее было установлено, что POT1 связывается и расплетает теломерные G4 любой топологии без какого-либо взаимодействия с дуплексной ДНК или с другими G4 [60]. Способность расплетать теломерные G4 также зафиксирована у репликационного белка A (RPA), который является наиболее распространенным одноцепочечным ДНК-связывающим белком в клетках человека [61]. Однако доступ белка RPA к теломерной ДНК блокируется присутствием комплексов POT1–TPP1 [59]. Другой комплекс ассоциированных с теломерами белков, называемый CST (CTC1–STN1–TEN1), расплетает теломерные G4 быстрее, чем POT1 [62]. Фактор связывания теломерных повторов 2 (TRF2) ассоциируется как с теломерными G4 [63], так и с экстрателомерными G4 из промотора гена PCGF3 [64]. Кроме того, хеликазы WRN (АТФ-зависимая хеликаза, ассоциированная с синдромом Вернера) и BLM (белок синдрома Блума) семейства RecQ расплетают теломерные G4 для поддержания целостности теломер [65]. Анализы *in vitro* показали, что белок DNA2 с хеликазной/нуклеазной активностью распознает и разрушает теломерные G4 посредством расщепления последовательности, образующей G4 [66]. Кроме того, хеликаза - регулятор удлинения теломер 1 (RTEL1) расплетает межмолекулярные G4, образованные человеческой теломерной последовательностью [67]. Онкогенный белок слияния TLS/FUS связывается с теломерными G4 и контролирует модификацию гистонов и длину теломер [68]. Более того, гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (hnRNPA1) участвует в разрешении G4 на конце теломер, стимулируя их удлинение [69]. Интересно, что UP1, который является протеолитическим продуктом расщепления hnRNPA1, сохраняет свою способность расплетать G4 [70]. Наконец, важно отметить, что обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT) сама по себе расплетает G4, обеспечивая правильную репликацию теломер [71].

Наличие большого количества белков, регулирующих стабильность теломерных G4, говорит о важности клеточных процессов, регулируемых данными G4, и перспективности данной мишени для нацеливания G4-лигандами. Действительно, стабилизация G4-лигандами подавляет удлинение теломер, катализируемое теломеразой и, учитывая, что альтернативный путь удлинения теломер активируется только примерно в 15% случаев онкологических заболеваний, G4-лиганды оказывают выраженное цитотоксическое действие на большинство типов опухолевых клеток.

Помимо теломер, G4-структуры локализуются преимущественно в промоторных областях генов по сравнению со средним распределением по геному. Это подтверждается результатами биоинформатического анализа, направленного на поиск мотивов, способных

формировать G4, а также данными по G4-селективной иммунопреципитации хроматина (G4 ChIP-Seq), которые демонстрируют преобладание G4 в регуляторных элементах, связанных с открытыми участками хроматина, такими как промоторные и энхансерные области [72]. В частности, G4 были обнаружены в регуляторных участках генов, вовлеченных в канцерогенез, таких как *KRAS*, *NRAS*, *c-Myc*, *c-Kit*, *VEGF*, *VEGF-R*, *mTOR*, *HIF1a* и *RET* [73]. G4 могут оказывать как активирующее, так и ингибирующее влияние на транскрипцию, регулируя ее посредством изменения доступности сайтов связывания транскрипционных факторов или создавая стерические препятствия для продвижения РНК-полимеразы. Кроме того, недавно были обнаружены G4-образующие последовательности в некодирующих РНК [74], в нетранслируемых областях (НТО) некоторых мРНК [75] и в последовательностях митохондриальной [76] и рибосомальной ДНК [77,78].

Ген *c-Kit* кодирует трансмембранную рецепторную тирозинкиназу, которая положительно регулирует пролиферацию клеток, и ее повышенная экспрессия ассоциирована с развитием эритролейкемии [79] и стромальной опухоли ЖКТ [80]. Промоторная область гена *c-Kit* содержит три G4-формирующие последовательности: *c-Kit1*, *c-Kit\** (также называют *sp*) и *c-Kit2* [81]. Для установления их структуры использовались соответствующие короткие G-богатые последовательности [82–87]. Соответственно, *c-Kit1* и *c-Kit2* формируют трехполочные G4 параллельной топологии, причем первый обладает довольно необычной организацией петель из-за участие изолированного остатка гуанина в образовании G-тетрады. В свою очередь, *c-Kit\** при физиологической концентрации  $K^+$  образует двухполочный G4 с антипараллельной топологией. *c-Kit\** особенно интересен тем, что представляет собой сайт связывания транскрипционного фактора SP1. Исследование регуляции транскрипции гена тремя G4 выявило их комплексное взаимодействие [88]. При внесении мутаций, препятствующих формированию G4, в последовательность *c-Kit1* эффективность транскрипции повышалась, а в случае внесения мутаций в *c-Kit2* и *c-Kit\** - понижалась, при этом было показано, что *c-Kit1* обладает наибольшим регуляторным потенциалом [88]. Известно, что при воздействии на клетки G4-стабилизирующих соединений эффективность транскрипции гена *c-Kit*, как правило, снижается, что подтверждает преимущественное ингибирующее влияние *c-Kit1* G4 на эффективность транскрипции гена [89].

Ген *c-Myc* кодирует транскрипционный фактор, который регулирует экспрессию около 10-15% всех генов клетки, обеспечивает нормальное протекание клеточного цикла и пролиферацию клеток [90]. Его повышенная экспрессия связана с развитием многих опухолей, в том числе лимфомы Беркитта, рака молочной железы, легких, желудка и толстой кишки [91]. В промоторе P1 гена *c-Myc* обнаружена G-богатая

последовательность, способная формировать несколько альтернативных параллельных G4 с короткими петлями и ингибировать посредством этого экспрессию онкогена [92,93]. С одной стороны, это подтверждается ингибирующим действием G4-стабилизирующих лигандов на экспрессию гена [94]. С другой стороны, нуклеолин также способен связывать и стабилизировать G4 в промоторе гена *c-Myc*, подавляя его транскрипцию [95]. В то же время белок NM23-H2 связывает G4 в расплетенном виде и активирует экспрессию гена *c-Myc* [96].

Ген *Bcl-2* кодирует антиапоптотический фактор митохондриальной мембраны и его повышенная экспрессия характерна при развитии ряда опухолей, включая В-клеточную и Т-клеточную лимфомы, рак предстательной и молочных желез, рак шейки матки, колоректальный рак и немелкоклеточный рак легких [97]. В промоторе P1 данного гена присутствует протяженная G-богатая последовательность с шестью G-трактами. Первоначально предполагалось, что данная последовательность способна образовывать три различных гибридных G4 5'G4, MidG4 и 3'G4, формирующих петельные изомеры, при этом MidG4 считался наиболее стабильным [98,99]. Однако позднее было обнаружено, что наиболее стабильным G4, который способна формировать данная последовательность, является параллельный G4 с 13-нуклеотидной петлей [100]. Стабилизация G4 в промоторе P1 гена *Bcl-2* с помощью низкомолекулярных молекул способствует снижению эффективности транскрипции [101]. Известно, что при стабилизации данных G4 эффективность транскрипции гена снижается [102]. Нуклеолин также способен связывать с *Bcl-2* G4 [103].

G4 также обнаружены в промоторах *STAT*, *k-RAS* и нескольких тысяч других генов, в геномах вирусов и бактерий, однако структура большинства из них исследована недостаточно [73].

Формирование G4 также регулирует транскрипцию на эпигенетическом уровне. Оно ассоциировано с гипометилированием CpG сайтов [104]. G4 через белки-посредники могут привлекать подавляющий транскрипцию комплекс REST-LSD1, который деметилирует гистоны H3K4me1 и H3K4me2, подавляя тем самым транскрипцию hTERT и циклин-зависимого ингибитора киназы 1 [105–107]. G4 могут обеспечивать формирование топологически ассоциированных доменов и взаимодействие удаленных друг от друга энхансеров и промоторов, например, за счет взаимодействия с белками CTCF и Yin Yang 1 (YY1) [108,109]. В куриных клетках DT40 нарушение активности белков, необходимых для репликации последовательностей, образующих G4, или стабилизация G4 низкомолекулярными соединениями приводило к локальным изменениям эпигенетических меток, включая модификации гистонов и метилирование цитозина [110].

Наряду с G4, все большее количество данных свидетельствует о важной регуляторной роли комплементарной G4 структуры – иМ. Многие С-богатые последовательности, способные формировать иМ, эволюционно консервативны и концентрируются вблизи сайтов старта транскрипции [111–113]. В геноме человека данными структурами обогащены промоторы онкогенов [113].

Промотор онкогена *Bcl-2*, негативного регулятора апоптоза, содержит С-богатый фрагмент, способный формировать как шпильку, так и иМ [114,115]. В этом фрагменте локализуется сайт связывания транскрипционного фактора HNRNP LL, который легко распознается ферментом при экспонировании в составе латеральной петли иМ, однако оказывается скрыт при формировании шпильки [115]. Использование лигандов IMC-48 и IMC-76, стабилизирующих иМ и альтернативную шпильку соответственно, позволило регулировать эффективность транскрипции гена *Bcl-2*, в первом случае повышая, а во втором снижая уровень мРНК [114]. Стоит отметить, что как повышение, так и снижение экспрессии данного гена имеет терапевтическое значение. В первом случае снижение экспрессии данного онкогена в опухолевых клетках способствует активации в них апоптоза [116]. Повышение экспрессии гена *Bcl-2* желательно в случае неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП) и неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), характеризующихся гипертрофированным апоптозом гепатоцитов вследствие дефицита данного белка. С помощью низкомолекулярного стабилизатора иМ удалось повысить уровень белка *Bcl-2* и жизнеспособность гепатоцитов, снизив уровень апоптоза как в экспериментах на клеточных линиях, так и в мышинной модели НЖБП [117]. Таким образом, в данном случае иМ является позитивным регулятором транскрипции и перспективной мишенью для создания терапевтических агентов.

Другой перспективной мишенью является иМ в промоторе онкогена *KRAS* [118]. В его промоторе содержится три иМ-формирующие последовательности, средняя из которых одновременно является самой стабильной и содержит сайт связывания транскрипционного фактора HNRNPK. Было показано, что дестабилизация данной структуры малой молекулой нитидином способствует понижению уровня мРНК гена *KRAS* в клетках опухоли поджелудочной железы.

иМ, позитивно регулирующий транскрипцию, также обнаружен в промоторе онкогена *PDGFR $\beta$* , регулятора сигнальных путей роста Ras-MAPK, PI3K и PLC- $\gamma$  и кальциевой регуляции [119,120]. Было показано, что низкомолекулярные дестабилизаторы иМ вызывают снижение его экспрессии в клетках нейробластомы [121].

В промоторе гена *TH*, кодирующего тирозингидроксилазу, важнейший фермент биосинтеза дофамина, эpineфрина и норэpineфрина, также содержится иМ-образующая

последовательность, являющаяся сайтом связывания транскрипционного фактора HNRNPK [122,123]. Было показано, что ТМРyР4 (**Рисунок 1.3.1**), регулятор стабильности иМ, способен снижать уровень транскрипции гена *TH* [124]. Соответственно, данная структура может являться мишенью для создания терапевтических агентов, направленных против ряда неврологических заболеваний, включая болезнь Паркинсона, шизофрению и биполярное аффективное расстройство.

Другим примером позитивного регулятора транскрипции является иМ в промоторе гена *BmPOUM2*, транскрипционного фактора, регулирующего программу образования диска крыла во время метаморфоза у тутового шелкопряда [125]. При его дестабилизации как с помощью внесения мутаций, так и с использованием антисмысловых олигонуклеотидов и низкомолекулярных соединений, наблюдалось снижение уровня экспрессии гена, поскольку иМ является сайтом связывания транскрипционного фактора BmILF.

Однако иМ способны также выступать в роли негативных регуляторов транскрипции. В сайте гиперчувствительности к нуклеазе III (NHE III), который регулирует 90% экспрессии онкогена *c-Мус*, содержится С-богатая последовательность, распознаваемая транскрипционными факторами HNRNPK и NM23-H2 и способная формировать иМ [126,127]. Стабилизация данной структуры низкомолекулярными соединениями снижает эффективность транскрипции и уровень экспрессии белка, что предположительно связано с частичным секвестрированием сайта связывания транскрипционных факторов в осто́ве иМ [128]. При тестировании иМ-стабилизаторов на клетках опухолей шейки матки, легких, кишечника, печени и лимфомы наблюдалось снижение скорости пролиферации и индукция апоптоза. Результаты выглядят многообещающими, поскольку *c-Мус* является нетаргетируемым белком, повышенная экспрессия которого связана с развитием 40% опухолей [129].

С-богатые последовательности, способные формировать иМ, также обнаружены в промоторах онкогенов *VEGF* [130], *BRAF* [131], *c-MYB* [132] и *HRAS* [133], генов белков-онкосупрессоров *DAP* [44,134], *RAD17* [135,136], *Rb* [137] и *SMARCA4* [138], и в промоторе гена ключевого регулятора сборки стресс-гранул *ATXN2L* [139], однако влияние данных структур на экспрессию пока исследовано недостаточно.

иМ могут формироваться в теломерах. Было показано, что однослойные нанотрубки (SWNT) способны стабилизировать теломерный иМ и ингибировать теломеразу [140,141]. Накапливаясь в клеточном ядре, они связываются с большой бороздкой ДНК и вызывают формирование иМ, предположительно, способствуя протонированию цитозинов.

Обработка опухолевых клеток нанотрубками вызывает декэпирование теломер и повреждение ДНК, остановку клеточного цикла и апоптоз.

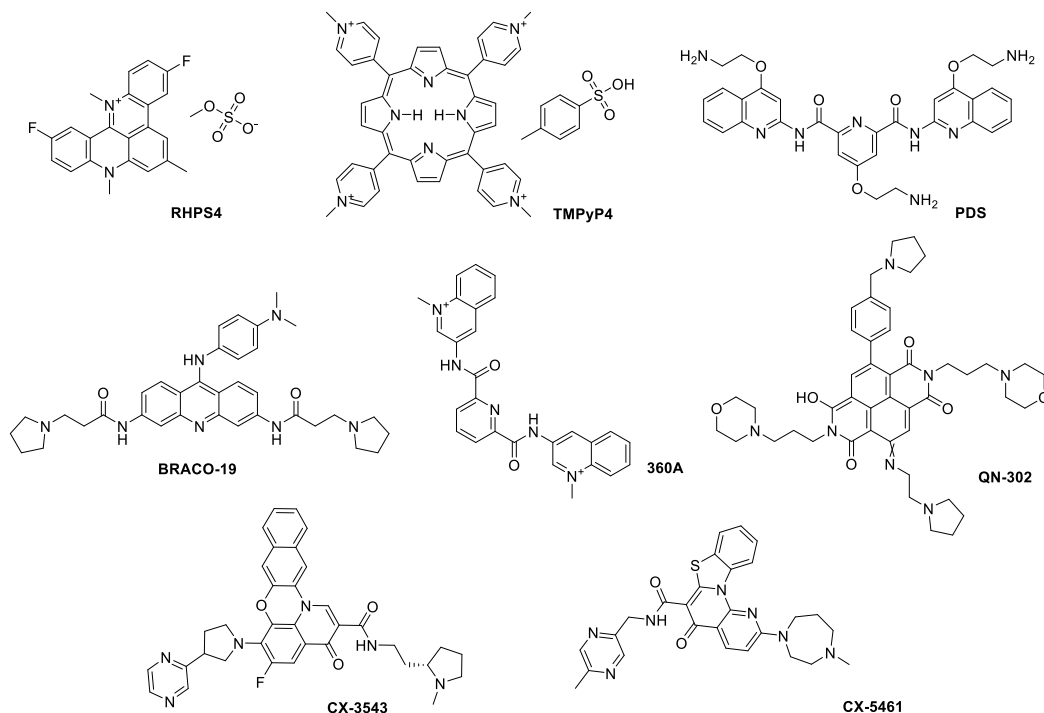
### 1.3. Соединения, взаимодействующие с G4 и иМ

Основой для разработки G4-лигандов послужила идея, что молекулы, стабилизирующие теломерные G4-структуры, способны физически ингибировать активность теломеразы, тем самым нарушая безостановочную пролиферацию раковых клеток [142]. Однако исследования, направленные на оценку влияния G4-лигандов на раковые клетки, продемонстрировали кратковременные противоопухолевые эффекты, не связанные с ингибированием теломеразы. Последний процесс потребовал бы несколько этапов деления клеток, прежде чем спровоцировать их гибель. В данном контексте весьма показательным является пентациклический акридин - метосульфат 3,11-дифтор-6,8,13-триметил-8Н-хино[4,3,2-kl]акридиния (RHPS4) (**Рисунок 1.3.1**), который изначально был предложен в качестве ингибитора теломеразы. Позднее было продемонстрировано, что он также проявляет активность в отношении опухолевых клеток, не экспрессирующих теломеразу [143]. Дальнейшие исследования, направленные на углубленное изучение независимых от активности теломеразы механизмов действия RHPS4, продемонстрировали, что он способствует дисфункции теломер, топологическому стрессу и накоплению повреждений в ДНК, эффектам, определяющим кратковременный противоопухолевый ответ [142].

Противоопухолевый потенциал G4-лигандов также реализуется благодаря их способности влиять на экспрессию (прото)онкогенов за счет стабилизации G4, локализованных в регуляторных элементах этих генов. В этом контексте примечателен катионный порфириновый лиганд TMPyP4 (**Рисунок 1.3.1**), снижающий экспрессию *c-Myc* посредством стабилизации G4 в его промоторе [144]. Позднее было показано, что G4-лиганды, принадлежащие к различным химическим классам, такие как пиридостатин (PDS), 360A, BRACO-19 и CX-5461 (**Рисунок 1.3.1**), также подавляют экспрессию *c-Myc*. RHPS4 подавляет экспрессию рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-R), что способствует нарушению васкуляризации и, следовательно, подавлению роста и распространения опухоли [145], а TMPyP4 нарушает экспрессию mTOR, ключевого регулятора аутофагии [146]. В дополнение, несколько других протоонкогенов, таких как *Bcl-2*, *c-KIT* и *RET*, содержат в промоторах последовательности, образующие параллельные G4 и, таким образом, являются потенциальными мишенями для воздействия G4-лигандов [147].

Следует отметить, что терапевтический потенциал G4-лигандов вышел за рамки регуляции экспрессии генов. Например, CX-5461 способствует синтетической летальности

в опухолях, неспособных к гомологичной рекомбинации [148,149], а PDS деактивирует топоизомеразу II на ДНК [150]. Более того, оба этих лиганда способны, при стабилизации G4, вызывать двухцепочечные разрывы ДНК [151]. В целом данные результаты подчеркивают терапевтическую значимость G4 в области онкологии и обеспечивают стимул для разработки новых и эффективных лигандов. Действительно, за последние 25 лет разработано более 3000 различных G4-лигандов, отличающихся по структуре и биологической активности [152].



**Рисунок 1.3.1.** Структуры некоторых G4-лигандов.

Однако, несмотря на терапевтический потенциал, продемонстрированный некоторыми G4-лигандами, лишь немногие из них дошли до ранней фазы клинических испытаний, и ни один из них пока не был введен в клиническую практику. Примечательно, что ограниченный успех G4-лигандов отчасти объясняется тем фактом, что несмотря на свою эффективность на биохимическом и биофизическом уровнях, они демонстрируют слабую активность и/или селективность при переходе к экспериментам с клетками.

Например, ТМРyР4, первоначально считавшийся G4-лигандом, в последующих экспериментах показал сравнимое сродство к дуплексным и триплексным ДНК-структурам [153]. Кроме того, некоторые G4-стабилизирующие агенты, хотя и продемонстрировали отличную активность в клеточных анализах, позднее проявили низкую эффективность и побочные и/или нецелевые эффекты при переходе на доклинические экспериментальные модели. Типичным примером является RHPS4, который, несмотря на свой выраженный противоопухолевый потенциал, провоцировал серьезные кардиотоксические эффекты при



тестировании на моделях морских свинок [154]. Другим примером является BRACO-19, который, несмотря на демонстрацию хорошей способности ингибировать теломеразу в бесклеточных анализах, плохо проникал в клетки и обладал неоптимальным фармакологическим профилем, что значительно снижало его биодоступность и терапевтическую эффективность [155].

В связи с вышеуказанным, на сегодняшний день только несколько молекул прошли первые этапы клинических испытаний. Среди них CX-3543 (**Рисунок 1.3.1**), также известный как кварфлуксин, является фторхинолоном, изначально разработанным для воздействия на G4, локализованный в промоторе *c-MYC* [156]. Однако CX-3543 также стабилизирует G4, расположенные в рибосомальной ДНК, способствуя ингибированию биогенеза рибосом, что в конечном итоге приводит к общему нарушению транскрипции генов [157]. Несмотря на ряд многообещающих результатов, клинические испытания CX-3543 были остановлены из-за высокой аффинности связывания с альбумином [158]. Другим фторхинолоном с выраженной G4-стабилизирующей активностью является CX-5461 или пиднарулекс. CX-5461 способен распознавать, связывать и стабилизировать широкий набор G4 в геноме, включая G4 в промоторе онкогенов *c-Myc* и *c-Kit* [159]. Кроме того, CX-5461 нарушает синтез рибосомальной РНК, ингибируя связывание преинициаторного комплекса SL1 и комплекса РНК-полимеразы I с рибосомальной ДНК [160]. В связи с результатами доклинических испытаний, показывающих способность CX-5461 вызывать синтетическую летальность в опухолях с дефицитом BRCA, устойчивых к ингибиторам PARP [149,161], он вошел в настоящее время в фазу Ib клинических испытаний (NCT04890613) [149]. Другим многообещающим G4-лигандом является QN-302 (SOP1812) (**Рисунок 1.3.1**), недавно разработанное производное нафталиндиимида (НДИ), характеризующееся наличием 4 фенильных заместителей [162]. QN-302 был разработан для селективного распознавания, связывания и стабилизации параллельных G4, что придает ему специфичность к G4, локализованным вне теломер. Доклинические исследования показали превосходную биодоступность и G4-стабилизирующую активность QN-302, значительно превосходящую другие производные НДИ [162]. Противоопухолевые свойства QN-302 в основном обусловлены его способностью связывать промоторный G4 и ингибировать экспрессию S100P, фактора, играющего ключевую регуляторную роль в пролиферации и подвижности опухолей [163]. Благодаря многообещающим результатам, полученным *in vitro* и *in vivo*, QN-302 быстро вошел в фазу Ia клинической оценки в качестве потенциального терапевтического средства для лечения пациентов с запущенными или метастатическими солидными опухолями, такими как аденокарцинома протоков поджелудочной железы,

саркомы, желудочно-кишечные стромальные опухоли и рак предстательной железы (NCT06086522) [163].

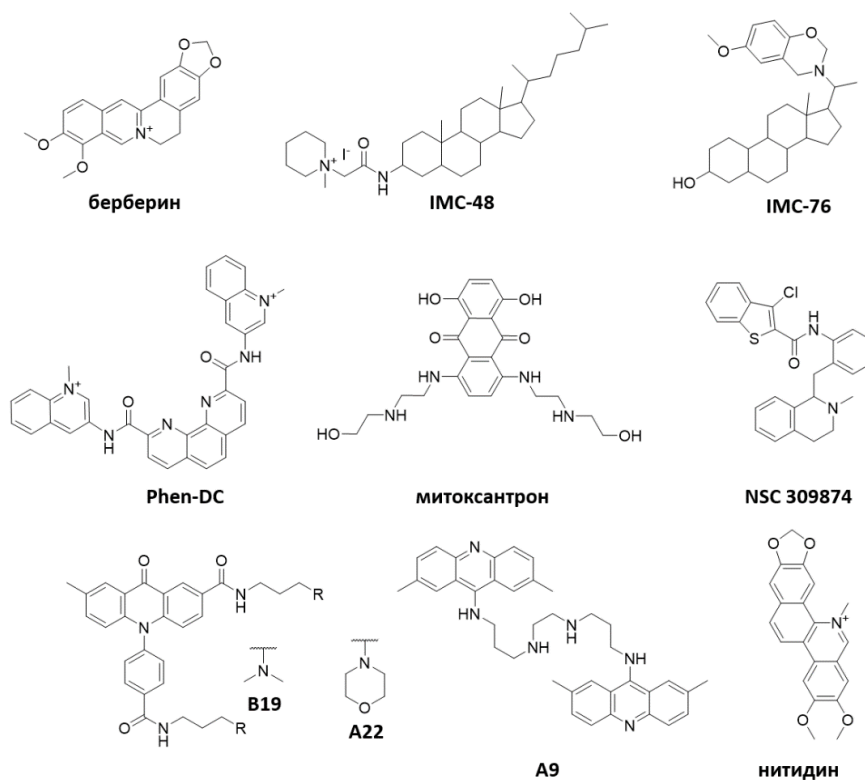
Однако G4-лиганды взаимодействуют с G4 относительно неизбирательно и могут распознавать структуры различной топологии. Как следствие, их антипролиферативное действие не избирательно по отношению к раковым клеткам по сравнению с нормальными клетками. Отсутствие селективности является одной из основных причин, ограничивающих их разработку в качестве противораковых агентов. Возможная стратегия решения этой проблемы заключается в разработке лигандов, которые распознают только один или несколько G4, специфически связанных с функциями раковых клеток. В связи с этим, G4-лиганды следует разрабатывать с учетом пространственной организации выбранной мишени [164]. Однако топологическое сходство каркаса G4 резко ограничивает возможность получения специфичности в отношении конкретного G4. Тем не менее, недавние структурные исследования продемонстрировали, что петли и бороздки могут представлять собой отличительные элементы G4, которые могут быть использованы при дизайне селективных G4-лигандов [165]. В этом контексте привлекательная стратегия повышения селективности представлена возможностью нацеливания на мультимерные G4, две или более последовательные структуры, которые обеспечивают уникальный сайт для воздействия [166,167]. Недавно в геноме человека были описаны необычные G4, например, двухмодульные (дуплекс+G4) структуры, характеризующиеся длинными шпилькообразующими петлями, которые представляют собой перспективную мишень для разработки специфических и селективных лигандов [168]. Еще одна стратегия преодоления низкой селективности заключается в использовании конъюгатов G4-лигандов с олигонуклеотидами или пептидо-нуклеиновыми кислотами (ПНК), которые могут выступать в качестве носителей и направлять лиганд к специфическим мишеням, тем самым ограничивая риск нецелевых эффектов [169,170]. Преодоление селективности также возможно при специфической доставке G4-лигандов в раковые клетки с применением наночастиц или липосом [171,172].

Еще одной ключевой особенностью, которую следует учитывать при разработке новых G4-лигандов, является оценка их фармакокинетических свойств. Действительно, молекулы, эффективные в бесклеточных экспериментах, могут проявлять слабую активность в клетках и/или *in vivo*. Накопление и анализ данных о кинетике абсорбции, распределения, метаболизма и выведения подобных молекул позволит оптимизировать принципы создания таких молекул. Наконец, для ускорения клинической разработки G4-лигандов было бы полезно оценить эффективность терапевтических стратегий, основанных на применении G4-лигандов с другими противоопухолевыми агентами (от канонических

химиотерапевтических препаратов до новейших иммуномодулирующих терапий). Комбинаторные подходы позволили бы уменьшить концентрацию G4-лигандов, ограничив риск токсических эффектов и избежав при этом приобретения раковыми клетками резистентности.

Суммируя, на сегодняшний день обнаружено только несколько G4-лигандов с подходящими фармакокинетическими свойствами, и еще меньше молекул прошли клинические испытания. Ограниченный успех обусловлен, прежде всего, недостатками в стратегиях оценки потенциала лигандов и, во-вторых, их низкой селективностью.

За несколько десятков лет, прошедших с момента открытия G4 и осознания их перспективности как мишеней для противоопухолевой терапии, были синтезированы сотни G4-лигандов, однако значительно меньшее внимание уделялось разработке иМ-лигандов из-за сомнений в стабильности иМ при физиологическом рН и их биологической важности. Однако открытие иМ, стабильных при нейтральном рН, а также иМ, регулирующих эффективность транскрипции генов *Bcl-2*, *c-Myc* и *BmPOUM2*, стимулировало исследование влияния низкомолекулярных соединений на стабильность иМ и поиск соответствующих лигандов. Одним из путей стало перепрофилирование G4-лигандов. Впервые способность регулировать стабильность иМ была обнаружена у G4-лиганда ТМРуР4 (**Рисунок 1.3.1**) [173], который оказался стабилизатором теломерного иМ [174]. Позже было показано, что влияние данного соединения на стабильность иМ зависит от структуры: так, оно было способно стабилизировать иМ из промотора гена *c-Myc* [175] и дестабилизировать - из промотора гена *BmPOUM2* [125], в обоих случаях вызывая снижение эффективности транскрипции гена по рассмотренным выше механизмам положительной и отрицательной регуляции.



**Рисунок 1.3.2.** Химические структуры соединений, взаимодействующих с иМ.

Проведенное позже перепрофилирование G4-лигандов методом вытеснения флуоресцентного интеркалятора (ВФИ) выявило шесть соединений, способных связывать теломерный иМ, а именно BRACO-19, митоксантрон, Phen-DC3, берберин, RHPS4 и PDS (Рисунки 1.3.1 и 1.3.2) [176]. Из них первые три вызывали его дестабилизацию. При последующем тестировании этих же G4-лигандов на взаимодействие с иМ из промоторов генов белка-онкосупрессора *DAP* и ключевого белка сборки стресс-гранул *ATXN2L* было обнаружено, что соединения данного класса дестабилизируют первый из данных иМ [139]. В случае иМ из промотора гена *ATXN2L* картина была более сложной: берберин, BRACO-19, Phen-DC3 и RHPS4 дестабилизировали структуру, в то время как митоксантрон, PDS и ТМРyР4 оказывали противоположное влияние.

Другим популярным подходом к поиску иМ-лигандов стали скрининг библиотек, таких как NCI Diversity Set. Для иМ из промотора гена *Bcl-2* в рамках скрининга, в основе которого лежал метод FRET-плавления, были обнаружены соединения IMC-48 и IMC-76 (Рисунок 1.3.2) [114]. Первое соединение стабилизировало иМ за счет связывания с длинной петлей и вызывало повышение эффективности транскрипции гена *Bcl-2*. Второе соединение не столько дестабилизировало иМ, сколько стабилизировало альтернативную шпильчатую структуру, препятствуя сборке иМ и вызывая снижение экспрессии онкогена и

повышение эффективности апоптоза в клетках рака молочной железы и В-клеточной лимфомы.

В ходе поиска терапевтических агентов, направленных против неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП), был проведен скрининг библиотеки низкомолекулярных соединений методом поверхностного плазмонного резонанса с последующей проверкой выявленных лидеров методом ВФИ. Как результат, было обнаружено акридоновое производное A22, дестабилизирующее иМ из промотора гена *Bcl-2* (**Рисунок 1.3.2**) [117]. Обработка данным соединением улучшала жизнеспособность гепатоцитов, ослабляла активацию апоптоза и повышала эффективность всасывания глюкозы. Соединение A22 также показало хорошие результаты в экспериментах на мышах с НЖБП/неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ), где лечение привело к повышению уровня BCL-2, снижению апоптоза и снижению маркеров повреждения гепатоцитов и метаболического синдрома. В ходе скринингового исследования с использованием метода масс-спектрометрии соединения со сродством к иМ из промотора гена *Bcl-2* были обнаружены среди флавоноидов [177]. Однако константы диссоциации комплексов лидеров соединений с мишенью находились в высоком микромолярном диапазоне.

Другой популярной мишенью для поиска лигандов является иМ из промотора онкогена *c-Мус*. Скрининг, основанный на методе ВФИ, выявил митоксантрон, тилорон, тобрамицин, гармалол, хинализарин и феназопиридин в качестве соединений, способных вытеснять тиазоловый оранжевый из комплексов с иМ *c-Мус* [178]. Однако выявленные соединения не были селективными и проявляли большее сродство к контрольной двухцепочечной ДНК.

Позже акридоновое производное B19 было идентифицировано как агент, эффективно стабилизирующий иМ *c-Мус* (**Рисунок 1.3.2**) [128]. Оно вызывало повышение температуры плавления структуры более чем на 11 градусов и инициировало ее сборку из неструктурированной формы. Соединение обладало микромолярной константой диссоциации и не связывалось с контрольными дуплексной и G4-формирующей ДНК. Данное соединение было способно снижать эффективность транскрипции и экспрессии гена *c-Мус*, а также скорость пролиферации клеток плоскоклеточного рака матки путем индукции апоптоза.

Бисакридиновое производное A9 стабилизировало иМ и G4 из промотора онкогена *c-Мус* и не связывало дуплексную и шпильчатую ДНК (**Рисунок 1.3.2**) [179]. Данное соединение в наномолярных концентрациях снижало уровни мРНК и белка *c-Мус*, а также ингибировало пролиферацию клеток лимфомы, рака шейки матки, легких, кишечника и печени, и ингибировало рост опухоли в мышинной модели рака шейки матки.

Другими популярными мишенями для поиска иМ-связывающих лигандов являются иМ из промоторов онкогенов *KRAS* и *HRAS*. Нитидин, алкалоид бензофенантридинового ряда, был идентифицирован как эффективный дестабилизатор регуляторной структуры из промотора онкогена *KRAS* на основе данных скрининга с FRET-плавлением (**Рисунок 1.3.2**) [118]. Данная структура, содержащая сайт связывания транскрипционного фактора HNRNPK, состоит из двух модулей, иМ и длинной петли, образующей шпильку. Предположительно именно благодаря гибридной структуре нитидин способен селективно ее дестабилизировать, не оказывая влияния на иМ из промоторов генов *c-Myc* или *Bcl-2*. Исследование с использованием микрочипов с библиотекой низкомолекулярных соединений позволило идентифицировать лиганды для иМ из промотора онкогена *HRAS* [134]. 2-Аминопиримидиновые производные образовывали с мишенью комплекс с константой диссоциации в микромолярном и субмикромолярном диапазоне.

Скрининг библиотеки NCI Diversity Set позволил выявить дестабилизатор иМ из промотора гена *PDGFR $\beta$* , производное бензотиофен-2-карбоксамида NSC 309874, ингибирующее транскрипцию данного гена в клетках нейробластомы (**Рисунок 1.3.2**) [121].

Несмотря на ограниченное количество данных о взаимосвязи структуры и активности, иМ-дестабилизаторы, такие как BRACO-19, митоксантрон, берберин, IMC-76, Phen-DC3 и пиридостатин, содержат в общем более сложные, многоциклические системы по сравнению с иМ-стабилизаторами, такими как акридоновые и бисакридиновые производные и IMC-48 (**Рисунок 1.3.2**). Помимо структурных особенностей иМ-лигандов, поразительной является их способность функционировать одновременно как G4-стабилизаторы. Независимо от проявляемого эффекта, все приведенные выше иМ-лиганды содержат либо четвертичный амин, либо высокоосновный амин, который ионизируется при физиологическом pH и, предположительно, взаимодействует с отрицательно заряженным фосфатным остовом ДНК.

Таким образом, подтверждение перспективности таргетирования геномных G4 и иМ и накопленные данные о структурных особенностях взаимодействующих с ними соединений будут стимулировать поиск новых мишеней и разработку эффективных и селективных регуляторов транскрипции и противовопухолевых агентов.

#### 1.4. Аптамеры

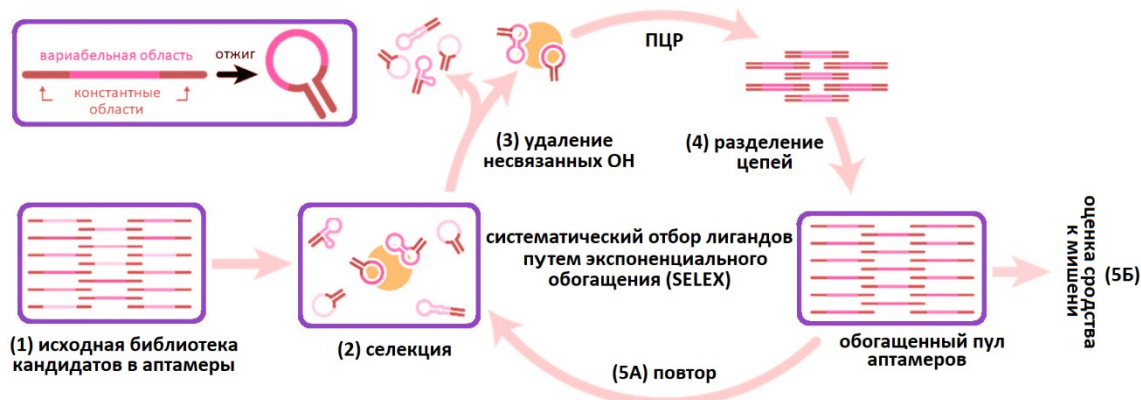
Аптамеры представляют собой короткие одноцепочечные фрагменты нуклеиновых кислот, которые складываются в уникальные трехмерные структуры и специфически связываются с мишенями, такими как белки, пептиды, низкомолекулярные соединения и ионы металлов. Большинство аптамеров получают посредством процесса селекции из библиотек, называемого систематическим отбором лигандов путем экспоненциального обогащения (SELEX), в котором используется мишень для обогащения связывающихся с ней олигонуклеотидов среди множества случайных последовательностей. Аптамеры широко используются в научных и клинических исследованиях от создания биосенсоров до разработки терапевтических препаратов.

Аптамеры по своим функциям аналогичны антителам, которые в настоящее время являются наиболее широко используемым инструментом молекулярного распознавания. Аптамеры могут обладать очень высоким сродством ( $K_D \sim 10$  пМ) и специфичностью (например, способны различать отдельные аминокислотные замены в белках) к своим мишеням [180,181]. Однако, в отличие от антител, аптамеры имеют сравнительно низкую себестоимость, поскольку их синтезируют химически; они более гомогенны и допускают контролируемое введение химических модификаций [182–185]. Кроме того, ДНК-аптамеры стабильны в более широком диапазоне значений ионной силы, pH, температур и других условий хранения по сравнению с антителами [186]. Важным преимуществом аптамеров перед антителами является то, что они состоят из фрагментов нуклеиновых кислот — молекул с программируемыми свойствами. В связи с нуклеиновой природой аптамеров, их можно амплифицировать, и они совместимы с большим количеством нанотехнологических подходов, позволяющих усиливать сигнал молекулярного распознавания [187]. В частности, для усиления сигнала можно использовать стратегии амплификации, такие как ПЦР, амплификация по типу катящегося кольца или с замещением цепи, и другие методы. Несмотря на эти преимущества, аптамеры в настоящее время отстают по разнообразию последовательностей и коммерческому внедрению от антител. Причины заключаются в трудоемком характере селекции аптамеров и ограничениях, связанных с их ранней патентной защитой [188].

Ферменты на основе РНК, промежуточное звено к аптамерам, представляют собой нуклеиновые кислоты, которые могут образовывать сложные структуры и катализировать химические превращения [189–191]. В 1990 году три исследовательские группы независимо друг от друга описали итеративные методы отбора РНК-ферментов *in vitro*, которые вместе были названы SELEX [192]. Нуклеиновые кислоты, которые образуются в результате селекции, были названы «аптамерами»: «apta» от aptus (на латыни означает

«подгонка») [193]. Чуть позже были открыты первые ДНК-аптамеры, тромбин-связывающий аптамер и аптамеры, связывающие специфические красители [194,195]. Первые аптамеры, выделенные с помощью клеточного SELEX и связывающиеся с *Trypanosoma brucei*, были получены в 1999 году [196].

В настоящее время SELEX представляет собой основной метод обнаружения новых аптамеров (**Рисунок 1.4.1**). В SELEX исходная библиотека инкубируется с требуемой молекулярной мишенью. В каждом раунде селекции связанные последовательности выделяют и подвергают ПЦР-амплификации, получая новый набор для последующих раундов селекции. Обычно для обогащения пула аптамеров и поиска аптамеров, связывающихся с мишенью, необходимо от пяти до двадцати раундов. После отбора, лидерные кандидаты оцениваются на связывающее сродство с мишенью, специфичность/селективность и стабильность [197]. Кроме того, часто проводятся структурные исследования, поскольку знания о структуры могут использоваться для рациональной модификации аптамера за счет введения химических модификаций, меток и других биомолекул или для минимизации функциональной последовательности, чтобы обеспечить масштабируемый синтез с более высокими выходами.



**Рисунок 1.4.1.** Схема проведения SELEX. Кандидаты в аптамеры состоят из вариабельной области и константных областей. После отжига ОН сворачиваются и формируют вторичные структуры, которые могут позволить им связываться с мишенями. (1) Исходная библиотека кандидатов в аптамеры содержит  $10^{14}$ – $10^{15}$  уникальных последовательностей. (2) Библиотеку кандидатов в аптамеры инкубируют с мишенью для отбора. (3) Несвязанные кандидаты удаляют, и элюируют ОН, связавшиеся с мишенью. (4) После проведения ПЦР на аптамерах смысловую и антисмысловую цепи разделяют. Обогащенный пул кандидатов в аптамеры используют в следующем раунде отбора (5А) и оценивают на связывающее сродство к мишени (5Б). *Адаптировано из [201].*

Аптамеры находят широкое применение в диагностике. Благодаря легкости введения функциональных репортерных молекул в аптамеры, таких как флуорофоры и



биотин, они уже давно рассматриваются в качестве перспективной альтернативы моноклональным и поликлональным антителам в таких методах, как иммуногистохимия, иммунофенотипирование с помощью проточной цитометрии и твердофазный иммуноферментный анализ [198–201].

Преимущества аптамеров перед антителами проявляются, в частности, при разработке подходов к фенотипированию клеток иммунной системы или раковых клеток. Большой размер антител может препятствовать связыванию с рецепторами на клеточной поверхности. Для полного фенотипирования были разработаны сложные протоколы последовательного окрашивания антителами и их последующего удаления [202]. Три ключевых уникальных свойства аптамеров делают этот процесс менее сложным. Аптамеры можно легко синтезировать химическим путем и пометить флуорофорами во время твердофазного синтеза, часто без потери функциональности. С другой стороны, аптамеры намного меньше антител, что может обеспечивать ассоциацию большего количества аптамеров к различным рецепторам на поверхности клетки. Последнее свойство также может привести к повышению чувствительности [203]. Аптамеры можно легко адаптировать для функциональной сортировки клеток с помощью магнитных шариков или сортировки клеток с активацией флуоресценции. Аптамер можно легко удалить с поверхности клетки либо посредством обработки нуклеазой, либо с помощью комплементарной «антидотной» последовательности, что позволяет сохранить нормальную функциональность рецептора для последующих манипуляций, включая трансплантацию клеток [204].

Аптамеры могут заменить антитела в анализах с использованием биочипов с одиночными молекулами (Simoa) [205]. Эти анализы представляют собой адаптацию иммуноферментных анализов, обладающих повышенной чувствительностью. Основа метода заключается в том, что молекула захватывается парамагнитным шариком, помеченным узнающим лигандом. В методе используют избыток шариков, чтобы гарантировать, что с каждым шариком свяжется только одна молекула. К смеси добавляют биотинилированный лиганд, который узнает небольшую молекулу, инкубируют с раствором флуорогенного субстрата, и смесь загружают на биочип с лунками, каждая из которых может содержать только один шарик. Флуоресцентный сигнал, генерируемый в результате ферментативной реакции, катализируемой ферментом, слитым со стрептавидином, регистрируют камерой на ПЗС матрицах [206]. Использование биотинилированных SOMАмеров (аптамеры, функционализированные остатками 5-замещенного урацила) к шести цитокиновым мишеням обеспечило сверхнизкий предел

обнаружения и сопоставимую с антителами чувствительность, но также позволило минимизировать проблемы, связанные с перекрестной реактивностью антител [207,208]. Важно отметить, что модификация последовательности аптамеров с целью увеличения сродства и специфичности является гораздо более простым и быстрым процессом, чем введение мутаций в антитела [209–211].

Еще одним перспективным приложением аптамеров является изучение взаимодействий лиганд-рецептор на плазматической мембране на одномолекулярном уровне. В данном случае флуорофор должен находиться как можно ближе к своей мишени, что более вероятно в случае меньших по размеру аптамеров по сравнению с антителами. Действительно, сравнение антител с аптамерами продемонстрировало превосходную эффективность последних, а варьирование длины аптамеров позволило определить размер (15 кДа или меньше), оптимальный для получения качественных изображений [212]. Метод использовался для визуализации и изучения динамики отдельных молекул рецептора инсулина в плазматической мембране в реальном времени [213], а также для визуализации и отслеживания отдельных молекул рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) в его нативном состоянии в живых клетках [214].

Применение аптамеров к малым молекулам в составе биосенсоров в последнее время считается более предпочтительным из-за низкой иммуногенности малых молекул и, как следствие, сложностей с выработкой на них антител. Проблема с обнаружением малых молекул обусловлена наличием часто только одного сайта связывания, что затрудняет разработку высокочувствительных сенсоров. Удачным примером аптамеров к малым молекулам является «расщепленный» аптамер, состоящий из двух или более фрагментов [215]. При взаимодействии с мишенью, фрагменты аптамера пространственно сближаются и активируют репортерную молекулу в случае оптических аптасенсоров или изменяют коэффициент преломления в случае аптасенсоров на основе поверхностного плазмонного резонанса или электрохемилюминесценции [216]. Дополнительным преимуществом является стабильность аптамеров, позволяющая использовать их в месте эксплуатации без необходимости соблюдения холодового режима.

Аптамеры как терапевтические агенты продемонстрировали большой потенциал в доклинических испытаниях; аптамеры проходят клинические испытания в качестве активных препаратов монотерапии, в качестве диагностических средств или в рамках обнаружения биомаркеров. Однако на сегодняшний день к использованию одобрен только один аптамер, Макуген, применимый при возрастной дегенерации желтого пятна (одобрен в 2004 году). Аналогично Макугену, аптамеры, продвинувшиеся дальше всего до фазы III

или фазы IV клинических исследований, направлены на лечение заболеваний, связанных с глазами (дегенерация желтого пятна, отек желтого пятна и диабетическая ретинопатия).

Аптамеры считаются гораздо более безопасной альтернативой моноклональным антителам из-за отсутствия или очень низкой иммуногенности. Однако имеющаяся на настоящий момент информация о триггерах иммунных клеток свидетельствует о том, что аптамеры также могут быть иммуногенными и, следовательно, могут найти применение в иммунотерапии [217]. Еще одним важным преимуществом аптамеров является их небольшой размер, позволяющий им проникать более глубоко в ткани вдали от кровеносных сосудов. Это особенно важно для адресной доставки химиотерапевтических препаратов при солидных опухолях [218]. Наконец, комбинирование аптамеров с элементами, чувствительными к опухолевому микроокружению, может обеспечить селективное воздействие на раковые клетки [219].

Пожалуй, одним из наиболее ярких преимуществ аптамеров в терапии является наличие готового антитода (комплементарной последовательности) к аптамеру [220]. Пары аптамер/антитод в основном разрабатывались для использования в гематологии в качестве антикоагулянтов [221]. Первой парой аптамер/антитод, которая прошла клинические испытания, был пегнивакогин (аптамер)/анивамерсен (антитод). После успешного прохождения фаз I, IIa и IIb, клинические исследования III фазы были остановлены из-за небольшого количества аллергических реакций, которые, вероятно, были вызваны модификацией полиэтиленгликоля, а не самим аптамером [222]. Фактически, аналогичная аллергическая реакция наблюдалась при введении вакцин против коронавирусной инфекции 2019 года (COVID-19), содержащих полиэтиленгликоль [223].

Комбинация диагностических и терапевтических средств — еще одна область, в которой аптамеры демонстрируют свою полезность [224]. Молекулярная визуализация необходима для диагностики различных заболеваний и может использоваться для оценки эффективности лечения. В этой области произошло несколько технологических скачков, в ходе которых визуализация прошла путь от использования радиоизотопов до магнитных частиц и флуоресценции. Хотя методы в настоящее время ограничены животными моделями для классической визуализации [225], они уже были апробированы для интраоперационного использования [226]. Традиционное радиоактивное мечение аптамеров обычно является более простым процессом, чем мечение антител [227]. Для конъюгации аптамеров можно использовать стандартные подходы с использованием активированных эфиров или «клик» химию. В зависимости от пришиваемой к аптамеру молекулы, конъюгаты можно использовать для молекулярной визуализации и одновременной терапии опухоли. Пришиваемая молекула может включать лютеций,

радиоизотоп, который излучает как бета-, так и гамма-частицы, или определенные типы наночастиц, обладающие как диагностическими, так и терапевтическими свойствами. Перспективным выглядит применение аптамерных химер, которые содержат терапевтический аптамер и аптамер-доставщик [228,229].

Использование сопутствующего диагностического теста не совсем соответствует области тераностики, но обеспечивает сочетание диагностических и терапевтических эффектов. Принцип впервые был разработан FDA в 2016 году. С точки зрения таргетной терапии важно продемонстрировать наличие рецептора в целевой популяции клеток. Обычно это предполагает взятие биопсии у пациента для подтверждения наличия рецептора с использованием стандартных диагностических методов. Поскольку функционализация антител во многих случаях невозможна, необходимо использовать одно антитело для диагностики, и другое — для терапии. В свою очередь, аптамеры легко модифицировать и комбинировать в одной конструкции. Следовательно, для обоих приложений можно использовать один и тот же аптамер [230,231].

Таким образом, аптамеры имеют широкий спектр мишеней и применяются для диагностических, терапевтических и тераностических целей. Для идентификации новых аптамеров, которые связывают клетки, белки, вирусы и другие мишени интереса, используют различные варианты SELEX (классический и клеточный SELEX, SELEX с использованием капиллярного электрофореза и магнитных частиц). Аптамеры являются основными конкурентными антител, и их ключевые особенности, такие как (1) более низкая себестоимость производства (без животных-хозяев), (2) воспроизводимость между партиями (химический синтез) и часто (3) более высокое сродство и специфичность, вероятно, приведут в ближайшие годы к укреплению позиции аптамеров на рынке.

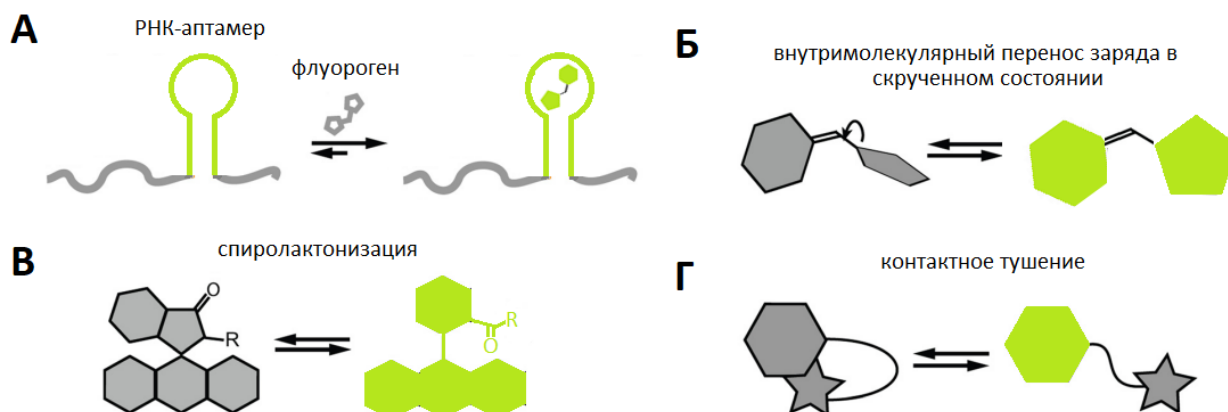
### 1.5. Генетические кодируемые метки на основе РНК-аптамеров

Флуоресцентная визуализация биомолекул является мощным инструментом исследования в биологических науках. Непосредственная визуализация биологических процессов с помощью света представляет собой минимально инвазивный метод, который дает представление о сложном внутреннем устройстве жизни. Центральное значение РНК в клеточных процессах и заболеваниях привело к разработке большого количества флуоресцентных инструментов на основе РНК-аптамеров. Эти инструменты визуализации РНК в настоящее время приближаются, а в некоторых случаях превосходят возможности визуализации на основе флуоресцентных белков.

На настоящий момент предложено большое количество красителей для окрашивания нуклеиновых кислот, в том числе РНК. Однако этим флуорофорам не хватает специфичности, необходимой для визуализации отдельных типов РНК внутри клеток. Существует большое количество различных стратегий флуоресцентного мечения конкретных РНК *in vitro* и *in vivo*. С помощью химических модификаций флуорофоры можно ковалентно присоединить к нуклеиновой кислоте либо внутри последовательности, либо по 5' или 3'-концам. Такие экзогенные зонды традиционно используются в таких методах, как молекулярные маяки и одномолекулярная флуоресцентная гибридизация *in situ* (smFISH), которые позволяют проводить обнаружение РНК *in vitro* и в фиксированных клетках соответственно. Недостатком данных инструментов является то, что они не являются генетически кодируемыми, а также не способны проникать в живые клетки. В отличие от этих методов *in vitro*, в настоящее время золотым стандартом для визуализации РНК *in vivo* является система MS2-MCP [232] и близкородственные системы, такие как PP7-PCP [233], U1A-U1Ap [234] и boxB-N пептиды [235]. Мечение РНК интереса специфической последовательностью MS2, способной прочно связываться с капсидным белком MCP, обеспечивает ее флуоресцентную визуализацию за счет слияния MCP с флуоресцентным белком. Однако данный метод страдает от высокой фоновой флуоресценции из-за несбалансированных уровней экспрессии РНК и белка. Для устранения этих недостатков были разработаны системы мечения на основе генетически кодируемых РНК-аптамеров [239].

В данных системах флуоресцентного мечения специфические РНК-последовательности, называемые РНК-аптамерами, связываются и резко увеличивают интенсивность флуоресценции (ИФ) флуорогенного красителя, экзогенного по отношению к биологической системе (**Рисунок 1.5.1А**). В результате эффективность данных двухкомпонентных систем зависит от характеристик как РНК-аптамера, так и используемого с ним флуорогенного красителя. В идеале пара должна обладать высокой

молярной яркостью флуоресценции ( $M^{-1} \text{ см}^{-1}$ ), при этом сохраняя высокое сродство (небольшая величина  $K_D$ ) и специфичность для обеспечения многоцветной визуализации. На сегодняшний день в системах на основе РНК-аптамеров используются три основных механизма активации флуоресценции красителя: внутримолекулярный перенос заряда в скрученном состоянии (КВПЗ) [237,238], спиролактонизация (СП) [239] и контактное тушение (КТ) [240].



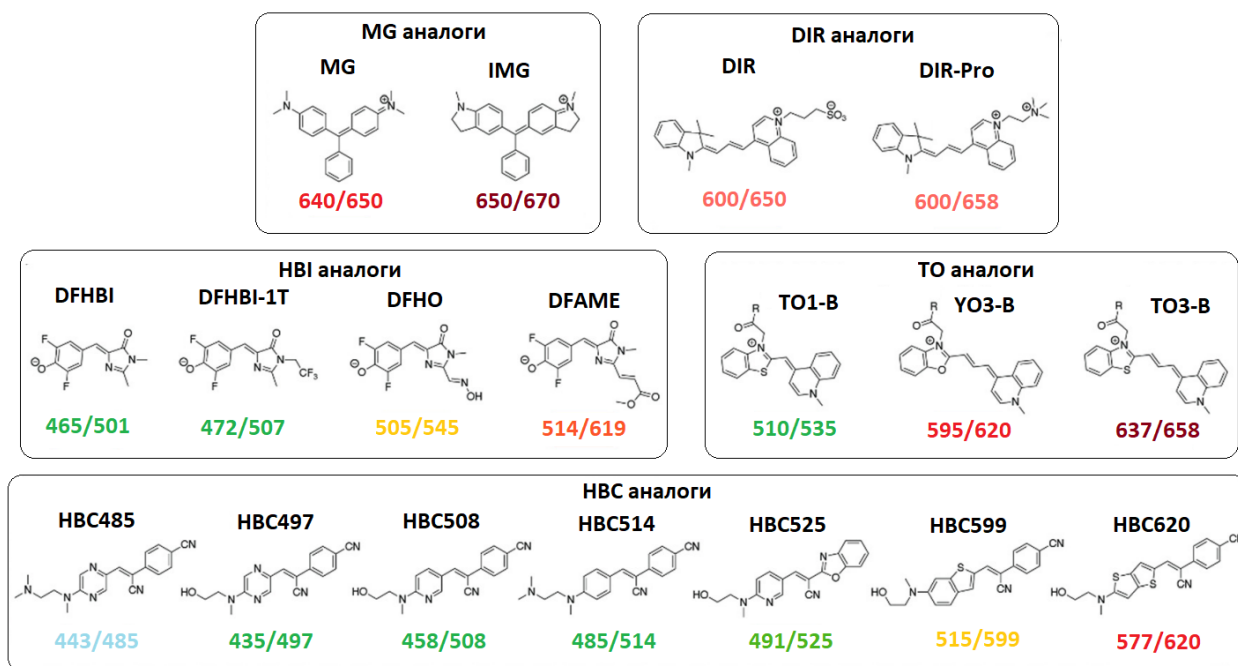
**Рисунок 1.5.1.** РНК-аптамеры и механизмы активации флуоресценции. (А) Схематическое изображение системы на основе РНК-аптамера и флуорогенного лиганда. При связывании с РНК-аптамером происходит активация флуоресценции флуорогенного лиганда на основе (Б) КВПЗ: внутримолекулярного переноса заряда в скрученном состоянии; (В) СП: смещения равновесия в сторону флуоресцирующего открытого состояния; (Г) КТ: пространственного разделения тушителя и красителя, активирующего флуоресценцию красителя. *Адаптировано из [236].*

Флуорогенные лиганды на основе КВПЗ чрезвычайно чувствительны к локальному окружению, и аптамеры, контролирующие конформацию флуорогена, позволяют получить очень ярких флуорогенные системы (**Рисунок 1.5.1Б**). Яркость систем аптамер:лиганд может превышать в тысячи раз яркость несвязанного флуорофора. Флуорофоры на основе КВПЗ состоят из электронодонорного (ЭД) и электроноакцепторного (ЭА) фрагментов, соединенных сопряженной системой, обеспечивающей внутримолекулярное вращение (например, метиновым мостиком или одинарной связью). При фотовозбуждении происходит перенос электронов между ЭД и ЭА, приводящий к возникновению дипольного момента возбужденного состояния. Релаксация возбужденного КВПЗ-состояния в основное происходит за счет двух основных конкурирующих процессов: эмиссии флуоресценции и безызлучательного сброса энергии в ближайшее окружение [237,238]. В идеале флуороген, связанный с аптамером, максимизирует процесс эмиссии флуоресценции, в то время как несвязанное состояние максимизирует безызлучательный сброс энергии.

Флуорогенные лиганды на основе СП представляют собой ксантеновые красители, производные флуоресцеина или родамина. В данных системах существует равновесие между открытой флуоресцентной хиноидной формой и закрытой нефлуоресцентной лактоновой формой красителя (**Рисунок 1.5.1В**). В зависимости от полярности окружающей среды внутримолекулярное равновесие может смещаться в сторону открытой или закрытой формы [239]. Таким образом, связывание с РНК-аптамером приводит к локальному изменению окружения и сдвигу равновесия в сторону открытой флуоресцентной формы, что сопровождается флуоресцентным «разгоранием» системы.

Флуорогенные системы на основе КТ содержат флуоресцентную молекулу и находящийся на близком расстоянии высокоэффективный тушитель. Тушитель поглощает энергию флуорофора, эффективно подавляя его флуоресценцию посредством безызлучательного сброса энергии [240]. РНК-аптамеры, способные связывать либо флуорофор, либо тушитель, пространственно разделяют тушитель и флуорофор, что приводит к восстановлению собственной флуоресценции флуорофора (**Рисунок 1.5.1Г**).

Первые флуорогенные РНК-аптамеры, MG- и SRB-аптамеры, были получены в 2003 году с использованием селекции *in vitro* [241]. MG-аптамер имеет  $K_D$  120 и 670 нМ для малахитового зеленого (MG) и индолинилмалахитового зеленого (IMG) соответственно и активирует их флуоресценцию в 2400 и 2100 раз (**Рисунок 1.5.2**). Облучение MG светом вызывает клеточную токсичность из-за генерации MG свободных радикалов [242], что делает его непригодным для клеточной визуализации. Однако значительная активация флуоресценции лиганда при комплексообразовании открыла возможность для разработки биологически совместимых флуорогенных систем с высоким сродством и контрастностью сигнала. Используя селекцию *in vitro*, был получен DIR-Apt1 аптамер с  $K_D$  86 нМ для асимметричного флуорогенного цианинового красителя диметилиндроловый красный (DIR) [243]. При связывании с аптамером ИФ лиганда увеличивается в 60 раз. DIR не интеркалирует неспецифически в двухцепочечную ДНК (дцДНК), что является важным для уменьшения фоновой флуоресценции и увеличения динамического диапазона визуализации клеток. Использование DIR в качестве лиганда для селекции позволило отобрать РНК-аптамер второго поколения, названный DIR2s-Apt [244]. Аптамер продемонстрировал специфичность связывания с DIR, но не с MG, но также был способен связываться с несколькими другими несимметричными цианиновыми красителями, включая красные аналоги DIR. Среди них, DIR2s-Apt демонстрирует самое высокое сродство к DIR-Pro ( $K_D$  310 нМ) и 45-кратное увеличение ИФ при комплексообразовании.



**Рисунок 1.5.2.** Примеры наиболее перспективных флуорогенных лигандов для РНК-аптамеров (под красителями приведены максимумы возбуждения или поглощения/эмиссии (нм) в комплексе со специфическим РНК-аптамером). *Адаптировано из [236].*

Вдохновленные структурой хромофора зеленого флуоресцентного белка (GFP) п-НБИ Джеффри и сотрудники синтезировала в 2011 году серию флуорогенных аналогов НБИ, охватывающих видимый спектр, и отобрали ряд РНК-партнеров, используя селекцию *in vitro* [245]. Среди комплексов РНК-аптамер:флуорофор наиболее перспективной выглядела пара Шпинат-DFHBI (**Рисунок 1.5.2**). Она характеризовалась  $K_D$  540 нМ и 2000-кратным увеличением ИФ.

Рентгеновская кристаллография комплекса Шпинат-DFHBI показала, что Шпинат содержит жесткую G4-структуру, которая служит связывающим карманом для красителя [246]. DFHBI укладывается поверх G-тетрады в плоской конформации за счет гидрофобных взаимодействий и накрывается мотивом из трех оснований. На основе кристаллической структуры была получена укороченная версия «Шпинат-малыш» (51 нт) [247]. Несмотря на наличие четко определенного кармана связывания, Шпинат имеет низкую специфичность к производным НБИ и может демонстрировать большее увеличение ИФ в комплексе, например, с красителем для аптамеров семейства Манго (TO1-B), тиофлавином Т (ThT) и N-метилмезопорфирином (NMM) [248]. Система Шпинат-DFHBI совместима как с визуализацией бактерий *E. coli*, так и визуализацией 5S РНК в эукариотических клетках НЕК293Т [245].



Еще одним зеленым представителем «овощных» РНК-аптамеров является Брокколи, который связывается с улучшенным аналогом DFHBI -DFHBI-1T [249,250] (**Рисунок 1.5.2**). Чтобы оптимизировать РНК-аптамер для использования в живых клетках, после отбора *in vitro* библиотеку РНК клонировали в бактерии *E. coli*, а затем подвергали скринингу с использованием метода селекции *in vivo* на основе флуоресцентного сортирования FACS. Клеточный скрининг решил проблему неправильного сворачивания РНК-аптамера, наблюдаемую для Шпината *in vivo*, и привел к идентификации Брокколи с более высокой термостабильностью ( $T_{пл} = 48\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и меньшей зависимостью от концентраций магния, чем у Шпината.

Для расширения цветовой палитры систем мечения РНК в 2017 г. был разработан аптамер Кукуруза [251]. В отличие от DFHBI, флуорофор DFHO имитирует хромофор красного флуоресцентного белка (RFP) и флуоресцирует в желтой области видимого света (**Рисунок 1.5.2**). Он содержит расширенную  $\pi$ -сопряженную систему за счет добавления ацилиминового заместителя в С2 положение имидазолинового кольца. Комплекс Кукуруза:DFHO ( $K_D$  70 нМ, увеличение ИФ 630) демонстрирует улучшенную фотостабильность при визуализации живых клеток НЕК293Т по сравнению с комплексом Брокколи:DFHBI. Одним из возможных объяснений такого поведения является то, что фотообесцвеченный продукт диссоциирует от Кукурузы, позволяя связываться свежему лиганду DFHO. Благодаря повышенной фотостабильности система Кукуруза:DFHO обеспечила количественное отслеживание активности клеточного промотора Pol III в живых клетках НЕК293Т [251].

Недавно был отобран и охарактеризован красный флуорогенный РНК-аптамер, названный Свеклой ( $K_D$  460 нМ, увеличение ИФ 41), который может избирательно связывать аналог HBI – DFAME и флуоресцирует с большим стоксовым сдвигом ( $\lambda_{возб} = 514\text{ нм}$ ,  $\lambda_{эм} = 619\text{ нм}$ ) [252] (**Рисунок 1.5.2**). Пара Свекла и Кукуруза продемонстрировали ортогональность как с точки зрения  $K_D$ , так и с точки зрения увеличения ИФ. Поскольку Свекла и Кукуруза образуют гомодимер, их использовали в качестве меток из tandemных повторов при визуализации живых клеток, чтобы индуцировать сборку макромолекул посредством многовалентного межмолекулярного взаимодействия [252].

Несимметричный цианиновый флуорогенный краситель тиазоловый оранжевый (ТО) уже более 30 лет широко используется в качестве красителя, интеркалирующего в двухцепочечные фрагменты нуклеиновых кислот [253]. ТО состоит из бензотиазольного и хинолинового кольца, которые соединены между собой вращающимся метиновым мостиком. Краситель выглядит очень перспективным благодаря низкому фоновому сигналу

в свободном состоянии и значительной активации флуоресценции при ограничении вращения вокруг метинового звена.

Используя проницаемое для клеток биотин-содержащее производное ТО - ТО1-В (**Рисунок 1.5.2**), был отобран РНК-аптамер Манго I (MI) с  $K_D$  3,2 нМ и 1100-кратным увеличением ИФ [254]. В N-положение бензотиазола молекулы ТО был введен ацетатный фрагмент для дальнейшего образования амидной связи и подавления интеркаляции в двухцепочечные нуклеиновые кислоты [255]. Беспрецедентно высокая эффективность комплексообразования Манго I:ТО1-В позволила визуализировать единичные молекулы РНК *in vitro* с помощью флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения [254]. MI также демонстрирует превосходную дискриминирующую способность и не связывается с DFHBI [248].

Комплекс Манго I:ТО1-В первого поколения демонстрирует невысокий квантовый выход ( $\Phi^F$ ) 0,14. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, два гетероцикла ТО1 расположены под углом  $45^\circ$  друг к другу, что позволяет предположить, что дальнейшее повышение квантового выхода может быть достигнуто за счет минимизации этого угла при комплексообразовании с аптамером [256]. Флуоресцентная селекция на основе микрофлюидной технологии позволила выделить новые более яркие аптамеры Манго [257–259]. Новые аптамеры содержат G4 ядро, имеют одинаковую термическую стабильность ( $T_{пл}$  40–45 °C), сильно стабилизируются ионами калия и в меньшей степени ионами натрия и обладают уникальной структурой, связывающей ТО1-В практически в плоской форме. MII проявляет субнаномолярное сродство к ТО1-В ( $K_D$  0,7 нМ, увеличение ИФ 1700) и умеренный квантовый выход 0,21 [260]. Интересно, что и MI, и MII обладают высокой устойчивостью к формальдегиду, что позволяет получать изображения фиксированных клеток. MIII ( $K_D$  5,6 нМ, усиление ИФ 4400) демонстрирует наиболее яркую флуоресценцию с наибольшим квантовым выходом 0,56. MIV ( $K_D$  11 нМ, увеличение ИФ 3300) и представляет собой самый яркий вариант для визуализации фиксированных клеток [259]. Приложения для данных систем флуоресцентного мечения включают использование серии Манго II–IV для визуализации клеточной локализации малых некодирующих РНК [260]. Кроме того, MII использовался в различных приложениях для визуализации клеток млекопитающих, включая отслеживание одиночных молекул мРНК в живых клетках наряду с системой MS2, обеспечивая двухцветную визуализацию, одномолекулярную FISH РНК, а также визуализацию сверхвысокого разрешения [261].

Родственными Манго являются РНК-аптамеры семейства Персик к ТО3-В, аналогу ТО1-В с расширенной сопряженной ароматической системой (**Рисунок 1.5.2**) [262]. Данные аптамеры, способные преимущественно связываться с ТО3-В, а не ТО1-В, были получены

при использовании небиотинилированных аналогов ТО1 в качестве ортогональных конкурентов при селекции. Связывание и спектральная ортогональность пар Манго и Персика позволили одновременно и количественно определить *in vitro* концентрации двух РНК в диапазоне от 0 до 50 нМ.

Вдохновленные созданием РНК-миметиков GFP [245] Янг и сотрудники разработали в 2019 году палитру синтетических красителей НВС и отобрали РНК-аптамер Перец (Рисунок 1.5.2, Таблица 1.5.1) [263].

**Таблица 1.5.1.** Фотофизические и биохимические свойства пар НВС лигандов и РНК-аптамера Перец.

| лиганд | $K_D$ (нМ) | $\lambda_{\text{возб}}$ (нМ) | $\lambda_{\text{эм}}$ (нМ) | Коэф.<br>молярной<br>экстинкции<br>$\varepsilon$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) | $\Phi_{\text{аптамер:лиганд}}$ | Молярная<br>яркость<br>( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) | Увеличение<br>ИФ |
|--------|------------|------------------------------|----------------------------|---|--------------------------------|---|------------------|
| НВС485 | 8,0        | 443                          | 485                        | 49000   | 0,42                           | 21000   | 690              |
| НВС497 | 6,7        | 435                          | 497                        | 55000   | 0,57                           | 31000   | 17000            |
| НВС508 | 27         | 458                          | 508                        | 43000   | 0,30                           | 13000   | 9100             |
| НВС514 | 12         | 458                          | 514                        | 44000   | 0,45                           | 20000   | 4700             |
| НВС525 | 3,8        | 491                          | 525                        | 74000   | 0,70                           | 52000   | 590              |
| НВС530 | 3,5        | 485                          | 530                        | 65000   | 0,66                           | 43000   | 3600             |

Система на основе РНК-аптамера Перец и производных НВС обладает превосходными фотофизическими свойствами, включая ярко-зеленую флуоресценцию, наномолярную  $K_D$  (3,5 нМ), высокую температуру плавления ( $T_{\text{пл}}$  55 °С), быструю скорость ассоциации ( $0,66 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) и низкую скорость диссоциации. ( $0,0023 \text{ s}^{-1}$ ). Для расширения спектрального диапазона флуоресценции системы Перец:НВС была синтезирована серия аналогов НВС с эмиссией в голубой-красной области видимого света путем варьирования электронодонорного и электроноакцепторного фрагментов. Все аналоги НВС демонстрировали наномолярную  $K_D$  и использовались для многоцветной визуализации РНК в живых клетках 293Т/17. Кристаллические структуры аптамера Перец с каждым аналогом НВС демонстрируют отсутствие G4 ядра, вместо этого связывающий карман Перца имеет архитектуру двойной спирали, напоминающую по форме камертон, которая допускает модификацию остова НВС [264]. Благодаря многоцветной палитре, высокому сродству и яркости, система флуоресцентного мечения на основе Перца использовалась в различных приложениях для визуализации клеток. Например, были осуществлены визуализация геномных локусов с использованием CRISPR-дисплея Перец [263] и отслеживание транслокации и деградации РНК в живых клетках НЕК293Т [265].

## Глава 2. Обсуждение результатов

### 2.1. Оптические зонды для визуализации биомолекул

Неканонические вторичные структуры нуклеиновых кислот, подобные G4, являются перспективными мишенями для регуляции клеточных процессов, а также важными элементами многих молекулярных инструментов, таких как сенсоры и системы внутриклеточной визуализации. Для установления роли и степени вовлеченности ДНК и РНК G4 в различные клеточные процессы необходимы подходы к идентификации данных структур как *in vitro*, так и *in vivo*. В числе наиболее перспективных стоит отметить подходы с использованием специфичных к ДНК- или РНК-мишени синтетических молекул (зондов). При взаимодействии с мишенью такой зонд генерирует интенсивный сигнал, обычно оптический. Набирают популярность зонды и системы визуализации биомолекул, предполагающие обнаружение методами флуориметрии, микроскопии, Рамановской спектроскопии и др. Флуоресцентные зонды (флуорогенные красители) широко применяются в исследовании ДНК- и РНК-мишеней на этапе первичного скрининга неканонических структур *in vitro*, однако имеют ряд ограничений: недостаточное сродство к мишени, низкая селективность и интенсивность сигнала. Кроме того, при наличии в ДНК/РНК нескольких структурных мотивов велика вероятность их неаддитивного влияния на интенсивность сигнала, что может стать источником артефактов и заслуживает отдельного изучения. В данном разделе мы провели дизайн и синтез флуоресцентных зондов и изучили их спектральные свойства в комплексах с различными вторичными структурами нуклеиновых кислот. Одна из мишеней, представляющая собой двухмодульную структуру (G4+дцДНК), вызывала существенное увеличение яркости некоторых зондов при образовании комплексов. В связи с потенциальной перспективностью подобной пары для визуализации биомолекул, мы провели оценку влияния длины фрагмента дцДНК в двухмодульных структурах (G4+дцДНК) на спектральные свойства набора аналогов хромофора GFP при комплексообразовании. Последующие разработки посвящены созданию комбинации неканонической РНК-структуры (аптамера, имеющего двухмодульную структуру rG4+дцРНК) и специфичного к ней флуорогенного красителя для молекулярной визуализации. Аптамер к флуорогенному красителю рассматривается как генетически кодируемая метка. Таким образом может быть помечена целевая РНК для дальнейшего отслеживания в клетке. Помимо скрининга и внутриклеточной визуализации системы на основе оптических зондов могут быть адаптированы для количественного определения аффинного к ДНК/РНК аналита. В связи с этим, мы разработали Раман-активные красители, обладающие высоким сродством к

аптамерам и генерирующие сигнал, интенсивность которого определяется конкуренцией с аналитом за связывание с аптамером.

Данный раздел написан по результатам совместной работы автора с сотрудниками лаборатории структуры и функций биополимеров (Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства, Москва), лаборатории регуляторной транскриптомики и группы химии гетероциклических соединений (ИБХ РАН, Москва), кафедры химии природных соединений (химический факультет МГУ, Москва), лаборатории ядерных реакций им. Флерова (Объединенный институт ядерных исследований, Дубна), а также коллегами по группе молекулярных инструментов для исследования живых систем (ИБХ РАН, Москва): *Biochimie*. 2019. № 162. С. 216-228; *Sensors*. 2020. № 20. С. 915; *Nucleic Acids Res.* 2023. № 51. С. 2586–2601; *Anal. Chim. Acta*. 2023. № 1221. С. 340140; *Front. Chem.* 2023. № 10. С. 937180.

При этом, в данном разделе лично и под руководством автора или при его участии выполнены следующие эксперименты:

- синтез красителей **1.1.3-1.1.7** и изучение их свойств;
- синтез и изучение структуры и термической стабильности ТВА15 и его аналогов;
- изучение спектральных свойств аналогов хромофора GFP в комплексе с ТВА15 и его аналогами;
- дизайн и синтез красителей **1.1.28-1.1.31** и изучение их свойств в комплексе с аптамерами семейства Манго;
- дизайн генетически кодируемой метки и эксперименты по визуализации метки в живых бактериях и макрофагах, зараженных бактериями;
- дизайн и синтез Раман-активных красителей **1.1.34, 1.1.35** и гуанидино **1.1.35**.

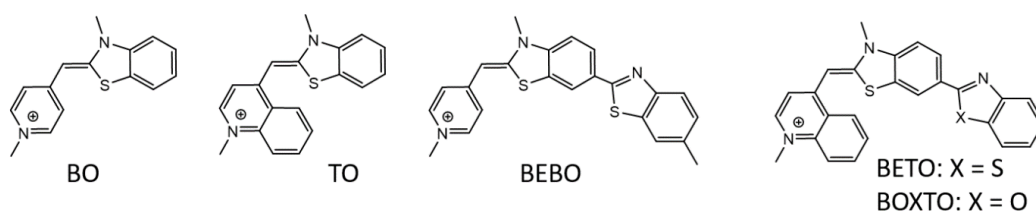
В связи с появлением новых данных о регуляторной роли неканонических вторичных ДНК-структур, таких как G4 и иМ, в геномах, представляет интерес оценка формирования этих структур в дуплексном окружении [72,114,266–268]. С этой целью, в последние годы разработаны высокопроизводительные подходы к полногеномному/полнотранскриптомному профилированию G4, сочетающие тест с остановкой полимеразы/обратной транскриптазы и секвенирование нового поколения (G4-seq [269] и rG4-seq [270]), и родственные методы (G4 GhIP-seq [72], G4RP-seq [271], COMRADES [272] и т.д.). Помимо этого, также разрабатываются биоинформатические инструменты для прогнозирования сайтов возможной сборки G4 на основе анализа последовательностей [273–279]. Несмотря на быстрый прогресс в данной области,

предсказанные G4, в большинстве случаев, нуждаются в проверке биохимическими/биофизическими методами. Традиционные биохимические методы, в том числе неавтоматизированные тесты с остановкой полимеразы и DMS-футпринтинг, отнимают много времени и являются трудоемкими. В настоящее время набирают популярность биофизические экспресс-методы, основанные на использовании флуоресцентных и люминесцентных зондов [280,281].

Предполагается, что идеальный флуоресцентный зонд для подтверждения конкретной ДНК-структуры («разгорающийся» зонд) должен обладать высокой аффинностью и селективностью связывания, а также значительным увеличением квантового выхода флуоресценции при связывании. «Разгорающиеся» зонды с умеренными аффинностью и селективностью, хотя и не являются оптимальными для экспресс-детектирования конкретной мишени, находят широкое применение в различных конкурентных скрининговых анализах, таких как, например, тест на вытеснение флуоресцентного интеркалятора (ВФИ). Что касается аффинности, анализ известных лигандов выявил следующие ключевые структурные элементы G4-узнающих малых молекул: (i) ароматические кольца, способные к  $\pi$ - $\pi$ -стэкинговым взаимодействиям с внешней G-тетрадой; (ii) электронодефицитное катионное ароматическое ядро, обеспечивающее стэкинг с G-тетрадой за счет сильного катион- $\pi$  взаимодействия; (iii) положительно заряженные линкерные группы, которые могут взаимодействовать с гетероциклическими основаниями и/или отрицательно заряженными фосфатными группами сахарофосфатного остова [282,283]. В свою очередь, селективность обычно определяется геометрией расширенной ароматической системы и, в некоторой степени, специфическим расположением положительно заряженных линкерных групп. Введение положительно заряженных линкерных групп не гарантирует одновременного обеспечения аффинности и селективности связывания [284].

Бензотиазольные производные, такие как интеркалирующие красители тиазоловый оранжевый (ТО) и бензотиазоловый оранжевый (ВО) [285,286], а также производные бис-бензотиазола, связывающиеся с малой бороздкой (например, BEVO и его аналоги [287–289]), удовлетворяют критериям (i) и (ii) и обычно используются для окрашивания нуклеиновых кислот (**Рисунок 2.1.1**). Среди них только ТО используется для визуализации неканонических ДНК-структур. ИФ ТО значительно возрастает при образовании комплекса с G4 [290], триплексной ДНК [291] и иМ [178,292]. До недавнего времени ТО являлся самым популярным зондом для обнаружения G4 по изменению его ИФ. Однако стехиометрия связывания и параметры флуоресценции ТО сильно зависят от расположения

и последовательности петель в G4, что усложняет его использование [290,291]. Основной проблемой ТО является ограниченная селективность: он не может эффективно различать G4 и другие вторичные ДНК-структуры [178,291,292]. Проблему низкой селективности можно решить, сочетая ТО в качестве FRET-акцептора с селективными G4-связывающими молекулами, например, производными хинакридина, в качестве FRET-донора [293]. Расширение сопряженной ароматической системы лиганда часто позволяет увеличить селективность к G4 по сравнению с дцДНК. Например, конъюгация ТО со стиролом и его производными [294,295], бензофураном и различными углеводородными кольцами [296,297], карбазольным фрагментом [298] или дополнительным бензотиазольным фрагментом [299], как сообщается, улучшает селективность в отношении G4.



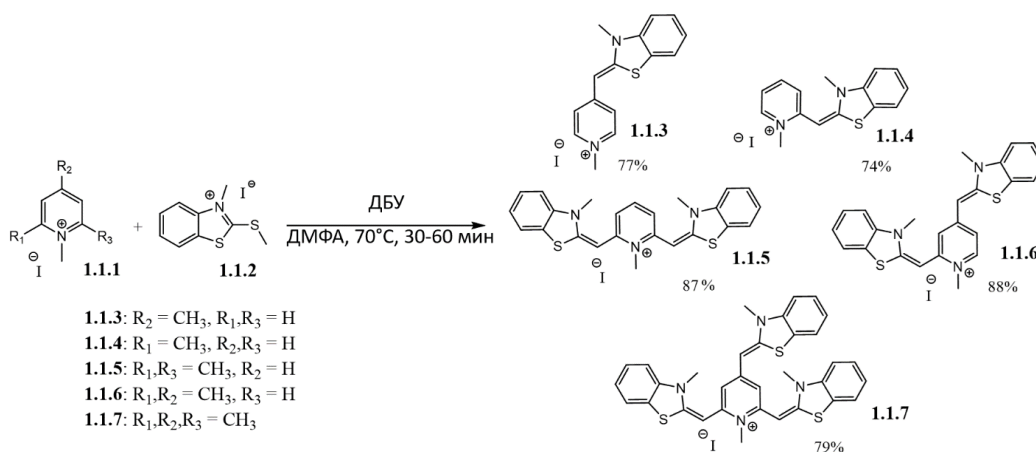
**Рисунок 2.1.1.** Интеркалирующие (ВО и ТО) и связывающиеся с малой бороздкой (BEVO, BETO и BOXTO) несимметричные цианиновые красители.

За последние несколько лет был предложен ряд новых лигандов и «разгорающихся» зондов для проверки образования G4 *in vitro* [300–304]. Одним из наиболее перспективных зондов является тиюфлавин Т (ThT) [305–307]. Как и в случае ТО, усиление флуоресценции при взаимодействии ThT с G4 варьируется в довольно широком диапазоне в зависимости от топологии G4. Этот очевидный недостаток может быть результатом различных паттернов связывания ThT: стэкинг с внешней G-тетрадой, интеркаляция между гетероциклическими основаниями, связывание с бороздкой или взаимодействие с петлями [308].

В ходе исследования, направленного на поиски соединений, способных дискриминировать различные ДНК-структуры по изменению параметров флуоресценции, мы выбрали бензотиазоловый оранжевый (ВО) в качестве остова, обладающего меньшей способностью к самоагрегации в водных растворах по сравнению с ТО [286], что облегчает интерпретацию спектров его комплексов с ДНК-фрагментами. Мы разработали схему синтеза и получили новые аналоги и оценили потенциал ВО и этих аналогов в качестве «разгорающихся» зондов для различных вторичных ДНК-структур.

Получение ВО или его орто-замещенного аналога обычно осуществляют классическим подходом – конденсацией солей 1-метил-4(или 2)-пикколиния и 3-метил-2-метилтиобензотиазолия в присутствии ТЭА [287,309] или путем взаимодействия

соответствующего сульфобетаина с иодидом 1-метил-4-пиколина [310]. В литературе отсутствуют данные о солях 1-метилпиридиния, содержащих несколько метилбензотиазолилметиленовых остатков, хотя известен 2,4-замещенный аналог 1-метилхинолина [311]. Данный 2,4-замещенный аналог был получен с низким выходом 17% классическим подходом, предположительно из-за низкой эффективности второго замещения хинолинового кольца в присутствии достаточно слабого основания - ТЭА ( $pK_a$  10,75). Поэтому для синтеза производных, содержащих два и три метилбензотиазолилметиленовых остатка, вместо ТЭА мы использовали более сильное основание – ДБУ ( $pK_a$   $13,5 \pm 1,5$ ). Соль пиколина, лутидиния или коллидиния **1.1.1** обрабатывали иодидом 3-метил-2-метилтиобензотиазолия **1.1.2** в сухом ДМФА в присутствии ДБУ, получая ВО **1.1.3** или его аналог с одним (**1.1.4**), двумя (**1.1.5** и **1.1.6**) или тремя (**1.1.7**) метилбензотиазолилметиленовыми заместителями в соответствующих положениях 1-метилпиридиниевого кольца (Схема 2.1.1) с выходами 74–88%. Соединения **1.1.3** и **1.1.4** перекристаллизовывали из метанола, соединения **1.1.5**, **1.1.6** и **1.1.7** очищали колоночной хроматографией.

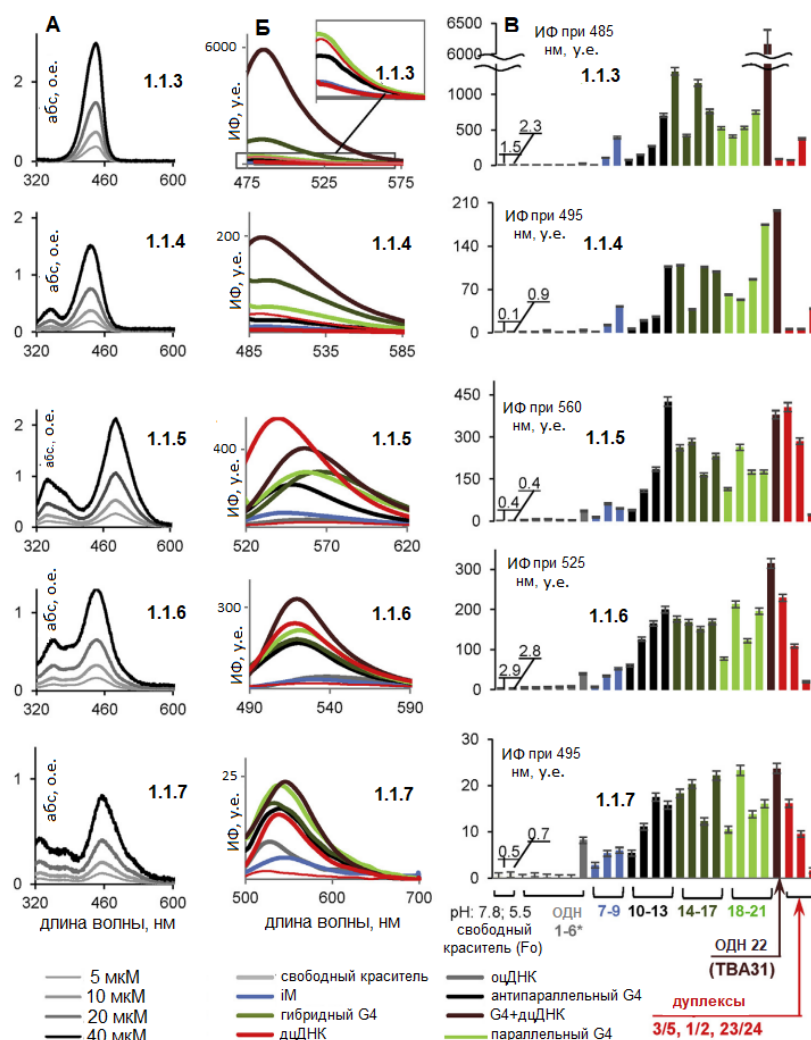


**Схема 2.1.1.** Конденсация солей пиколина, лутидиния или коллидиния с солью 3-метил-2-метилтиобензотиазолия.

Спектры поглощения синтезированных соединений в буферных водных растворах умеренной ионной силы представлены на **Рисунке 2.1.2А**. Отрицательную корреляцию между максимальной интенсивностью поглощения в водных растворах и количеством метилбензотиазолилметиленовых остатков можно объяснить перераспределением заряда при введении дополнительных заместителей. Свободная флуоресценция синтезированных соединений в водных растворах незначительна (**Рисунок 2.1.2Б**), предположительно, из-за свободного вращения заместителей вокруг метинового звена и, как следствие, безызлучательного сброса энергии возбуждения. Предполагается, что в связанном состоянии, например, при взаимодействии с ДНК, ограничение вращения вокруг



метинового звена будет приводить к увеличению квантовых выходов флуоресценции. Мы изучили взаимодействие соединений с различными типами вторичных ДНК-структур, включая оцДНК, дцДНК, иМ и G4. Последовательности ОДН и данные времяпролетной МАЛДИ масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) представлены в **Таблице 2.1.1**.



**Рисунок 2.1.2.** Спектры поглощения свободных красителей (А), спектры флуоресценции (Б) и относительные ИФ (В) красителей в присутствии различных ДНК-структур. Условия: концентрации ОДН и красителя: 1,5 мМ; буфер: 20 мМ Трис-НСl, pH 5,5 (для иМ) или 7,8 (для других ДНК-структур), 100 мМ KCl. Возбуждение при 460 нм (красители 1.1.3 и 1.1.4), 493 нм (краситель 1.1.5), 438 нм (краситель 1.1.6) или 468 нм (краситель 1.1.7). Спектры флуоресценции показаны для репрезентативных ДНК-структур каждого типа - 6, 8, 12, 14, 19, 22, 3/5 (толстые красные линии) и 23/24 (тонкие красные линии). \* Нумерация ОДН в (В) соответствует нумерации в **Таблице 2.1.1**. ИФ в (В) приведены в максимумах эмиссии, характерных для комплексов с параллельными G4. Все измерения проводились в трех повторях, и спектры усреднялись. Планки погрешности в (В) обозначают стандартное отклонение трех измерений.

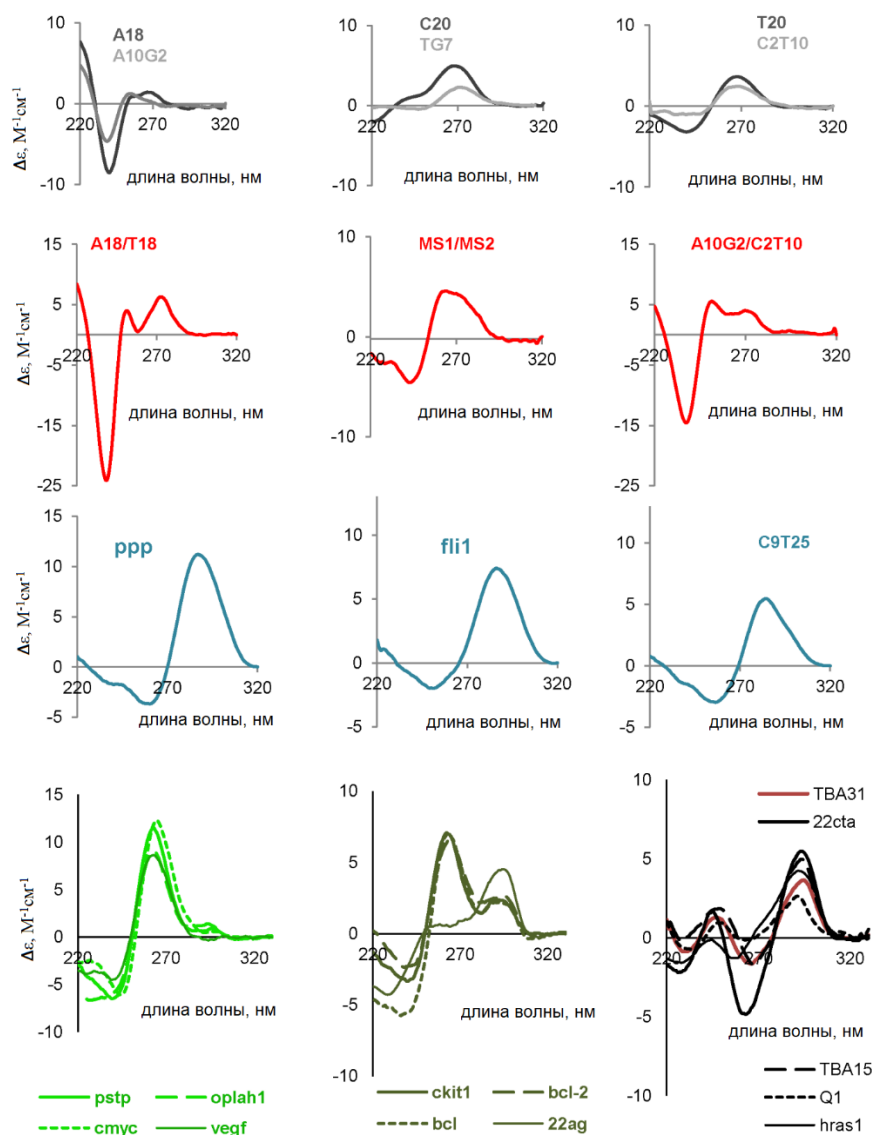
**Таблица 2.1.1.** Последовательности ОДН и данные времяпролетной МАЛДИ масс-спектрометрии.

| Шифр ОДН | номер | Тип структуры <sup>a</sup> | последовательность, 5'→3'           | m/z [M+H] <sup>+</sup> найдено (рассчитано) |
|----------|-------|----------------------------|-------------------------------------|---|
| A10G2    | 1     | оцДНК                      | AAAAAAAAAAGG                        | 3729 (3730)                                 |
| C2T10    | 2     | оцДНК                      | CCTTTTTTTTTT                        | 3559 (3559)                                 |
| T18      | 3     | оцДНК                      | TTTTTTTTTTTTTTTT                    | 5412 (5414)                                 |
| C20      | 4     | оцДНК                      | CCCCCCCCCCCCCCCC                    | 5726 (5327)                                 |
| A18      | 5     | оцДНК                      | AAAAAAAAAAAAAAAA                    | 5577 (5577)                                 |
| TG7      | 6     | оцДНК                      | TGTGTGTGTGTGTGT                     | 4678 (4677)                                 |
| C9T25    | 7     | иМ                         | CCCCCCCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT | 10150 (10147)                               |
| ppp      | 8     | иМ                         | CCCTAGCACCCGCTCCCGCTCCC             | 6802 (6803)                                 |
| Fli1     | 9     | иМ                         | CCCGTCCGCACAGATCCCTAGCGCCC          | 7798 (7799)                                 |
| TBA15    | 10    | a-G4                       | GGTTGGTGTGGTTGG                     | 4727 (4727)                                 |
| Q1       | 11    | a-G4                       | GGTTAGGTTAGGTAGG                    | 5337 (5338)                                 |
| 22CTA    | 12    | a-G4                       | AGGGCTAGGGCTAGGGCTAGGG              | 6926 (6923)                                 |
| hras1    | 13    | a-G4                       | TCGGGTTGCGGGCGCAGGGCACGGGCG         | 8444 (8441)                                 |
| Bcl-2    | 14    | г-G4                       | GGGCGCGGGAGGGAATTGGCGGGG            | 7622 (7622)                                 |
| 22AG     | 15    | г-G4                       | AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG              | 6967 (6968)                                 |
| c-Kit1   | 16    | г-G4                       | GGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG               | 6701 (6699)                                 |
| Bcl      | 17    | г-G4                       | GGGGGCCGTGGGGTGGGAGCTGGGG           | 7950 (7953)                                 |
| VEGF     | 18    | п-G4                       | GGGAGGGTTGGGGTGGG                   | 5443 (5445)                                 |
| c-Myc    | 19    | п-G4                       | TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA              | 7006 (7003)                                 |
| Oplah1   | 20    | п-G4                       | GGGATGGGGCCGGGAGGG                  | 5727 (5728)                                 |
| PSTP     | 21    | п-G4                       | GGTGAATGGGGCAGTGGGGTGGGG            | 7651 (7652)                                 |
| TBA31    | 22    | a-G4+дцДНК                 | CACTGGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCCAGTG     | 9710 (9711)                                 |
| MS1      | 23    | оцДНК                      | CCACCCTACG                          | 2936 (2934)                                 |
| MS2      | 24    | оцДНК                      | CGTAGGGTGG                          | 3124 (3125)                                 |

<sup>a</sup>иМ при pH 5,5, оцДНК при физиологическом pH; п-G4 – параллельный (в основном параллельный) G4; г-G4 – гибридный G4; а-G4 – антипараллельный G4.

Набор дцДНК включал модельные дуплексы со смешанными последовательностями (MS1/MS2) и А/Т-богатые дуплексы (A18/T18 и A10G2/C2T10). Набор неканонических вторичных ДНК-структур включал внутримолекулярные антипараллельные G4 (a-G4) 22CTA [312], hras1 [313], TBA 15 [314] и Q1 [315]; гибридные G4 (г-G4) Bcl [316], 22AG, c-Kit1 и Bcl-2 [73]; параллельные G4 (п-G4) PSTP [316], oplah1 [317], c-Myc и VEGF [73]; внутримолекулярную структуру, состоящую из G4 и дуплексного модулей – TBA31 [318]; внутримолекулярные иМ fli1 и ppp [317] и межмолекулярный иМ C9T25 [319]. Вторичная структура всех ОДН была подтверждена методом КД-спектроскопии, например,

характерные пики при 285, 265 или 295 нм присутствовали в спектрах иМ, п-G4 или а-G4 соответственно [320] (**Рисунок 2.1.3**).



**Рисунок 2.1.3.** КД-спектры ДНК-структур. оцДНК – серый, дцДНК – красный, иМ – синий, параллельный G4 – ярко-зеленые, гибридный G4 – темно-зеленый, антипараллельный G4 – черный (кроме ТВА31, который выделен темно-красным цветом). Молярный круговой дихроизм нормируется на число нуклеотидных остатков. Условия: 20 мМ Трис-НСl, рН 5,5 (для иМ) или 7,8 (для других структур ДНК) и 100 мМ КСl.

Основные параметры флуоресценции соединений в комплексах с оцДНК, дцДНК и неканоническими вторичными ДНК-структурами представлены в **Таблице 2.1.2**. Спектры флуоресценции красителей и гистограммы ИФ в комплексах с различными ДНК-структурами в специфичных для структур максимумах эмиссии представлены на **Рисунке 2.1.2Б и В**, соответственно. Спектры флуоресценции показаны для комплексов красителей

с репрезентативными ДНК-структурами каждого типа, а гистограммы суммируют данные для всех ДНК-структур.

**Таблица 2.1.2.** Параметры поглощения и флуоресценции красителей в свободном состоянии и в комплексах с различными ДНК-структурами.

| Параметры поглощения  | краситель                   |                |                |                |                  |
|---|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|
|   | 1.1.3                       | 1.1.4          | 1.1.5          | 1.1.6          | 1.1.7            |
| Максимум поглощения (нм) в водном растворе                                  | 440<br>(73000) <sup>a</sup> | 440<br>(33000) | 493<br>(49000) | 438<br>(31000) | 468<br>(18000)   |
| Максимум поглощения (нм) в присутствии G4+дцДНК <sup>b</sup>                | 460                         | 445            | 513            | 420, 493       | н/д <sup>b</sup> |
| <b>Параметры флуоресценции</b>  |                             |                |                |                |                  |
| максимум испускания (нм) в присутствии: <sup>b</sup>                        |                             |                |                |                |                  |
| оцДНК   | 485                         | 490-500        | 595-630        | 530-560        | 525-610          |
| иМ (рН 5,5)   | 485                         | 495-510        | 545-595        | 525-545        | 535-555          |
| п-G4  | 485                         | 495            | 560            | 520-530        | 540-545          |
| а-G4  | 485                         | 495            | 555-575        | 520-530        | 540-545          |
| А/Т-богатая дцДНК   | 485                         | 495            | 540            | 515-520        | 525-540          |
| дцДНК со смешанной послед.  | 485                         | 495            | 565            | 530            | 525              |
| Отношение средних ИФ при G4-специфическом максимуме излучения: <sup>г</sup> |                             |                |                |                |                  |
| G4:оц,дцДНК   | 9:1                         | 12:1           | 2:1            | 3:1            | 4:1              |
| G4:АТ-богатая ДНК   | 7:1                         | 13:1           | 1:2            | 1:1            | 1:1              |
| G4:дцДНК со смешанной последовательностью                                   | 2:1                         | 2:1            | 9:1            | 8:1            | 9:1              |
| п-G4:а-G4   | 2:1                         | 2:1            | 1:1            | 1:1            | 1:1              |

Условия: 20 мМ Трис-НСl, рН 5,5 (для иМ) или 7,8 (для других ДНК-структур), 100 мМ КСl.

<sup>a</sup> Коэффициент молярной экстинкции ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) показан в скобках.

<sup>b</sup> п-G4 - параллельный (в основном параллельный) G4; а-G4 - антипараллельный G4; G4+дцДНК – двухмодульная (G4 + дуплекс) структура ТВА31.

<sup>b</sup> нет данных

<sup>г</sup> возбуждение при 460 нм для красителей 1.1.3 и 1.1.4, 493 нм для красителя 1.1.5, 438 (или 493) нм для красителя 1.1.6 и 468 нм для красителя 1.1.7.

На основании полученных результатов можно выделить следующие тенденции:

- стоксовы сдвиги относительно невелики в случае монозамещенных красителей 1.1.3 и 1.1.4 (1.1.4 немного превосходил 1.1.3) и более выражены для ди- и три-замещенных красителей 1.1.5, 1.1.6 и 1.1.7 (особенно большой стоксов сдвиг наблюдается для красителя 1.1.6);

- площади под кривой поглощения в УФ/видимом спектре излучения и средние ИФ красителей в комплексе с ДНК уменьшаются в следующем порядке: **1.1.3 > 1.1.5 и 1.1.6 > 1.1.4 >> 1.1.7**;

- вторичная структура ДНК и/или последовательность ДНК влияет на интенсивность, но не положение максимума испускания монозамещенных красителей **1.1.3** и **1.1.4**;

- дизамещенные красители **1.1.5** и **1.1.6** (и в меньшей степени тризамещенный краситель **1.1.7**) демонстрируют существенную зависимость как ИФ, так и положения максимума эмиссии от последовательности/вторичной структуры ДНК;

- для интегральных ИФ (площади под кривыми на **Рисунке 2.1.2Б**) монозамещенных красителей **1.1.3** и **1.1.4** в комплексах с ДНК наблюдается следующий порядок: параллельный G4 > дцДНК, иМ и антипараллельный G4 > оцДНК. Соответственно изменяются и относительные ИФ в G4-специфичных максимумах (**Рисунок 2.1.2В**), поскольку положение максимумов эмиссии не зависит от ДНК-структуры;

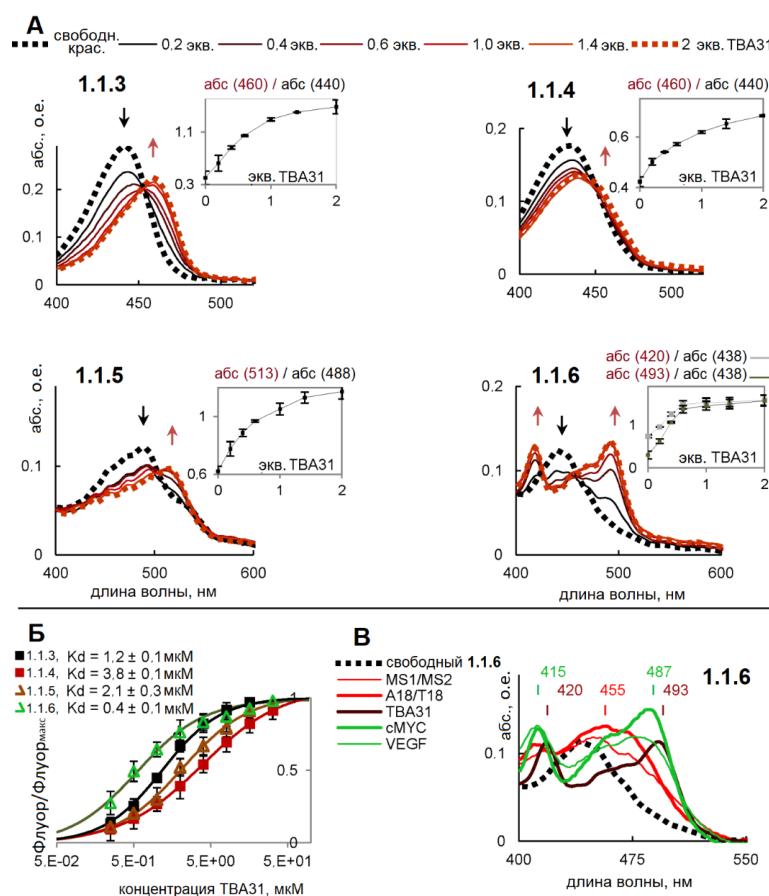
- интегральные ИФ ди- и три-замещенных красителей **1.1.5**, **1.1.6** и **1.1.7** уменьшаются в следующем порядке: А/Т-богатая дцДНК и параллельные G4  $\geq$  иМ, TG7 и антипараллельные G4 > дцДНК со смешанной последовательностью и большая часть оцДНК. Учитывая зависимость максимумов эмиссии от последовательности/вторичной структуры ДНК, распределение интегральных ИФ не эквивалентно распределению относительных интенсивностей в G4-специфичных максимумах, хотя общие тенденции схожи;

- все красители, кроме **1.1.5**, продемонстрировали максимальное увеличение ИФ в комплексе с двухмодульной (а-G4+дцДНК) структурой ТВА31. ИФ в присутствии ТВА31 была особенно высокой в случае красителя **1.1.3**, в 12 раз превышая среднюю ИФ красителя с G4 и дцДНК.

Для монозамещенных красителей **1.1.3** и **1.1.4** данные по эмиссии флуоресценции были получены при возбуждении на длине волны 460 нм, что соответствует приведенному в литературе максимуму поглощения красителя **1.1.3** в комплексах с ДНК [286]. Для ди- и три-замещенных красителей первоначально измеряли эмиссию при возбуждении в максимумах поглощения свободного красителя (**Рисунок 2.1.2А**). При этом ИФ не пропорциональна доле комплекса с ДНК, если максимум поглощения комплекса смещен относительно максимума поглощения свободного красителя.

Для определения константы связывания красителей с ДНК на основании анализа концентрационной зависимости ИФ необходимо возбуждение в изобестической точке, при которой поглощение свободного лиганда и комплекса совпадают. Изобестическую точку

определяли для моно- и ди-замещенных красителей, анализируя изменения их спектров поглощения при титровании раствором двухмодульной ( $\alpha$ -G4+дцДНК) структуры ТВА31, к которой все красители проявляли выраженную чувствительность (**Рисунок 2.1.2Б и В**). Параллельно отслеживали зависимость отношения абсорбции в максимумах комплекса и свободного лиганда от концентрации ДНК. Полученные кривые связывания по данным абсорбционной спектроскопии сравнивали с кривыми связывания по данным флуориметрии, т.е. зависимостью эмиссии красителя от концентрации ДНК при возбуждении в изобестической точке. Результаты показаны на **Рисунке 2.1.4**.

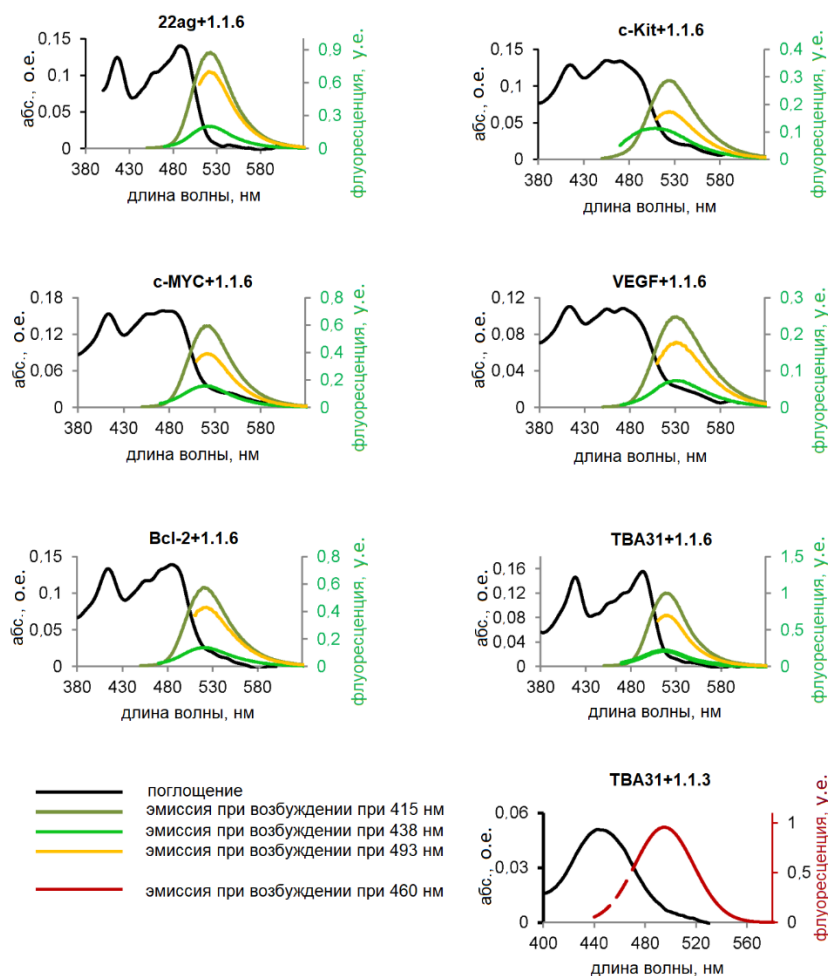


**Рисунок 2.1.4.** Комплексы ДНК-краситель: спектры поглощения и кривые связывания. (А) абсорбционная спектроскопия комплексов в УФ-видимой области: наложенные спектры свободных красителей и комплексов с ТВА31 (основная панель) и изменения относительного поглощения в максимумах, специфичных для свободного красителя и специфичных для комплекса (боковая панель). Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение двух измерений. Условия: 5 мкМ красителя, 20 мМ трис-НСl, pH 7,8, 100 мМ KCl. (Б) Флуориметрия комплексов. Условия: тот же буфер, что и в (А); концентрация красителя 0,5 мкМ. Отслеживание изменения эмиссии флуоресценции при возбуждении в изобестической точке. (В) поглощение красителя **1.1.6** в присутствии дуплексов (MS1/MS2 и A18/T18) и параллельных G4 (с-Мус и VEGF).

Соединение **1.1.7**, наименее перспективное из красителей по поглощению и ИФ, не анализировали. Для красителей **1.1.3**, **1.1.4** и **1.1.5** мы наблюдали незначительные и умеренные батохромные сдвиги максимумов поглощения с изобестическими точками приблизительно при 455 нм (красители **1.1.3** и **1.1.4**) и 500 нм (краситель **1.1.5**). Таким образом, длины волн возбуждений, указанные на **Рисунке 2.1.2А**, достаточно близки к изобестическим точкам. Спектр краситель **1.1.6/ТВА31** более сложен и включает два основных пика и изобестические точки приблизительно при 425 и 445 нм.

Важно отметить, что концентрационная зависимость отношения поглощения в максимумах свободный краситель:комплекс (боковые графики на **Рисунке 2.1.4А**) предполагает константы диссоциации краситель **1.1.3-1.1.6/ТВА31** в низкомикромолярном диапазоне (большая часть красителя связана в конечной точке титрования). Это согласуется с результатами флуорометрии (**Рисунок 2.1.4Б**). Все красители демонстрировали относительно высокое сродство к ТВА31, и краситель **1.1.6** являлся лидером с наблюдаемой  $K_D$  менее 0,5 мкМ. Для данного красителя **1.1.6** были дополнительно проанализированы спектры поглощения в комплексах с другими структурами: п-G4, А/Т-богатой дцДНК и дцДНК со смешанной последовательностью (**Рисунок 2.1.4В**). Спектры отличались друг от друга, однако основные максимумы, специфичные для комплексов с G4 (415–420 нм и 487–493 нм), практически совпадали с максимумами для комплексов соединения с ТВА31.

Мы провели дополнительную оценку относительной чувствительности красителя **1.1.6** к различным структурам G4 при возбуждении в указанных выше специфичных для комплексов максимумах поглощения и получили результаты, в целом аналогичные показанным на **Рисунке 2.1.2В** (возбуждение в максимуме поглощения свободного красителя), тогда как абсолютные ИФ и квантовые выходы флуоресценции была выше. Спектры поглощения и спектры флуоресценции (для различных длин волн возбуждения) комплексов **1.1.6/G4** показаны на **Рисунке 2.1.5**, а соответствующие квантовые выходы флуоресценции (оцененные с использованием ThT-22AG и родамина 6G в качестве эталонов) суммированы в **Таблице 2.1.3**. Учитывая вышеупомянутое значительное усиление флуоресценции **1.1.3** при комплексообразовании с ТВА31, мы также оценили квантовый выход флуоресценции **1.1.3/ТВА31** ( $\Phi^{F1.1.3/ТВА31} = 0,643$ ; спектры поглощения и флуоресценции представлены на **Рисунке 2.1.5**). Квантовые выходы флуоресценции свободных красителей не могут быть точно рассчитаны, но не превышают 0,004 как для **1.1.3**, так и для **1.1.6**.



**Рисунок 2.1.5.** Спектры поглощения и флуоресценции комплексов краситель **1.1.6**-ДНК для расчета квантового выхода. Условия: концентрации ОДН и красителя: 5 мкМ, 25 мМ трис-НCl, рН 7,8, 100 мМ KCl. Все измерения проводились в трех повторах (отклонение не превышало 5%), и спектры усреднялись.

**Таблица 2.1.3.** Квантовые выходы флуоресценции **1.1.6** и ThT в комплексах с G4.

| шифр G4 | Квантовый выход флуоресценции <sup>а</sup> |                       |                       |      |
|---------|--|-----------------------|-----------------------|------|
|         | <b>1.1.6</b> (415 нм) <sup>б</sup>         | <b>1.1.6</b> (438 нм) | <b>1.1.6</b> (493 нм) | ThT  |
| 22AG    | 0,27                                       | 0,12                  | 0,28                  | 0,25 |
| c-Kit1  | 0,10                                       | 0,06                  | 0,12                  | 0,42 |
| c-Myc   | 0,16                                       | 0,06                  | 0,16                  | 0,25 |
| VEGF    | 0,11                                       | 0,04                  | 0,13                  | 0,15 |
| Bcl-2   | 0,18                                       | 0,07                  | 0,21                  | 0,07 |
| TBA31   | 0,26                                       | 0,11                  | 0,26                  | 0,52 |

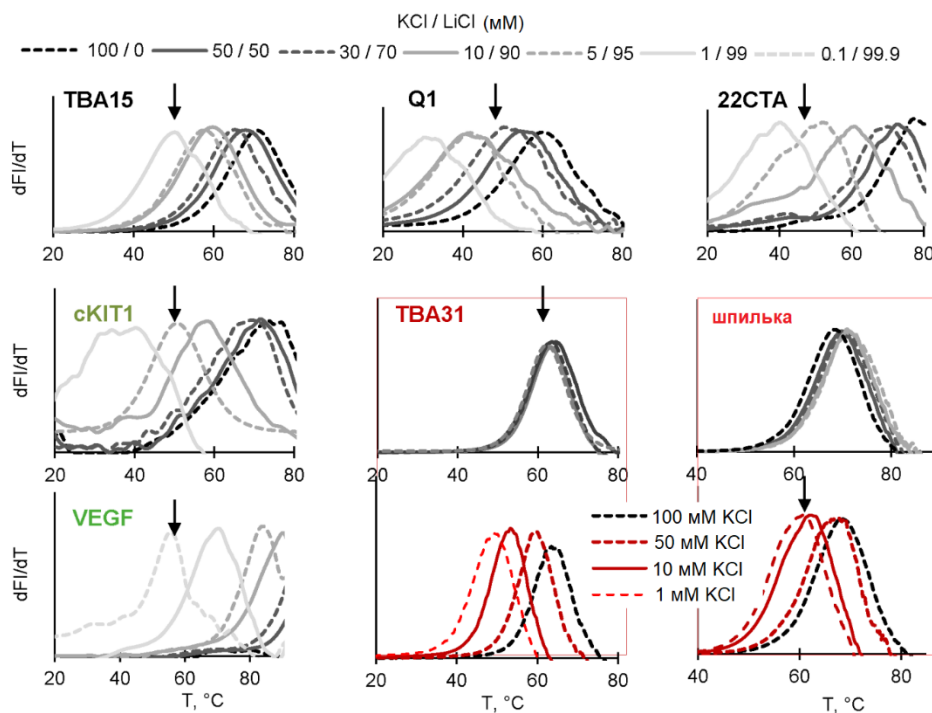
<sup>а</sup>Условия: 20 мМ трис-НCl, рН 7,8 и 100 мМ KCl. Концентрации ОДН и лиганда: 5 мкМ. В качестве эталонов использовали родамин 6G и ThT-22AG.

<sup>б</sup>длина волны возбуждения.

Затем мы провели исследование влияния красителей на термическую стабильность G4. Квадруплексы с различной топологией (п-G4, а-G4 и г-G4), перечисленные в **Таблице**



**2.1.1,** в отсутствие красителей имеют существенно отличающиеся значения температур плавления ( $T_{пл}$ ) в используемом нами для оценки спектральных свойств рабочем буфере, содержащем 100 мМ KCl. Поскольку термодинамически неустойчивые структуры в целом более чувствительны к стабилизирующим лигандам, чем структуры с изначально высокой стабильностью, анализ роли топологии оптимально проводить на выборке квадруплексов различных типов, но с сопоставимыми  $T_{пл}$ . Для получения сопоставимых величин  $T_{пл}$  (в пределах 50–60°C) мы провели предварительное плавление, фиксируя ионную силу раствора и варьируя соотношение  $K^+/Li^+$ . Учитывая, что ионы калия стабилизируют G4, а ионы лития дестабилизируют, мы ожидали резкую зависимость значений  $T_{пл}$  от соотношения  $K^+/Li^+$ . Для экономии времени и материалов, мы проводили анализ плавления по FRET в планшетном формате: G4 были мечены на 3'- и 5'-концах Black Hole Quencher-1 (BHQ1) и 6-карбоксифлуоресцеином (FAM), что обеспечило тушение флуоресценции FAM в структурированном состоянии и позволило регистрировать плавление как увеличение ИФ FAM. Из исходного набора структур были выбраны шесть G4, включая двухмодульную (G4+дцДНК) структуру TBA31, с однозначным кооперативным плавлением в варианте, меченном FAM/BHQ1. Первые производные полученных кривых плавления в буферах разного состава показаны на **Рисунке 2.1.6**. Состав буферов, выбранных для последующих экспериментов по плавлению в присутствии красителей, указаны в **Таблице 2.1.4**. Интересно, что FAM/BHQ1-меченный TBA31 был единственной структурой, у которой не наблюдалось явной зависимости  $T_{пл}$  от соотношения  $K^+/Li^+$ . Однако  $T_{пл}$  сильно зависела от ионной силы раствора (красные кривые на **Рисунке 2.1.6**). Аналогичное поведение наблюдалось для контрольной FAM/BHQ1-меченной шпильки без G4 модуля. Мы пришли к выводу, что анализ FRET-плавления дает информацию только о дуплексном модуле структуры TBA31.



**Рисунок 2.1.6.** Плавление ДНК-структур в разных буферах. Зависимость термостабильности ДНК-структур от состава буфера (соотношение  $K^+/Li^+$  для G4) или ионной силы (для TBA31 и шпильки). Шпилька: FAM-ТАТАГСТАТТТТТАТАГСТАТА-ВНQ1. Первые производные кривых плавления получали из кривых изменения ИФ при плавлении ДНК-структур, меченных FAM и ВНQ1. Концентрация меченого ОДН: 3 мкМ. Условия: 20 мМ Трис-НСl, pH 7,8 и KCl/LiCl; Концентрации KCl/LiCl указаны в подписях к рисункам. Стрелки указывают на буфер, обеспечивающий плавление каждой ДНК-структуры в диапазоне приблизительно 50–60°C в отсутствие красителей.

**Таблица 2.1.4.** Сводная информация для экспериментов по плавлению: выбранные условия и значения  $T_{пл}$ .

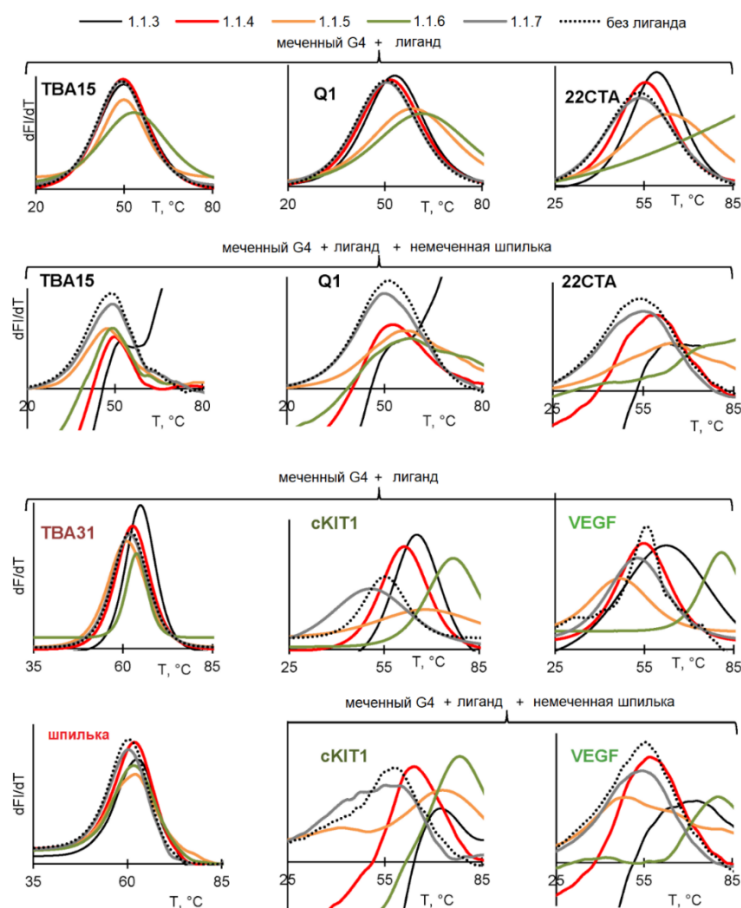
|                    |           | T <sub>пл</sub> ±1, °C |  |         |         |           |         |
|--------------------|-----------|------------------------|--|---------|---------|-----------|---------|
| шифр               | KCl/LiCl  | Без                    | + 3 экв. красителя (+3 экв. красителя и 3 экв. немеченной шпильки) |         |         |           |         |
| G4                 | конц., mM | красителя              | 1.1.3  | 1.1.4   | 1.1.5   | 1.1.6     | 1.1.7   |
| VEGF               | 0,1/99,9  | 54                     | 62 (66)  | 55 (55) | 47 (49) | 81 (79)   | 53 (54) |
| c-Kit1             | 7/93      | 55                     | 67 (69)  | 64 (64) | 69 (74) | 77 (78)   | 56 (58) |
| TBA15              | 1/99      | 50                     | 50 (50)  | 50 (48) | 48 (47) | 51 (48)   | 50 (48) |
| Q1                 | 30/70     | 52                     | 54 (52)  | 52 (52) | 57 (56) | 59 (54)   | 52 (51) |
| 22СТА              | 5/95      | 55                     | 61 (60)  | 59 (56) | 64 (66) | ≥85 (≥80) | 55 (53) |
| TBA31 <sup>a</sup> | 5/95      | 64                     | 65   | 64      | 62      | 67        | 64      |
| шпилька            | 1/0       | 60                     | 63   | 62      | 62      | 62        | 60      |

<sup>a</sup>Для TBA31  $T_{пл}$  в основном отражает стабильность дуплексного модуля.

Кривые плавления (первые производные) меченых G4, TBA31 и шпильки, полученные в выбранных условиях в присутствии красителей, показаны на **Рисунке 2.1.7** (графики «меченный G4 + лиганд»), соответствующие значения  $T_{пл}$  приведены в **Таблице 2.1.4**, а стабилизирующие эффекты ( $\Delta T_{пл}$ ) суммированы в виде радиальной диаграммы на **Рисунке 2.1.8А**. Все красители оказывали незначительное влияние на TBA31, шпильку (которая в этом анализе рассматривают как контрольная дцДНК) и а-G4 (TBA15 и Q1). Соединение **1.1.6** было лидером с выраженным ( $\Delta T_{пл} +20 - +30$  °C) стабилизирующим эффектом на п/г-G4 VEGF и 22AG, а также а-G4 22СТА. Наблюдаемая разница в стабилизирующих эффектах моно- и ди-замещенных красителей может быть объяснена различной аффинностью связывания ДНК (исходя из кривых связывания, показанных на **Рисунке 2.1.4Б**, наибольшая аффинность предполагается для красителя **1.1.6**).

Далее мы повторили все эксперименты по FRET-плавлению меченых G4 в присутствии избытка потенциального конкурента за связывание лиганда – немеченой шпильки (соотношение G4:шпилька = 1:3), чтобы примерно оценить специфичность лигандов (**Рисунок 2.1.7**, графики «меченный G4 + лиганд + немеченная шпилька» для кривых плавления и **Таблицу 2.1.4** для значений  $T_{пл}$ ). Значения  $T_{пл}$ , полученные в присутствии и в отсутствие немеченой шпильки, совпадали в пределах погрешности эксперимента (за исключением смеси FAM-VEGF-BHQ1 и красителя **1.1.3**, для которой шпилька увеличивала наблюдаемое значение  $T_{пл}$  G4 примерно на 4 °C). Для смесей FAM-G4-BHQ1 + немеченая шпилька + краситель **1.1.3** (и, в значительно меньшей степени, краситель **1.1.4**) кривые FRET-плавления, по-видимому, накладываются на профили температурной зависимости комплексов краситель-ДНК: наблюдаемая ИФ при специфическом для FAM максимуме (520 нм) увеличивалась при 20°C и псевдоэкспоненциально уменьшалась при нагревании. Это можно объяснить низкоаффинным неспецифическим связыванием избытка красителя со шпилькой (хотя максимумы возбуждения и эмиссии красителя **1.1.3** отличаются от максимумов возбуждения и эмиссии для FAM (данные представлены в **Таблице 2.1.2**), наблюдается остаточная флуоресценция при 520 нм). В любом случае, артефакты с красителем **1.1.3** явно несвязаны с плавлением G4 или шпильки. В выбранных условиях, т.е. в присутствии 100 мМ (LiCl + KCl), шпилька стабильна в интервале температур плавления G4 ( $T_{пл}^{шпилька} = 70–72$  °C, **Рисунок 2.1.6**). Таким образом, нельзя исключить образование нестабильных комплексов с дцДНК при низких температурах (особенно для красителя **1.1.3**), но в целом результаты исследований плавления подтверждают G4-специфическое стабилизирующее действие красителей. Краситель **1.1.6** представляется особенно перспективным и заслуживает дальнейшего изучения в качестве G4 стабилизатора.

Чтобы оценить перспективность красителя **1.1.6** в качестве «разгорающегося» зонда, мы сравнили его квантовые выходы флуоресценции с квантовыми выходами флуоресценции ThT в комплексах с теломерным G4 22AG и известными G4 из промоторов онкогенов *c-Myc*, *c-Kit*, *VEGF* и *Bcl-2* [73]. Данные G4 ранее использовались для проверки применимости ThT в качестве G4-чувствительного «разгорающегося» зонда [305]. Спектры поглощения и флуоресценции красителя **1.1.6** в комплексах с G4 показаны на **Рисунке 2.1.5**, а квантовые выходы флуоресценции приведены в **Таблице 2.1.3**. В случае *c-Myc*, *c-Kit* и *VEGF* краситель **1.1.6** уступал ThT, но в комплексах с 22AG и *Bcl-2* его квантовые выходы флуоресценции были несколько выше и существенно выше, чем у ThT. Можно заключить, что краситель **1.1.6** и ThT имеют сопоставимые средние квантовые выходы в комплексах с G4 различного типа.



**Рисунок 2.1.7.** Влияние красителей на термическую стабильность ДНК-структур. Первые производные кривых плавления, полученные из кривых изменения ИФ при плавлении ДНК-структур, меченных FAM и BNQ1, в присутствии только красителей или красителей и немеченой шпильки в выбранных условиях. Концентрация меченого ОДН: 3 мкМ, концентрации красителя и немеченой шпильки (TATAGCTATTTTATAGCTATA): 10 мкМ. Условия: 20 мМ Трис-НСl, рН 7,8, 1 мМ KCl для шпильки или 100 мМ (KCl+LiCl) для других ОДН), соотношение  $K^+/Li^+$  приведено в **Таблице 2.1.4**.

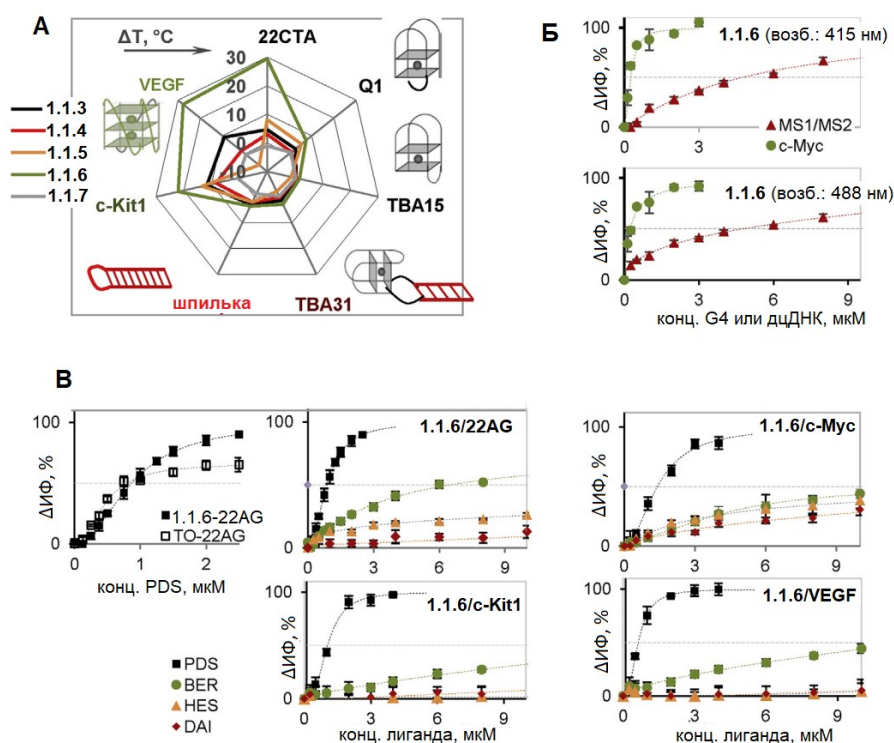
Что касается практического применения «разгорающихся» зондов, таких как ThT или TO, одним из популярных вариантов является тест на вытеснение флуоресцентного интеркалятора (ВФИ). Он позволяет оценивать относительное сродство/селективность G4-лигандов и был адаптирован для быстрого профилирования лигандов в стандартных форматах, совместимых с системой ПЦР в реальном времени [321]. Профилирование предполагает титрование комплекса ДНК-краситель потенциальными лигандами, а оценка селективности на основе ВФИ предполагает титрование того же комплекса различными ДНК-структурами.

Сначала мы проверили селективность красителя **1.1.6** к G4 по сравнению с дцДНК. Повышающуюся концентрацию дцДНК MS1/MS2 использовали для вытеснения красителя из комплекса 1:1 с с-Мус G4 и наоборот (**Рисунок 2.1.8Б**). Регистрация вытеснения по изменениям ИФ красителя **1.1.6** в максимуме эмиссии (525 нм, **Рисунок 2.1.2Б**) при возбуждении при 415 и 488 нм (максимумы поглощения в комплексе с ДНК, **Рисунок 2.1.4В**) дала в целом схожие результаты:  $DC_{50}$  (с-Мус) =  $0,3 \pm 0,2$  мМ и  $DC_{50}$  (MS1/MS2) = 5 мМ (стехиометрия связывания, по-видимому, различна). Полученные результаты подтверждают, что краситель **1.1.6** связывается преимущественно с G4 в присутствии дцДНК со смешанной последовательностью.

Чтобы проверить применимость красителя **1.1.6** для профилирования потенциальных G4-лигандов на основе ВФИ, мы сначала убедились, что он достаточно эффективно вытесняется из комплекса с 22AG известным G4-лигандом PDS [322,323]. Результаты показаны на **Рисунке 2.1.8В** (левая панель). Анализ проводили в условиях, описанных ранее для TO [321] (кривая замещения TO PDS показана для справки). Затем мы провели профилирование серии лигандов, используя комплексы красителя **1.1.6** с 22AG, с-Мус, с-Kit1 и VEGF. Серия лигандов включала PDS в качестве положительного контроля, который взаимодействует со всеми G4 [324] и, таким образом, ожидалось, что он вытеснит краситель **1.1.6** из всех комплексов; природный алкалоид берберин (BER), который, как сообщается, связывается с теломерным G4 в диапазоне низких микромолярных концентраций [325,326], а также флавоноиды гесперидин (HES) и даидзеин (DAI), для которых сообщалось умеренное и низкое сродство к G4 соответственно [327]. PDS эффективно вытеснял краситель **1.1.6** из всех комплексов (**Рисунок 2.1.8В**):  $DC_{50}$  (VEGF) =  $0,6 \pm 0,1$  мкМ;  $DC_{50}$  (22AG и с-Kit1) =  $1,0 \pm 0,2$  мкМ;  $DC_{50}$  (с-Мус) =  $1,4 \pm 0,2$  мкМ. BER существенно уступал PDS:  $DC_{50}$  (22AG) =  $6 \pm 2$  мкМ;  $DC_{50}$  (с-Мус) = 10 мкМ;  $DC_{50}$  (с-Kit1 и VEGF) > 10 мкМ. Флавоноиды HES и DAI в некоторой степени конкурировали с красителем **1.1.6** за связывание с с-Мус и 22AG ( $DC_{50}$  > 10 мкМ; в соответствии с ранее опубликованными данными HES превосходил DAI [327]), но давали незначительные

эффекты с c-Kit1 и VEGF. Таким образом, значения  $DC_{50}$  изменялись в следующем порядке:  $PDS > BER > HES \geq DAI$ . Полученные результаты качественно соответствуют имеющимся в литературе данным [324–327]. Возможно, что разные способы связывания исследуемых лигандов объясняют различную эффективность вытеснения красителя **1.1.6**; однако этот фактор является общей проблемой и должен учитываться во всех тестах ВФИ. Наконец, следует отметить, что наличие двух максимумов в спектрах поглощения комплекса красителя **1.1.6** с ДНК (**Рисунок 2.1.5**) и тот факт, что квантовые выходы флуоресценции для этих двух максимумов близки (**Таблица 2.1.3**), могут обеспечить преимущества в тестах ВФИ. Это обеспечивает определенную гибкость в выборе длины волны возбуждения, что может иметь решающее значение, когда необходимо избежать перекрывания спектров вытесняемого красителя и профилируемых лигандов. Например, мы проводили анализы с PDS, HES и DAI при возбуждении красителя **1.1.6** при 415 нм, тогда как в случае BER спектры были получены при возбуждении при 493 нм.

Можно констатировать, что дизамещенный аналог ВО **1.1.6** выглядит перспективным лигандом для стабилизации параллельных G4, профилирования других лигандов методом ВФИ и флуоресцентного зондирования G4 в присутствии оцДНК и дцДНК со смешанной последовательностью. Однако он не способен эффективно различать G4 и A/T-богатые дцДНК. Напротив, монозамещенные красители **1.1.3** и **1.1.4** предпочтительны для распознавания G4 и A/T-богатых дцДНК, но не различают G4 и дцДНК со смешанной последовательностью. Мы связываем принципиальную разницу в специфичности к последовательностям би- и монозамещенных красителей с различиями в способах связывания с дцДНК. Серповидная структура красителя **1.1.6** типична для соединений, связывающихся с бороздкой [287,328]. Такие лиганды обычно проявляют селективность в отношении AT-богатых дуплексов за счет фактора геометрии бороздок (в AT-богатых дуплексах малые бороздки глубокие и узкие и имеют выраженную пропеллерную закрутку [329]). Для монозамещенных красителей **1.1.3** и **1.1.4** мы не исключаем интеркаляцию между гетероциклическими основаниями в дуплексах.



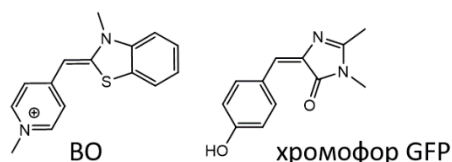
**Рисунок 2.1.8.** Взаимодействие изучаемых красителей с G4 различного типа. (А) Влияние красителей на термическую стабильность ( $\Delta T_{пл}$ ) FAM/BNQ1-меченных G4 и контрольной шпильки, определенную в экспериментах по плавлению с регистрацией изменения ИФ FAM. Условия: концентрации ОДН и красителя: 3 и 10 мкМ соответственно; 20 мМ Трис-НСl, pH 7,8 и 1 мМ KCl (для шпильки) или 100 мМ (KCl + LiCl) для G4. Соотношение  $K^+/Li^+$ : 0,1/99,9 (VEGF), 1/99 (TBA15), 5/95 (TBA31 и 22CTA), 7/93 (c-Kit1), 30/70 (Q1), выбранные соотношения  $K^+/Li^+$  обеспечили сопоставимые значения  $T_{пл}$  в отсутствие красителей. Более подробная информация приведена на **Рисунке 2.1.6** и в **Таблице 2.1.4**. (Б) ВФИ-тест для проверки селективности красителя **1.1.6** к G4 по сравнению с дцДНК. Зеленые кривые получены путем титрования комплекса MS1/MS2-краситель **1.1.6** в соотношении 1:1 (концентрация 1 мМ) раствором с-Мус G4, и вытеснение красителя **1.1.6** регистрировали по увеличению ИФ при возбуждении в 415 или 488 нм. Красные кривые показаны для обратных экспериментов, в которых комплекс с-Мус G4-краситель **1.1.6** титровали MS1/MS2, с регистрацией уменьшения ИФ. (В) Тест с вытеснением флуоресцентного интеркалятора для профилирования лигандов. Левый график: краситель **1.1.6** или TO вытесняли из комплекса с 22AG (0,25 мкМ 22AG и 0,5 мкМ краситель **1.1.6** или TO) PDS. Вытеснение отслеживали по изменению ИФ красителя **1.1.6** и TO в максимумах эмиссии (540 и 520 нм соответственно) при возбуждении в 493 нм. Другие графики: краситель **1.1.6** вытесняли из комплексов с G4 (0,25 мкМ G4 и 0,5 мкМ краситель **1.1.6**) PDS, BER, HES и DAI. Вытеснение отслеживали по изменению ИФ красителя **1.1.6** в 520 нм при возбуждении в 415 нм (в анализах с PDS, HES и DAI) или 493 нм (в анализах с BER). Условия в (Б) и (В): 20 мМ трис-НСl, pH 7,8, 100 мМ KCl. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение трех измерений.

Таким образом, мы впервые оценили способность ВО и его впервые синтезированных аналогов выступать в качестве флуоресцентных зондов для обнаружения различных вторичных структур нуклеиновых кислот. Хотя полученные соединения не способны надежно различать топологию G4, лидерные соединения **1.1.3**, **1.1.4** и **1.1.6** в среднем превосходят ThT [307] и TO [291] по способности отличать G4 от других вторичных структур по изменению ИФ.

При изучении спектральных свойств ряда несимметричных цианиновых красителей выше, мы обнаружили, что ВО (краситель **1.1.3**) демонстрирует значительное увеличение квантового выхода флуоресценции при связывании с ДНК-структурой TBA31. Структура содержит G4 (TBA15), окруженный двумя частично комплементарными цепями и, по-видимому, является двухмодульной [318]. Таким образом, TBA15 является подходящим структурным элементом для изучения влияния присоединения дуплексных модулей различной длины на изменение флуоресцентных свойств флуорогенных красителей при их связывании с полученными таким образом структурами. Такие пары флуорогенных красителей и активирующих флуоресценцию ДНК-структур могут быть использованы в качестве репортерных элементов для визуализации поверхности раковых клеток. Например, комбинация репортерной цепи, несущей G4-образующую последовательность и активирующей флуорогенный аналог хромофора красного флуоресцентного белка, и аптамерной цепи *sgc8* [330], нацеленной на протеинтирозинкиназу-7 (PTK7), позволила визуализировать линию Т-клеток острого лимфобластного лейкоза (ALL) с высокой экспрессией данной киназы [331]. Еще одним примером являются гибридизационные зонды с внешней репортерной молекулой, например, пара кристаллического фиолетового в качестве репортера и двухмодульного (G4+оцДНК) сенсора на последовательность, комплементарную оцДНК-фрагменту [332].

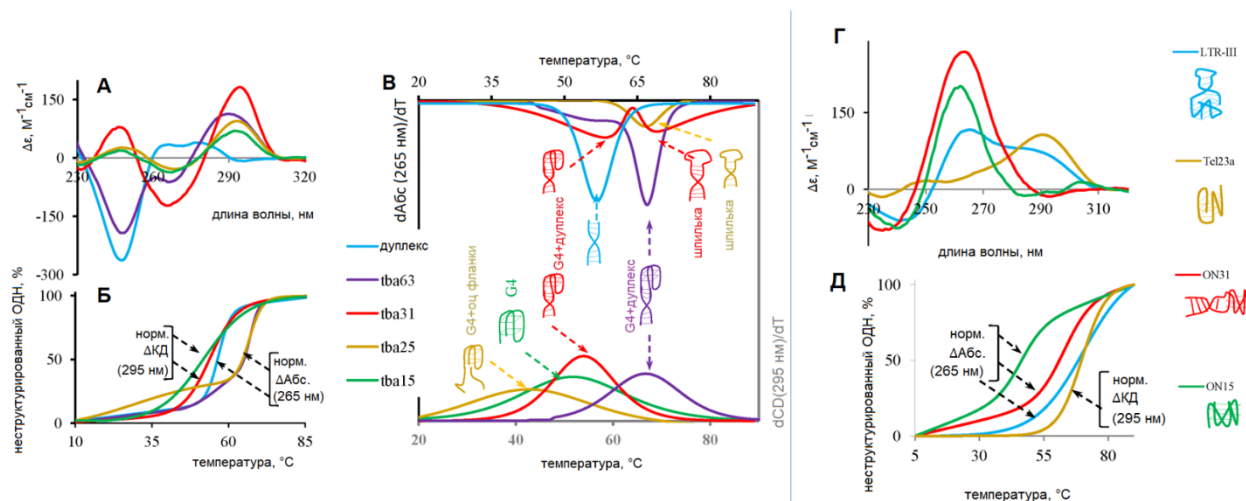
Вдохновленные структурным сходством несимметричного цианинового красителя ВО с хромофорами флуоресцентных белков (например, GFP) (**Рисунок 2.1.9**), мы решили оценить изменение ИФ ряда аналогов хромофора GFP при добавлении TBA31 в сравнении с TBA15 без дополнительного дуплексного модуля. Мы также варьировали длину дуплексного фрагмента, соединенного с G4 модулем, чтобы выяснить, может ли длина и, соответственно, стабильность дуплексного модуля влиять на ИФ красителей. Кроме того, мы исследовали параметры флуоресценции аналогов хромофора GFP в присутствии других G4, содержащих дополнительный стабилизирующий модуль (дуплекс для LTR-III или тройное экпирование для Tel32a).





**Рисунок 2.1.9.** Структура ВО и хромофора GFP.

Антитромбиновый аптамер TBA15 образует антипараллельный двухполочный G4, а TBA31 представляет собой аналог TBA15 с дополнительным дуплексным модулем. Используя метод КД-спектроскопии, мы показали, что обе структуры были правильно собраны в используемых в исследовании условиях. Характерные пики при 295 нм (положительный) и 265 нм (отрицательный) подтвердили наличие антипараллельной структуры G4, тогда как отрицательный пик при 240 нм указывали на наличие дуплексного фрагмента для TBA31 (**Рисунок 2.1.10А**).



**Рисунок 2.1.10.** Вторичные структуры олигонуклеотидов: КД-спектры и кривые плавления. (А) КД-спектры дуплекса, ТВА и его производных дезокси-ряда. (Б) Кривые плавления дуплекса, ТВА и его производных дезокси-ряда. (В) Первые производные кривых плавления дуплекса, ТВА и его производных дезокси-ряда и схематические изображения их вторичных структур. (А-В) имеют общую легенду. (Г) КД-спектры ON31, ON15, LTR-III и Tel23a и схематические изображения их возможных вторичных структур. (Д) Кривые плавления ON31, ON15, LTR-III и Tel23a. (Г) и (Д) имеют общую легенду. КД-спектры регистрировали при 5°C. Концентрации олигонуклеотидов составляли 2,5 мкМ (TBA63, TBA31 и ON31), 3,5 мкМ (TBA25 и LTR-III) или 5 мкМ (TBA15, Tel23a и ON15). Изменения  $\Delta\text{КД}/\text{Абс.}$  нормализовали (разделяли на  $\Delta_{\text{макс}}$ ) для расчета доли неструктурированного олигонуклеотида.

Чтобы охарактеризовать термическую стабильность, мы провели эксперименты по плавлению (**Рисунок 2.1.10Б и В, Таблица 2.1.5**). Регистрация изменения амплитуды на КД-спектрах при 295 нм (максимум, специфичный для антипараллельных G4) привела к

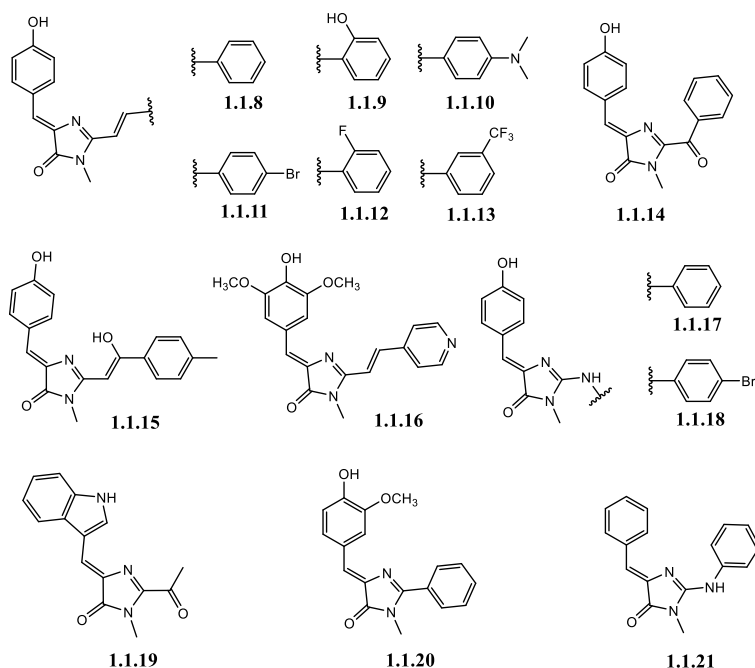
получению монофазных кривых плавления для ТВА15 и ТВА31. В то же время регистрация величины поглощения при 265 нм привела к получению двухфазной кривой для ТВА31. Основной перегиб, наблюдаемый как на КД-кривых (295 нм), так и на кривых поглощения (265 нм), мы связываем с плавлением двухмодульной (G4+дуплексной) структуры. Второй (незначительный) перегиб на кривой поглощения (265 нм) можно отнести к примеси шпилечной структуры (**Рисунке 2.1.10Б**).

**Таблица 2.1.5.** ОДН последовательности и температуры плавления образуемых ими структур.

| шифр           | последовательность (5'→3')  | T <sub>пл</sub> °C      |
|----------------|---|-------------------------|
| <b>ТВА15</b>   | GGTTGGTGTGGTTGG   | 53±1                    |
| <b>ТВА25</b>   | TGGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCCA   | 45±2; 65±2 <sup>a</sup> |
| <b>ТВА31</b>   | CACTGGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCCAGTG                                     | 54±3; 66±1 <sup>a</sup> |
| <b>ТВА63</b>   | ATAAAATAAAAAATTACACTGGTAGGTTGGTGTGGTTGGGGCCA<br>GTGTAATTTTTTATTTTAT | 57±3; 67±1 <sup>a</sup> |
| <b>ОН1</b>     | ATAAAATAAAAAATTACACTGG  | 57±1                    |
| <b>ОН2</b>     | CCAGTGTAATTTTTTATTTTAT  |                         |
| <b>ОН15</b>    | r(GGUUGGUGUGGUUGG)  | 47±2                    |
| <b>ОН31</b>    | r(CACUGGUAGGUUGGUGUGGUUGGGGCCAGUG)                                  | 63±1                    |
| <b>LTR-III</b> | GGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACTGGGG  | 71±2                    |
| <b>Tel23a</b>  | AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGT   | 69±1                    |

<sup>a</sup>двухфазное плавление.

Сравнительный анализ увеличения ИФ аналогов хромофора GFP после смешения с эквимоллярным количеством ОДН ТВА15 и ТВА31 позволил оценить чувствительность флуорофоров к наличию дополнительного дуплексного модуля. Среди 83 протестированных аналогов хромофора GFP 14 соединений показали чувствительность (**Рисунок 2.1.11, Таблица 2.1.6**). Взаимодействие с ТВА15 G4 приводило только к 2-3-кратному увеличению ИФ, тогда как смешение с двухмодульным (дуплекс+G4) ТВА31 давало 7-20-кратное увеличение ИФ (**Рисунок 2.1.12, Таблица 2.1.6**).



**Рисунок 2.1.11.** Структуры аналогов хромофора GFP, проявивших чувствительность к наличию дуплексного модуля.

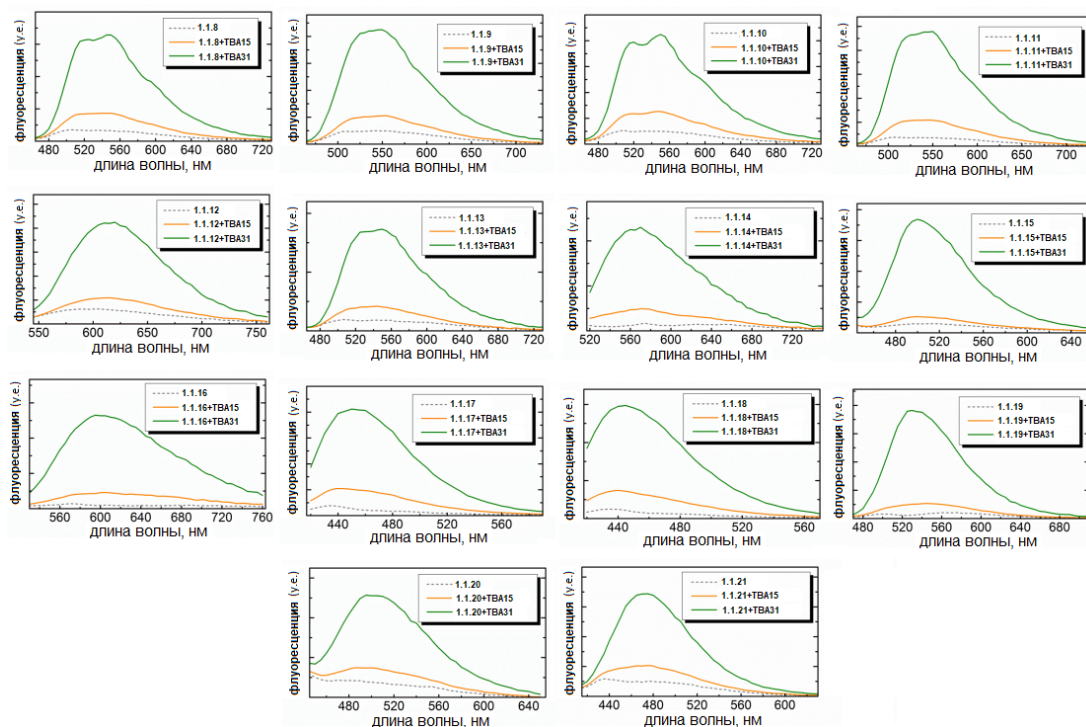
**Таблица 2.1.6.** Увеличение ИФ некоторых аналогов хромофора GFP при смешивании с олигонуклеотидами.

| соединение №      | Увеличение ИФ <sup>a</sup> |         |           |           |         |           |         |           |           |
|-------------------|----------------------------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|-----------|
|                   | TBA31                      | TBA 15  | TBA25     | TBA63     | OH1+2   | OH31      | OH15    | LTR-III   | Tel23a    |
| <b>1.1.3 (BO)</b> | 2708                       | 34      | -         | -         | -       | 1240      | 260     | 54        | -         |
| <b>1.1.8</b>      | 7,9±0,1                    | 2,2±0,1 | 15,9±0,24 | 2,3±0,1   | 1,1±0,1 | 2,7±0,1   | 1,7±0,1 | 3,0±0,1   | 2,5±0,1   |
| <b>1.1.9</b>      | 7,4±0,1                    | 2,0±0,1 | 11,8±0,20 | 2,9±0,1   | 1,2±0,1 | 2,7±0,1   | 1,7±0,1 | 5,2±0,1   | 3,5±0,1   |
| <b>1.1.10</b>     | 7,5±0,2                    | 2,3±0,0 | 14,9±0,21 | 2,8±0,1   | 1,1±0,0 | 3,2±0,1   | 1,8±0,1 | 5,1±0,1   | 3,4±0,1   |
| <b>1.1.11</b>     | 9,9±0,1                    | 2,5±0,0 | 23,0±0,25 | 3,2±0,0   | 1,1±0,1 | 3,1±0,1   | 2,4±0,1 | 3,9±0,1   | 3,7±0,1   |
| <b>1.1.12</b>     | 12,3±0,13                  | 2,6±0,1 | 20,6±0,29 | 2,8±0,1   | 1,1±0,1 | 3,6±0,1   | 2,0±0,1 | 8,1±0,11  | 4,7±0,07  |
| <b>1.1.13</b>     | 7,9±0,2                    | 2,0±0,1 | 8,8±0,2   | 1,8±0,1   | 1,1±0,1 | 2,5±0,0   | 1,5±0,1 | 4,2±0,1   | 2,8±0,0   |
| <b>1.1.14</b>     | 10,1±0,16                  | 2,4±0,0 | 8,7±0,2   | 1,4±0,1   | 1,5±0,0 | 6,2±0,1   | 6,1±0,1 | 3,4±0,1   | 2,6±0,1   |
| <b>1.1.15</b>     | 18,8±0,28                  | 2,1±0,1 | 19,1±0,21 | 12,1±0,15 | 4,0±0,1 | 6,2±0,1   | 2,1±0,0 | 3,4±0,1   | 12,4±0,19 |
| <b>1.1.16</b>     | 16,5±0,18                  | 3,3±0,1 | 11,4±0,18 | 4,2±0,1   | 1,2±0,0 | 6,8±0,1   | 2,6±0,1 | 14,9±0,20 | 6,2±0,1   |
| <b>1.1.17</b>     | 12,4±0,20                  | 3,3±0,1 | 10,1±0,10 | 5,6±0,1   | 1,3±0,0 | 3,6±0,1   | 1,9±0,1 | 2,7±0,1   | 2,0±0,0   |
| <b>1.1.18</b>     | 12,1±0,15                  | 3,0±0,1 | 10,6±0,13 | 2,0±0,1   | 1,1±0,0 | 3,3±0,0   | 1,4±0,1 | 2,3±0,1   | 2,7±0,0   |
| <b>1.1.19</b>     | 20,5±0,22                  | 2,9±0,1 | 31,7±0,40 | 4,8±0,1   | 1,9±0,0 | 19,0±0,25 | 7,1±0,1 | 4,9±0,1   | 7,1±0,2   |
| <b>1.1.20</b>     | 8,2±0,1                    | 2,0±0,1 | 14,3±0,20 | 2,3±0,1   | 1,1±0,1 | 4,6±0,1   | 2,1±0,0 | 2,9±0,1   | 2,1±0,1   |
| <b>1.1.21</b>     | 9,2±0,1                    | 2,3±0,1 | 18,1±0,18 | 2,4±0,1   | 1,2±0,0 | 11,0±0,13 | 4,7±0,1 | 1,8±0,1   | 3,5±0,1   |

<sup>a</sup>увеличение ИФ (среднее значение трех повторов (±CO)) определяли как отношение ИФ раствора флуорофор+ОДН к ИФ раствора свободного флуорофора (5 мкМ в 20 мМ трис-НСl, pH 7,8, 100 мМ KCl).

Связь между структурой и способностью флуорофоров разгораться в комплексах остается неясной, хотя лидерные соединения **1.1.8-1.1.15** имеют общий 4-(4-

гидроксibenзилиден)-1-метил-1H-имидазол-5(4H)-оновый фрагмент, типичный для исходного хромофора GFP. Производное **1.1.19** с наибольшим эффектом увеличения ИФ в комплексе с ТВА31 состоит из сопряженных бициклического и моноциклического ароматических колец, и такая структура имеет много общего со структурой ВО.



**Рисунок 2.1.12.** Спектры флуоресценции связанных (в буфере) и свободных (в воде) лидерных флуорофоров.

Для изучения влияния длины/стабильности дуплексного модуля на способность флуорофора увеличивать ИФ за счет предполагаемого расположения в межмодульной полости мы синтезировали укороченную (ТВА25) и удлиненную (ТВА63) версии ТВА31. Кроме того, мы синтезировали также контрольный дуплекс ОН1-ОН2, двухцепочечную часть ТВА63. Вторичные структуры олигонуклеотидов были подтверждено методом КД-спектроскопии (**Рисунок 2.1.10А**). Спектр дуплекса ОН1-ОН2 содержал большой отрицательный пик при 247 нм и широкий положительный пик при 265–280 нм, что характерно для АТ-богатых дуплексов. Регистрация КД-спектров при 295 нм давала монофазные кривые плавления для ТВА25 и ТВА63, тогда как при 265 нм были получены монофазная и двухфазная кривые плавления для ТВА25 и ТВА63 соответственно (**Рисунок 2.1.10Б и В, Таблица 2.1.5**). В большинстве случаев уменьшение длины дуплексного модуля приводило к увеличению ИФ флуорогенного красителя в комплексе (данные представлены в столбце ТВА25 в **Таблице 2.1.6**). Этот эффект можно объяснить пониженной жесткостью двухмодульной структуры, что может способствовать

оптимальному расположению красителя в полости между модулями. Действительно, согласно данным КД, дуплексная часть ТВА25 может быть частично расплетена, что приводит к слегка дестабилизированному G4 с одноцепочечными фланками, и может объяснить различные значения  $T_{пл}$ , полученные при регистрации плавления методами УФ- и КД-спектроскопии. Напротив, взаимодействие с удлиненной версией ТВА63 приводило к резкому снижению ИФ, сравнимому с сигналом одномодульного ТВА15, за исключением красителя **1.1.15** (Таблица 2.1.6). Такая же зависимость наблюдалась при смешивании красителей с дуплексом ОН1-ОН2. Эти результаты соответствуют полученным ранее данным для системы дапоксировый краситель/аптамер DAP-10 [333] и системы кристаллический фиолетовый – дуплекс-G4 [332] и могут быть объяснены большей жесткостью двухмодульной структуры, не позволяющей красителю занять положение, оптимальное для увеличения ИФ. Более того, в некоторых случаях проблема может заключаться в конкурирующем связывании красителя с дуплексным модулем.

Общее изменение топологии G4 с антипараллельной на параллельную при переходе от дезоксирибо- к рибо-ряду может позволить изучить влияние топологии G4 на усиление ИФ, но может также привести к изменению структуры межмодульного сочленения. Мы синтезировали и охарактеризовали РНК-аналоги ТВА15 и ТВА31: ОН15 и ОН31 соответственно. КД-спектры подтвердили параллельное сворачивание G4 (Рисунок 2.1.10Г) – общую особенность G4 РНК, за исключением Шпината, РНК-аптамерного аналога GFP [246]. КД-плавление при 265 нм (максимум, специфичный для параллельных G4) давало монофазные кривые, и аналогичные результаты были получены при регистрации УФ-плавления (Рисунок 2.1.10Д). Термическая стабильность увеличилась при переходе от ОН15 к ОН31, что подтверждает положительный эффект дуплексного модуля (Рисунок 2.1.10Д, Таблица 2.1.5). Связывание ВО с ОН31 приводило к увеличению ИФ, сравнимому с полученным ранее для ТВА31 (Таблица 2.1.6). Эти результаты косвенно подтверждают, что структура ОН31 также содержит сочленение с полостью, связывание в которой приводит к усилению флуоресценции красителя.

Все красители, перечисленные в Таблице 2.1.6, показали пониженную чувствительность к присутствию дополнительного дуплексного модуля. Однако производное **1.1.19** продемонстрировало приблизительно 20-кратное усиление флуоресценции при смешивании с ОН31, равное ТВА31, что отражает отсутствие у него чувствительности к топологии G4 в двухмодульных вариантах. Аналог **1.1.14** продемонстрировал одинаковое 6-кратное увеличение сигнала флуоресценции при связывании как с ОН15, так и с ОН31, что, по-видимому, указывает на другой способ

связывания красителя. Таким образом, мы обнаружили несколько соединений, демонстрирующих избирательное увеличение ИФ при смешивании с двухмодульными (дуплекс+G4) структурами, в которых G4 модуль имеет параллельную или антипараллельную топологию.

Для подтверждения общего характера увеличения ИФ красителей при взаимодействии со структурами, содержащими G4 и дуплексный модули, мы исследовали изменение спектральных свойств аналогов хромофора GFP при связывании с другими структурами G4 с дополнительными структурными модулями – LTR-III и теломерная последовательностью Tel23a человека. Исследования LTR-III, G-богатой последовательности, расположенной в промоторной области U3 длинного концевого повтора (LTR) ВИЧ-1, методом ЯМР-спектроскопии выявили образование уникального квадруплекс-дуплексного гибрида, состоящего из трехполочного (3+1) G4 модуля и диагональной петли длиной 12 нуклеотидов, содержащей консервативный дуплексный стебель [334]. Помимо дуплексной части, которая определяет наличие полости между двумя модулями и обеспечивает связывание красителя, другие элементы также могут способствовать удерживанию красителя в плоской конформации, что также может приводить к увеличению ИФ. Действительно, рентгеновские структуры аптамеров Шпинат и Манго демонстрируют важную роль неканонических триплетов нуклеиновых оснований для оптимального расположения красителя [247,257]. В этом исследовании мы также использовали теломерную последовательность Tel23a человека, которая преимущественно образует (3+1) G4 с триплетом оснований T:A:T, который накрывает нижнюю G-тетраду (гибрид 2) в калиевых буферах [58]. КД-спектры LTR-III и Tel23a в нашем исследовании согласуются с ранее опубликованными [334,335]. Эти данные подтверждают вторичные структуры, которые схематически показаны на **Рисунке 2.1.10Г**: гибрид (3+1) G4 (Tel23a) и гибрид G4 с внутрипетлевым дуплексным модулем (LTR-III). Кривые плавления Tel23a и LTR-III были монофазными (**Рисунок 2.1.10Д**) как по данным КД-спектроскопии, так и по УФ-плавлению при 265/295 нм (**Таблица 2.1.5**).

Затем мы изучили изменение ИФ всех 83 красителей при смешивании с LTR-III. В большинстве случаев увеличение флуоресценции было ниже, чем в случае TBA31 и его аналогов. Однако «паттерн разгорания» для большинства соединений (**Таблица 2.1.6**) был аналогичен таковому для аналогов TBA. Поскольку структура Tel23a не стабилизирована дуплексным модулем, все красители, за исключением соединения **1.1.15**, из **Таблицы 2.1.6** при смешивании с Tel23a разгорались плохо по сравнению с аналогами TBA. Эти данные подтверждают нашу гипотезу о вкладе дуплексных модулей в усиление флуоресценции аналогов хромофора GFP при связывании с различными структурами G4.

Таким образом, мы изучили влияние различных дополнительных дуплексных модулей на увеличение ИФ синтетических аналогов хромофора GFP при смешивании с двухмодульными (дуплекс+G4) структурами. Скрининг большого количества красителей и варьирование длины дуплексного модуля позволили выявить несколько красителей, которые «разгораются» более чем в 20 раз при связывании с двухмодульными ТВА аптамерами и их РНК-аналогами и флуоресцируют в сине-оранжевой области диапазона видимого спектра. Дуплексные модули умеренной длины увеличивают ИФ, в то время как протяженных дуплексных модулей следует избегать. Негативный эффект длинного дуплексного модуля можно объяснить повышенной жесткостью двухмодульной конструкции, препятствующей оптимальному позиционированию красителя в межмодульной полости. Несмотря на общий положительный вклад дуплексного модуля, полость на границе дуплекс-квадруплекс различна для разных известных структур.

Полученные данные могут способствовать разработке систем флуоресцентной визуализации на основе ДНК-аптамеров с повышенной яркостью [331] и гибридизационных зондов с внешним флуоресцентным репортером [332].

Мы показали выше, что варьирование длины дуплексного модуля в двухмодульной (G4+дуплекс) структуре дезокси- и рибо-ряда может обеспечить повышение ИФ связанных флуорогенных красителей. Однако, высокой аффинности и существенной активации флуоресценции флуорогенного красителя можно также добиться за счет дополнительных стэкинг-взаимодействий флуорогена с неспаренными нуклеиновыми основаниями или неканоническим парами в петлях G4. Подобный сценарий реализуется в случае аптамеров семейства Манго и флуорогенного красителя **ТО1-биотин** [256–259].

Генетически кодируемые системы флуоресцентного мечения на основе аптамеров семейства Манго и несимметричного цианинового красителя **ТО1-биотин** выглядят многообещающими, поскольку отвечают большинству требований, предъявляемых к идеальной метке. Аптамеры имеют небольшой размер, правильно складываются в физиологических условиях и выдерживают обработку формальдегидом. Используемый краситель проникает в клетки и нетоксичен, имеет большой коэффициент молярной экстинкции ( $\epsilon=77500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) и чрезвычайно низкий квантовый выход флуоресценции в несвязанном состоянии. При этом, связывание красителя с аптамерами приводит к значительной активации флуоресценции.

Первый отобранный методом SELEX аптамер семейства Манго, Манго I, имел относительно небольшой размер и очень высокое сродство ( $K_D = 3,2 \text{ nM}$ ) к используемому при селекции красителю **ТО1-биотин**, производному тиазолового оранжевого (ТО) (**Рисунок 2.1.13**). Краситель продемонстрировал усиление ИФ в 1100 раз при связывании с

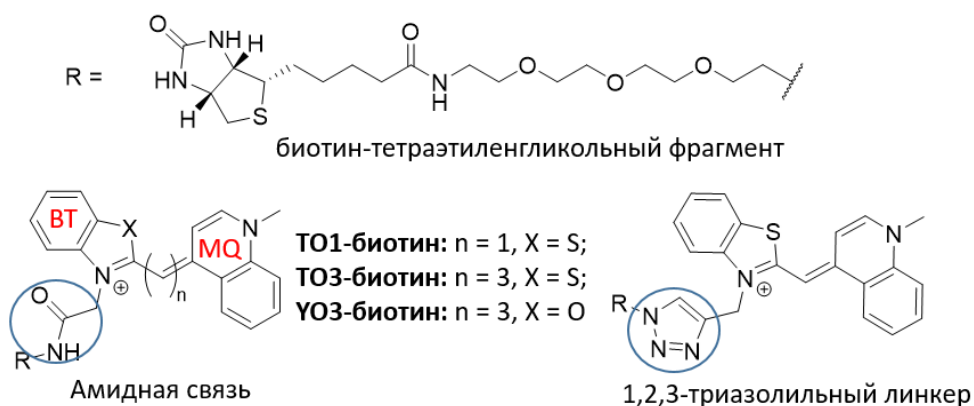
аптамером [254]. Данная пара позволила визуализировать комплекс **ТО1-биотин**:Манго I в *C. elegans*, а также обеспечила флуоресцентное мечение и очистку биологически значимых РНК [254]. Использование комплекса Манго I с аналогом оригинальной краски YO3-биотин позволило создать сенсор на основе FRET и генетически кодируемую РНК-апта-FRET-систему, которая реагировала на конформационные изменения РНК в *E. coli* [336]. Недавно система на основе аптамера Манго I была использована для создания сенсоров для оптической визуализации активности микроРНК в живых клетках [337,338]. Рентгеновская кристаллография показала, что флуорогенное ядро красителя **ТО1-биотин** зажато между одной из внешних тетрад G4 и двумя неспаренными аденинами из пропеллерных петель G4 с углом  $45^\circ$  между N-метилхинолиновым (MQ) и бензотиазольным (BT) фрагментами (**Рисунок 2.1.13**), что приводило к субоптимальной конформации, ответственной за относительно низкий квантовый выход комплекса ( $\Phi^F = 0,14$ ) [256]. Для улучшения свойств системы с применением микрофлюидных технологий были отобраны три новых представителя семейства Манго, а именно Манго II, III и IV [260]. Данные аптамеры показали высокую термическую стабильность и сродство, большее усиление флуоресценции при связывании красителя **ТО1-биотин** по сравнению с аптамером Манго I, устойчивость к высоким концентрациям  $Mg^{2+}$  и способность выдерживать фиксацию клеток обработкой формальдегидом.

Несмотря на перспективность предложенных меток на основе аптамеров семейства Манго, предложенные системы имеют, тем не менее, ряд недостатков. Синтез целевого флуорогенного красителя **ТО1-биотин** имеет очень низкий суммарный выход, а краситель позволяет проводить визуализацию исследуемой РНК только в зеленом канале микроскопа. В связи с этим, мы решили разработать эффективную схему синтеза и получить новые красители с отличными от оригинального красителя спектральными свойствами.

Дизайн новых красителей был вдохновлен производными тиазолового оранжевого **ТО1-биотин**, **ТО3-биотин** и **YO3-биотин** (**Рисунок 2.1.13**). Данные красители состоят из двух фрагментов — биотин-тетраэтиленгликольного и флуорогенного фрагментов, соединенных амидной связью. В качестве последней стадии конденсации двух фрагментов мы решили использовать вместо реакции образования амидной связи, которая давала низкие выходы с данными субстратами, простую и эффективную «клик» реакцию. «Клик» химия представляет собой синтетический подход для эффективного и биоортогонального конъюгирования молекул с высоким выходом [339]. Самым популярным вариантом «клик» химии является 1,3-диполярное циклоприсоединение в условиях катализа ионами меди (I) между концевой алкиновой и азидной функциональными группами, приводящее к образованию 1,2,3-триазольного цикла [340,341]. Замена амидной связи на изостерический

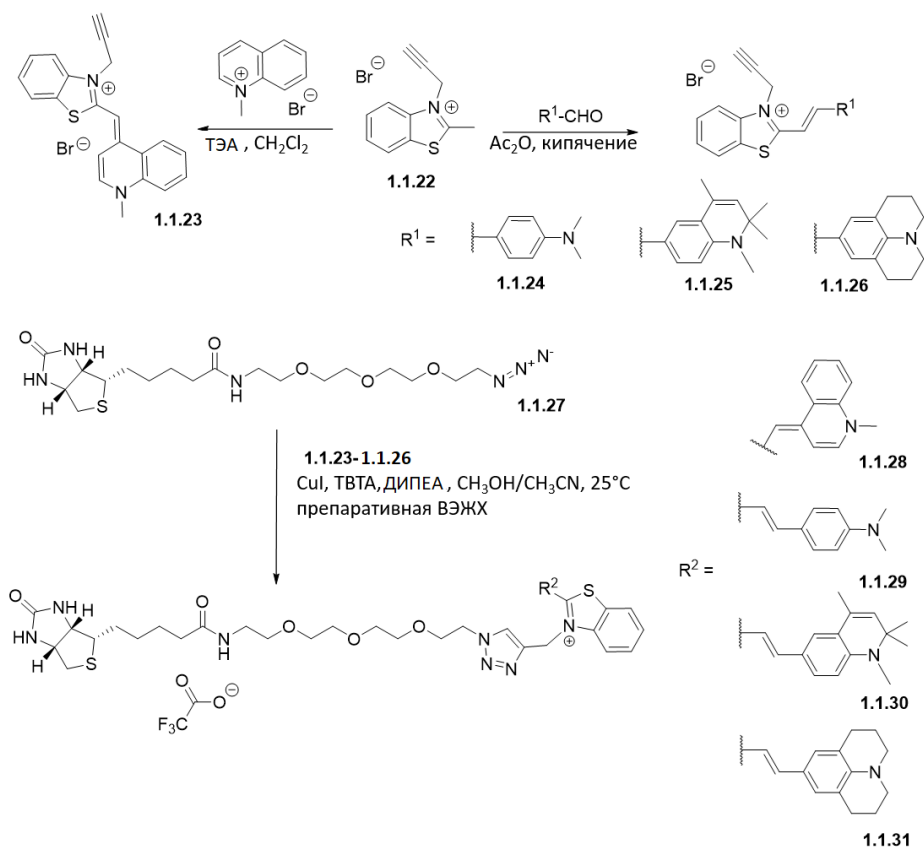


1,2,3-триазолильный фрагмент может упростить синтетические превращения, повысить их эффективность и в некоторых случаях улучшить свойства биомолекул [342–346].



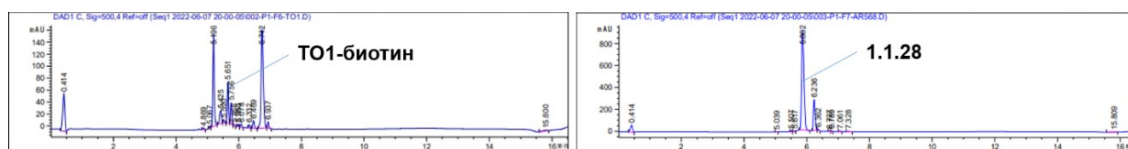
**Рисунок 2.1.13.** Структуры описанных флуорогенных красителей **ТО1-биотин**, **ТО3-биотин** и **YO3-биотин** и аналога **ТО1-биотина** с триазолильным линкером.

Для синтеза аналога **1.1.28** оригинальной краски **ТО1-биотин**, содержащего вместо амидной связи 1,2,3-триазолильный линкер, соль бензотиазолия **1.1.22**, полученную с выходом 61 % по известной методике [347], конденсировали с солью 1-метилхинолиния в присутствии ТЭА с получением алкин-модифицированного флуорогенного красителя **1.1.23** с выходом 43 %, что в ~7 раз превышало выход соответствующего промежуточного соединения в синтезе красителя **ТО1-биотин** [254] (Схема 2.1.2). Следуя описанной методике азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого ионами меди (I) [348], алкинсодержащее производное **1.1.23** и азидосодержащее биотинилированное производное **1.1.27**, полученное, исходя из тетраэтиленгликоля с выходом 46 % на 3 стадии [349], конденсировали в присутствии йодида меди (I), ТВТА и ДИПЭА, получая после очистки препаративной ВЭЖХ целевой флуорогенный краситель **1.1.28** в виде трифторацетатной соли.



### Схема 2.1.2. Синтез аналогов красителя **ТО1-биотин**.

Чтобы проверить эффективность реакции азид-алкинового 1,3-диполярного циклоприсоединения (CuAAC) по сравнению с реакцией образования амидной связи, мы проанализировали неочищенные реакционные смеси, содержащие **ТО1-биотин** и краситель **1.1.23**, с помощью ЖХ-МС при длине волны поглощения 500 нм, близкой к максимуму поглощения флуорофора **ТО** (Рисунок 2.1.14).



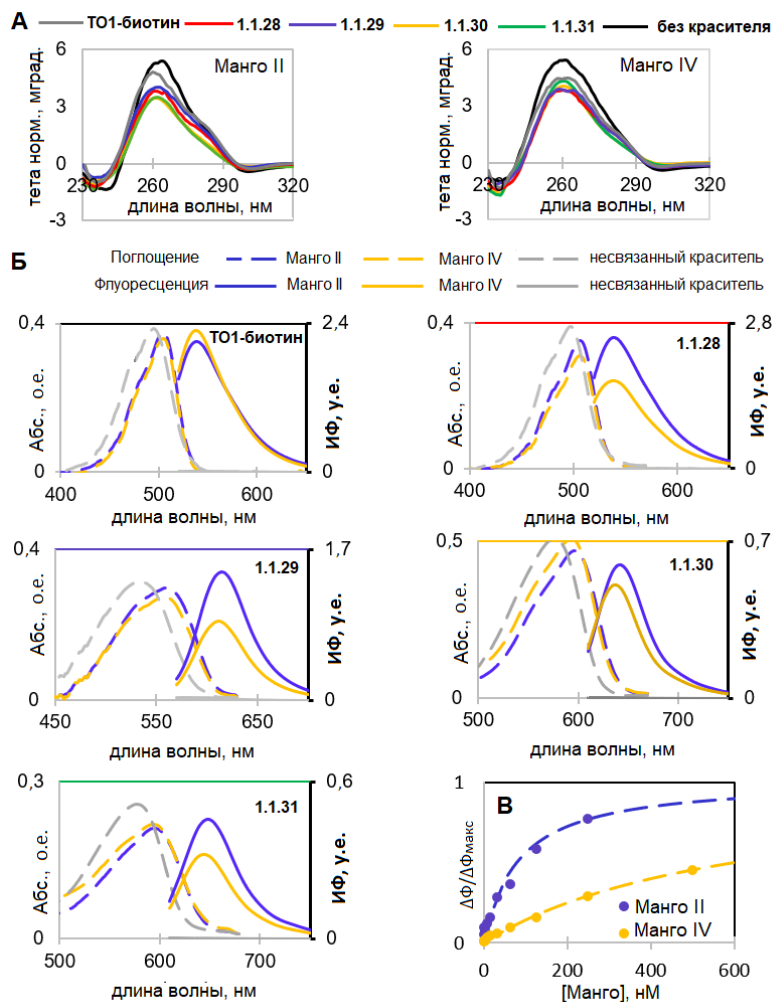
**Рисунок 2.1.14.** ВЭЖХ профили реакционных смесей, содержащих **ТО1-биотин** или краситель **1.1.28** (поглощение при 500 нм).

Оценка чистоты при отнесении площади под целевым пиком к суммарной площади под всеми пиками дала 9,2% и 76,5% для **ТО1-биотин** ( $R_f = 5,65$  мин) и **1.1.28** ( $R_f = 5,86$  мин) соответственно. Выходы реакции после однократной очистки ВЭЖХ составили 1,8 и 3,5% для **ТО1-биотин** и красителя **1.1.28** соответственно, что, по-видимому, связано с низкой растворимостью обоих производных в буфере для нанесения образцов (0,1% водная ТФУ). Однако после нескольких итераций очистки ВЭЖХ выход **ТО1-биотин** и красителя **1.1.28** достиг 6,8 и 58,1% соответственно.

Вдохновленные химическим дизайном красителей **ТО3-биотин** и **УО3-биотин** с расширенными конъюгированными системами (**Рисунок 2.1.13**), спектры эмиссии которых значительно смещены в красную область видимого спектра, но которые демонстрируют заметно меньшее увеличение ИФ при связывании с аптамерами по сравнению с исходным красителем **ТО1-биотин** [254,336], а также применимостью простой и эффективной «клик» реакции для синтеза красителей, мы исследовали возможность использования других цианиновых производных в качестве флуорогенных красителей для систем мечения РНК на основе аптамеров семейства Манго. При дизайне красителей со смещенными в красную область спектрами эмиссии широкое применение находят системы D– $\pi$ –A, где D и A являются донором и акцептором электронов соответственно [350]. Соответственно, мы оставили электроноакцепторное бензотиазольное кольцо (BT) [351] в цианиновой «пуш-пулл» системе, но заменили 1-метилхинолиновый гетероцикл фрагментами с сильным электронодонорным эффектом. Мы также заменили метиновое звено между донорным и акцепторным фрагментами на этенильный линкер. В результате, мы синтезировали красители, содержащие *N,N*-диметиламинофенильную (краситель **1.1.29**), 1,2,2,4-тетраметил-1,2-дигидрохинолин-6-ильную (краситель **1.1.30**) или 2,3,6,7-тетрагидро-1*H*,5*H*-пиридо[3,2,1-*ij*]хинолин-9-ильную (краситель **1.1.31**) группу в качестве электронодонорного фрагмента. Для этого бензотиазольевую соль **1.1.22** конденсировали с соответствующим ароматическим альдегидом по реакции альдольного типа в уксусном ангидриде [352] с получением алкин-модифицированных производных **1.1.24**, **1.1.25** и **1.1.26** (**Схема 2.1.2**). Их конденсация с азидосодержащим биотинилированным производным **1.1.27** в присутствии иодида меди (I), ТВТА и ДИПЭА дала, после очистки препаративной ВЭЖХ, флуорогенные красители **1.1.29**, **1.1.30** и **1.1.31** в виде трифторацетатных солей.

Спектральные свойства новых красителей **1.1.28-1.1.31** и контрольного красителя **ТО1-биотин** исследовали в свободном состоянии и в комплексах с аптамерами Манго II и Манго IV (**Рисунок 2.1.15**). Первый аптамер демонстрирует повышенную термическую стабильность по сравнению с Манго I, устойчив к фиксации формальдегидом и прошел всестороннюю оценку в визуализации биомолекул [258,260,261]. Манго IV является вторым активно используемым аптамером семейства Манго [259]. Сначала мы проверили красители на предмет разрушения или изменения вторичных структур аптамеров. При концентрации 5 мкМ, что значительно превышает литературные значения  $K_D$  для комплекса аптамера Манго I с красителем **ТО1-биотин** [260], красители не вызывали заметных изменений в кривых поглощения или КД-спектрах Манго II и Манго IV, за исключением незначительного уменьшения КД-амплитуды (**Рисунок 2.1.15А**). В то же

время красители показали смещенные в красную область спектры поглощения в эквимольных смесях с аптамерами по сравнению с несвязанным состоянием (**Рисунок 2.1.15Б**). В соответствии с полученными ранее результатами для красителя **ТО1-биотин** [258,260], эти данные подтверждают образование комплексов и сохранение в них ядра G4.



**Рисунок 2.1.15.** **ТО1-биотин** и новые красители **1.1.28-1.1.31** в комплексах с аптамерами Манго II и IV: спектральные свойства и аффинность связывания. (А) Проверка воздействия красителей на вторичную структуру аптамера манго методом КД-спектроскопии. (Б) Спектры поглощения и флуоресценции свободных красителей и их комплексов. (В) Анализ связывания красителя **1.1.29** с аптамерами Манго. Условия А и Б: 5 мкМ аптамер Манго, 5 мкМ краситель, 10 мМ Трис-НСl, pH 7,5 и 140 мМ KCl. Условия в В: 10 нМ краситель.

**Таблица 2.1.7.** Спектральные свойства красителей в несвязанном состоянии и в комплексах с аптамерами.

| Краситель              | макс. абс.<br>несвязанного<br>красителя<br>(нм) | Несвязанный<br>краситель <sup>а</sup><br>$\varepsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) | $\lambda_{возб}$<br>Манго-<br>краситель<br>(нм) | $\lambda_{исп}$<br>Манго-<br>краситель<br>(нм) | $\Phi^F$ _Манго-<br>краситель<br>(у.е.) <sup>б</sup> |             | Яркость _Манго-<br>краситель<br>( $M^{-1}cm^{-1}$ ) <sup>б,в</sup> |             |
|------------------------|---|--|---|--|--|-------------|--|-------------|
|                        |   |  |   |  |  |             |  |             |
|                        |   |  |   |  | Манго<br>II  | Манго<br>IV | Манго<br>II  | Манго<br>IV |
| <b>ТО1-<br/>биотин</b> | 495   | 77500  | 505   | 540  | 0,39   | 0,43        | 29200  | 32200       |
| <b>1.1.28</b>          | 495   | 77500  | 505   | 540  | 0,42   | 0,32        | 29400  | 19900       |
| <b>1.1.29</b>          | 535   | 62400  | 560   | 615  | 0,44   | 0,29        | 26200  | 15900       |
| <b>1.1.30</b>          | 580   | 101100   | 595   | 640  | 0,07   | 0,05        | 7100   | 5400        |
| <b>1.1.31</b>          | 580   | 51300  | 595   | 650  | 0,14   | 0,10        | 6400   | 4700        |

<sup>а</sup> Молярная экстинкция в максимуме поглощения несвязанного красителя.

<sup>б</sup> Условия: 5 мкМ аптамер Манго, 5 мкМ краситель, 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5 и 140 мМ KCl.

<sup>в</sup> Яркость = молярная экстинкция ( $\varepsilon$ ) в максимуме поглощения комплекса \*  $\Phi^F$ .

Затем мы провели сравнение красителей по основным спектральным параметрам, включая увеличение ИФ и яркости в связанном состоянии. Возбуждение в специфических для комплексов максимумах поглощения (Таблица 2.1.7) давало незначительное флуоресцентное излучение красителей в свободном состоянии ( $F_0$ ), тогда как эквимольные смеси с аптамерами показали усиление флуоресцентного излучения почти на три порядка ( $F_E = F/F_0$ , где  $F$  - ИФ в комплексе, Таблица 2.1.8). Если **ТО1-биотин** показал эффективное «разгорание» в комплексе с аптамерами Манго II и Манго IV с квантовыми выходами флуоресценции ( $\Phi$ ) равными 0,39 и 0,43 соответственно, то его аналог **1.1.28** с триазолильным линкером продемонстрировал большую активацию флуоресценции в комплексе с Манго II ( $\Phi = 0,42$ ) по сравнению с комплексом с Манго IV ( $\Phi = 0,32$ ), и, в последнем случае, несколько сниженную яркость по сравнению с комплексом **ТО1-биотин** (Таблица 2.1.7). Интересно, что краситель **1.1.28** продемонстрировал более высокий контраст ( $F_E$ ), чем **ТО1-биотин**, предположительно из-за меньшего влияния 1,2,3-триазолильного линкера на вращательную подвижность гетероароматических систем по сравнению с амидной связью. Также было показано, что флуоресценция красителя **1.1.29** активируется более сильно в комплексе с Манго II, чем с Манго IV. Краситель **1.1.29** имеет спектры, смещенные в красную область видимого света, с повышенным стоксовым сдвигом ( $\Delta\lambda = 55$  нм) по сравнению с красителями **ТО1-биотин** и **1.1.28** ( $\Delta\lambda = 35$  нм). Красители **1.1.30** и **1.1.31** уступали другим аналогам и демонстрировали существенно сниженные квантовый выход и яркость флуоресценции (Таблица 2.1.7).

**Таблица 2.1.8.** Специфичность эффекта «разгорания» красителей.

| краситель         | $F_E^a$  |          |                                    |                    |                    |                    |                    |                        |                      |                 |
|-------------------|----------|----------|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|----------------------|-----------------|
|                   | Манго II | Манго IV | Г4 РНК <sup>б</sup><br>контрольная | дцРНК <sup>б</sup> | оцРНК <sup>б</sup> | дцДНК <sup>б</sup> | оцДНК <sup>б</sup> | г/пГ4-ДНК <sup>б</sup> | аГ4-ДНК <sup>б</sup> | иМ <sup>б</sup> |
| <b>ТО1-биотин</b> | 2080     | 2280     | 1440 (1,6) <sup>в</sup>            | 132 (16)           | 84 (25)            | 24 (87)            | 12 (173)           | 54 (39)                | 48 (43)              | 42 (50)         |
| <b>1.1.28</b>     | 4770     | 3200     | 3310 (1,4)                         | 428 (11)           | 220 (22)           | 208 (23)           | 35 (137)           | 313 (15)               | 284 (17)             | 295 (16)        |
| <b>1.1.29</b>     | 540      | 320      | 110 (4,9)                          | 41 (13)            | 35 (16)            | 12 (47)            | 12 (47)            | 23 (23)                | 17 (31)              | 12 (47)         |
| <b>1.1.30</b>     | 320      | 270      | 175 (1,8)                          | 23 (1,8)           | 17 (18)            | 29 (11)            | 17 (18)            | 35 (9)                 | 29 (11)              | 23 (14)         |
| <b>1.1.31</b>     | 340      | 240      | 98 (3,5)                           | 12 (30)            | 12 (30)            | 29 (12)            | 23 (15)            | 35 (10)                | 29 (12)              | 23 (15)         |

<sup>а</sup> Усиление флуоресценции ( $F_E$ ) = ИФ в комплексе ( $F$ ), поделенная на ИФ несвязанного красителя ( $F_o$ ) в специфическом для аптамера Манго максимуме. Условия: 5 мкМ РНК или ДНК, 5 мкМ краситель, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5 и 140 мМ КСl.

<sup>б</sup> оцРНК представляет собой РНК со случайной последовательностью (25 мкг/мл); последовательности других ОН представлены в **Таблице 2.1.9**.

<sup>в</sup> Селективность к аптамеру Манго II по сравнению с контрольными вторичными РНК- и ДНК-структурами в виде отношения  $F/F_o^{\text{Манго II}}$  к  $F/F_o^{\text{контроль}}$  показана в скобках.

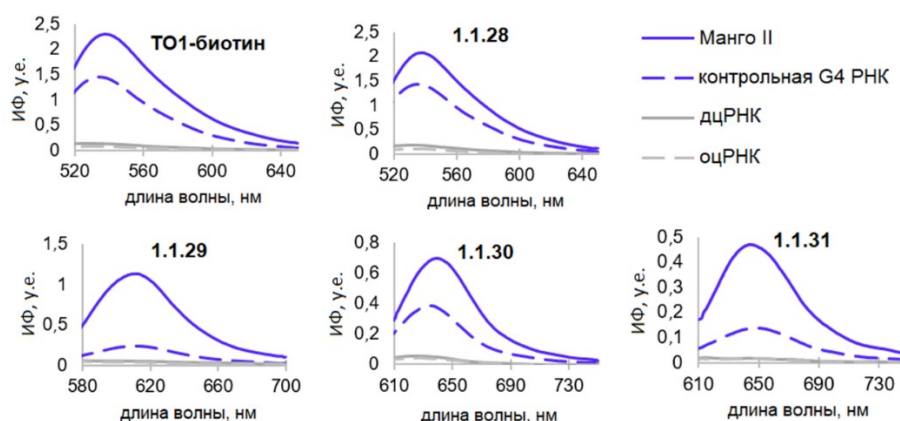
Чтобы оценить селективность связывания описанного и новых красителей с РНК-аптамерами, мы сравнили эффекты увеличения ИФ красителей в присутствии Манго II, Манго IV и других РНК- и ДНК-структур, используя набор контрольных олигонуклеотидов (**Таблица 2.1.9**).

**Таблица 2.1.9.** Последовательности синтетических олигонуклеотидов, используемых для оценки спектральных свойств, сродства и селективности красителей.

| шифр                                 | Последовательность, 5'→3'                    |
|--------------------------------------|--|
| Манго II                             | r(GCACGUACGAAGGAGAGGAGAGGAAGAGGAGAGUACGUGC)  |
| Манго IV                             | r(GCACGUACCGAGGGAGUGGUGAGGAUGAGGCGAGUACGUGC) |
| Г4 РНК (utr-z)                       | r(GGCGGCGGCAGUGGCGGCGG)                      |
| дцРНК (шпилька rds26)                | r(CAAUCGGAUCGAAUUCGAUCCGAUUG)                |
| дцДНК (шпилька ds26)                 | d(CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG)                |
| оцДНК (dT <sub>18</sub> )            | d(TTTTTTTTTTTTTTTTTT)                        |
| г/п                                  | d(AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG)                    |
| Г4-ДНК (гибридный/параллельный 22AG) | d(AGGGCTAGGGCTAGGGCTAGGG)                    |
| аГ4 (антипараллельный 22СТА)         | d(AGGGCTAGGGCTAGGGCTAGGG)                    |
| иМ (гексануклеотидный повтор)        | d(CCCCGGCCCGGCCCGGCCCG)                      |

Набор включал контрольную Г4 РНК utr-z из последовательности 5'-нетранслируемой области мРНК *KRAS* человека [353], оцРНК смешанной последовательности, выделенную из молоки лосося, РНК-шпильку rds26 и ДНК шпильку

ds26 [294,354], фрагмент теломерной ДНК 22AG [54,58,355], который складывается в структуру G4 параллельного или гибридного типа, вместе с его мутантом 22СТА, который складывается в структуру G4 с антипараллельной ориентацией цепей [312], и фрагмент микросателлитной ДНК из генома человека C9ORF72, который складывается в иМ-структуру в условиях, близких к физиологическим [356]. Ни один из контролей не мог сравниться с Манго по эффекту активации флуоресценции (**Таблица 2.1.8**). Красители **1.1.28-1.1.31** показали несколько пониженную селективность в отношении аптамеров Манго по сравнению со структурами ДНК (среднее отношение эффектов «разгорания» Манго:контроль  $\sim 10X$ ) по сравнению с красителем **ТО1-биотин** (среднее отношение эффектов «разгорания» Манго:контроль  $\sim 100X$ ). Среди новых красителей наибольшая селективность наблюдалась для красителя **1.1.28** (**Таблица 2.1.8**). Что касается селективности в отношении аптамеров Манго по сравнению с РНК-структурами (особенно G4 РНК), краситель **1.1.29** превосходит как **1.1.28**, так и **ТО1-биотин** (**Таблица 2.1.8** и **Рисунок 2.1.16**). Для этого красителя оценивали сродство к аптамерам Манго, анализируя прирост ИФ при титровании красителя аптамером. Были получены значения  $K_D$   $80 \pm 60$  нМ и  $0,6 \pm 0,4$  мкМ для Манго II и Манго IV соответственно (**Рисунок 2.1.15B**).

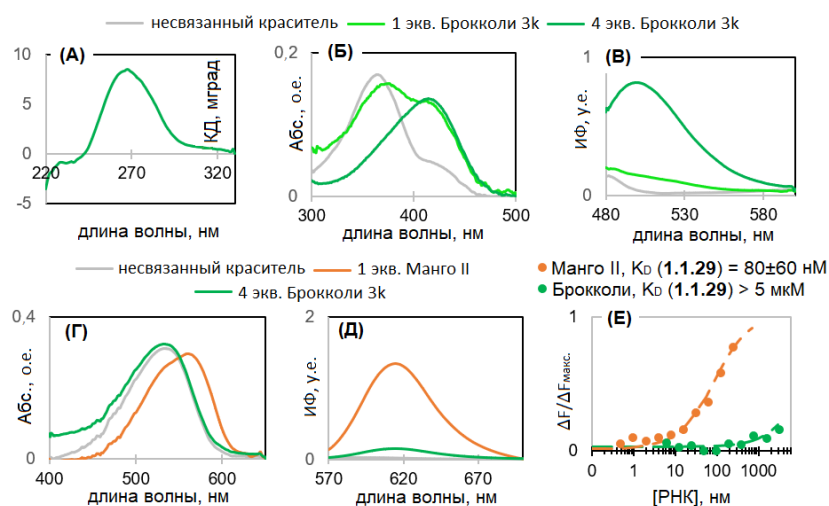


**Рисунок 2.1.16.** Спектры флуоресценции **ТО1-биотин** и новых красителей **1.1.28-1.1.31** в комплексах с аптамером Манго II и контрольной РНК. Условия: 5 мкМ краситель, 5 мкМ Манго II/контроль G4 РНК или дцРНК и 25 мкг/мл оцРНК, 10 мМ Трис-НСl, pH 7,5 и 140 мМ KCl. Возбуждение при 505 нм (**ТО1-биотин** и краситель **1.1.28**), 560 нм (краситель **1.1.29**) и 595 нм (красители **1.1.30** и **1.1.31**).

Принимая во внимание улучшенную селективность красителя **1.1.29** к аптамерам Манго II/IV по сравнению со случайно выбранным G4 РНК и его значительный стоксов сдвиг, мы решили провести предварительную оценку его применимости в сочетании с другой парой краситель/аптамер для мультиплексной визуализации или отслеживания сближения фрагментов РНК-РНК на основе FRET-эффекта [259,336]. Недавно

флуоресцентные РНК-аптамеры Шпинат и Манго I с их флуорофорами-партнерами использовали для разработки РНК-апта-FRET-системы, которая реагировала на конформационные изменения РНК в *E. coli* [336]. Пары **DFHBI-1T**-Брокколи/**УОЗ-биотин**-Манго III (донор и акцептор соответственно) использовали для оценки зависимости эффективности FRET от взаимной ориентации донора и акцептора [357].

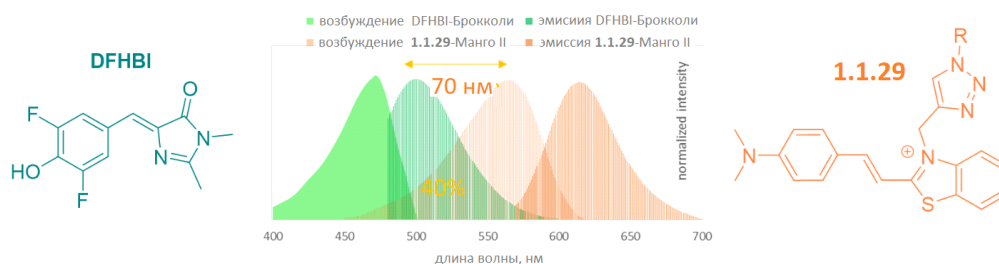
Мы провели предварительную оценку возможности использования пары краситель **1.1.29**-Манго II в качестве акцептора в паре с донором **DFHBI**-Брокколи [249] для создания FRET-систем. Аптамер Брокколи синтезировали, как описано ранее [358] (последовательность и праймеры для синтеза представлены в **Таблице 2.1.3.4**). Его КД-спектр (**Рисунок 2.1.17А**) соответствовал предполагаемой структуре G4. При титровании аптамером Брокколи **DFHBI** показал батохромный сдвиг поглощения (**Рисунок 2.1.17Б**) и резкую активацию флуоресценции (**Рисунок 2.1.17В**) при возбуждении в 470 нм (максимум поглощения комплекса **DFHBI**-Брокколи) с максимумом эмиссии в 510 нм.



**Рисунок 2.1.17.** Ортогональные пары РНК-краситель **DFHBI**-Брокколи и **1.1.29**-Манго II. (А) Проверка вторичной структуры РНК Брокколи с помощью КД-спектроскопии. Условия: 5 мкМ Брокколи, 10 мМ Трис-НСl, pH 7,5 и 140 мМ KCl. (Б) Поглощение **DFHBI** в несвязанном состоянии и в комплексе с аптамером Брокколи. (В) Флуоресценция **DFHBI** в несвязанном состоянии и в комплексе с аптамером Брокколи (возбуждение при 470 нм). (Г) Поглощение красителя **1.1.29** в несвязанном состоянии и в комплексе с РНК-аптамерами. (Д) Флуоресценция красителя **1.1.29** в несвязанном состоянии и в комплексе с РНК-аптамерами (возбуждение при 560 нм). Условия: 5 мкМ краситель, 10 мМ Трис-НСl, pH 7,5 и 140 мМ KCl. (Е) Сравнение активации флуоресценции красителя **1.1.29** при смешивании с Манго II и Брокколи. Условия: 10 нМ **1.1.29**, 10 мМ Трис-НСl, pH 7,5 и 140 мМ KCl, 0,05% Твин-20.



Известно, что флуорофоры, являющиеся аналогами флуорофора GFP, нечувствительны к аптамерам семейства Манго [259,336]. Таким образом, селективность красителя **1.1.29** к аптамеру Манго по сравнению с Брокколи была определяющим фактором для установления ортогональности **DFHBI**-Брокколи и краситель **1.1.29**-Манго II. Изменения поглощения (**Рисунок 2.1.17Г**) и усиление флуоресценции (**Рисунок 2.1.17Д**) красителя **1.1.29**, вызванные аптамером Брокколи, были незначительными по сравнению с изменениями, вызванными Манго II, что указывает на отсутствие взаимодействия между парами аптамер-краситель. Аффинность связывания Брокколи с красителем **1.1.29** была незначительной по сравнению с аффинностью связывания с Манго II (**Рисунок 2.1.17Е**). В то же время пары показали существенное перекрывание спектров испускания донора и поглощения акцептора (**Рисунок 2.1.18**), что указывает на вероятность эффективного FRET при сближении донора и акцептора. Подводя итог этой части, можно сказать, что пары **1.1.29**-Манго II и **DFHBI**-Брокколи идеально подходят друг другу как донор и акцептор и имеют перспективы в мультиплексном анализе или отслеживании РНК по FRET.

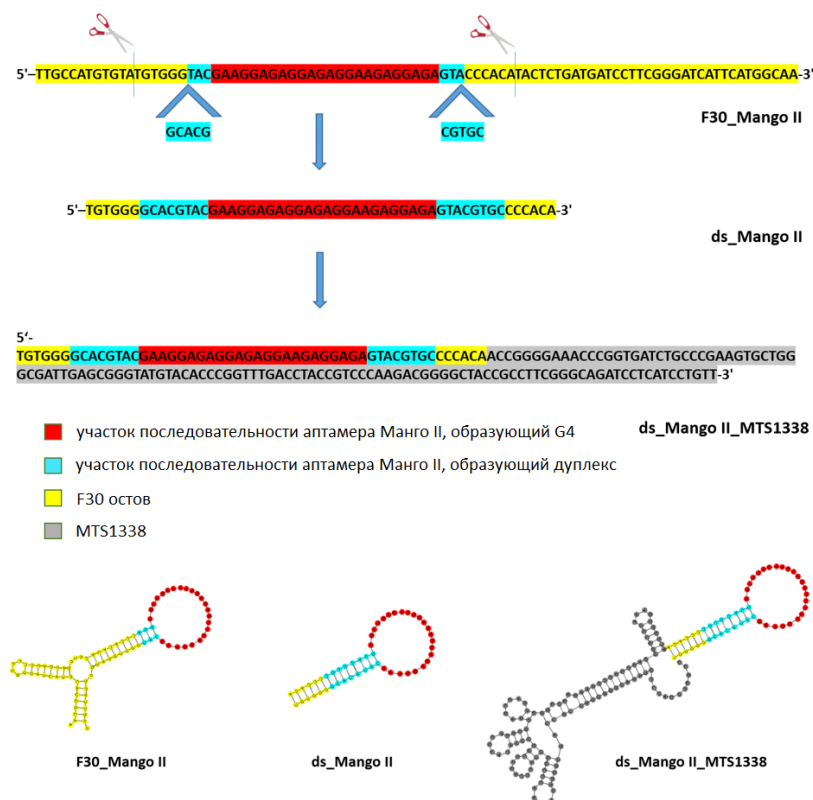


**Рисунок 2.1.18.** Спектры возбуждения и эмиссии **DFHBI** и красителя **1.1.29** в комплексе с аптамерами Брокколи и Манго II соответственно.

мнкРНК внутриклеточных патогенных бактерий являются мощными регуляторами адаптации бактерий к иммунной защите хозяина [359,360]. Мы решили использовать лидерный краситель **1.1.29** для внутриклеточной визуализации малой РНК MTS1338 *M. Tuberculosis*, обнаружения ее в бактериях *in vitro* и отслеживания в инфицированных макрофагах. Для этой цели мы использовали модульную РНК (ds\_Mango II\_MTS1338), состоящую из мнкРНК MTS1338, слитой с оптимизированной меткой ds\_Mango II, активирующей флуоресценцию флуорогенного красителя, которая была получена путем усечения одного из стеблей остова F30, обеспечивающего правильную сборку аптамера Манго в физиологических условиях (**Рисунок 2.1.19** и **Таблица 2.1.10**).

**Таблица 2.1.10.** Последовательности используемых генетических конструкций и праймеры для синтеза РНК *in vitro*.

| шифр                             | последовательность 5'→3'  |
|----------------------------------|---|
| rrnB промотор                    | CTAGAGTGACCGCGTCTGACCAGGGAAAATAGCCCTCTGACCTGGGGATTTGAC<br>TCCCAGTTTCCAAGGACGTAACCTTA  |
| MTS1338                          | ACCGGGGAAACCCGGTGATCTGCCCCGAAGTGCTGGGCGATTGAGCGGGTATGTA<br>CACCCGGTTTGACCTACCGTCCCAAGACGGGGCTACCGCCTTCGGGCAGATCCTC<br>ATCCTGTT  |
| term<br>(терминатор)             | GCTTCCCCGCGAAAGCGGGGTTTTTTTTTTTAGCT   |
| ds_Mango II<br>Broccoli          | TGTGGGGCACGTACGAAGGAGAGGAGAGGAAGAGGAGAGTACGTGCCCCACA<br>GAGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTCTGAGTAGAGTGTGGGCTC  |
| rrnB_ds_Mango<br>II_term         | CTAGAGTGACCGCGTCTGACCAGGGAAAATAGCCCTCTGACCTGGGGATTTGAC<br>TCCCAGTTTCCAAGGACGTAACCTTATGTGGGGCACGTACGAAGGAGAGGAGAGG<br>AAGAGGAGAGTACGTGCCCCACACCCCGCGAAAGCGGGGTTTTTTTTTTTAGCT-  |
| rrnB_ds_Mango<br>II_MTS1338_term | CTAGAGTGACCGCGTCTGACCAGGGAAAATAGCCCTCTGACCTGGGGATTTGAC<br>TCCCAGTTTCCAAGGACGTAACCTTATGTGGGGCACGTACGAAGGAGAGGAGAGG<br>AAGAGGAGAGTACGTGCCCCACAACCGGGGAAACCCGGTGATCTGCCCCGAAGTG<br>CTGGGCGATTGAGCGGGTATGTACACCCGGTTTGACCTACCGTCCCAAGACGGG<br>GCTACCGCCTTCGGGCAGATCCTCATCCTGTTCCCCGCGAAAGCGGGGTTTTTTTT<br>TTTAGCT |
| rrnB_Broccoli<br>_term           | CTAGAGTGACCGCGTCTGACCAGGGAAAATAGCCCTCTGACCTGGGGATTTGAC<br>TCCCAGTTTCCAAGGACGTAACCTTAGAGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTG<br>TCGAGTAGAGTGTGGGCTCCCCCGCGAAAGCGGGGTTTTTTTTTTTAGCT  |
| T7MngII_F<br>MngII_R             | GTTTTTTTTTAATACGACTCACTATAGGTGTGGGGCACGTAC<br>TGTGGGGCACGTACTCTCT   |
| 1338_R                           | AACAGGATGAGGATCTGCCCCG  |
| T7Broc_F<br>Broc_R               | GTTTTTTTTTAATACGACTCACTATAGGGAGACGGTCGGGTC<br>GAGCCCACACTCTACTCGACAGATACGAAT  |
| q1338-F<br>q1338-R               | GTGCTGGGCGATTGAGC<br>GCGGTAGCCCCGTCTT   |
| 16S-F<br>16S-R                   | TACGTAGGGTGCGAGCGTTG<br>CCCGCACGCTCACAGTTAAG  |

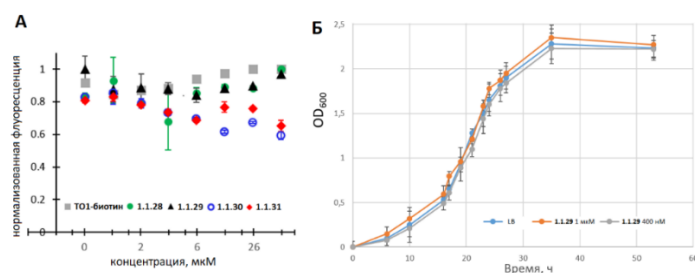


**Рисунок 2.1.19.** Последовательности и вторичная структура аптамеров F30\_Mango II, ds\_Mango II и модульной РНК ds\_Mango II\_MTS1338 по данным сервера RNAfold [361].

Поскольку функциональная роль структурных элементов исследуемой РНК еще не выяснена, мы ввели метку по 5'-концу РНК MTS1338. Последовательности модульной РНК и генетических конструкций приведены в **Таблице 2.1.10**. Способность модульной РНК, несущей два функциональных домена, MTS1338 и флуороген-активирующую метку, формировать правильную вторичную структуру, согласно данным сервера RNAfold [361] (свободная энергия термодинамического ансамбля составляет -87,79 ккал/моль) показана на **Рисунке 2.1.19**.

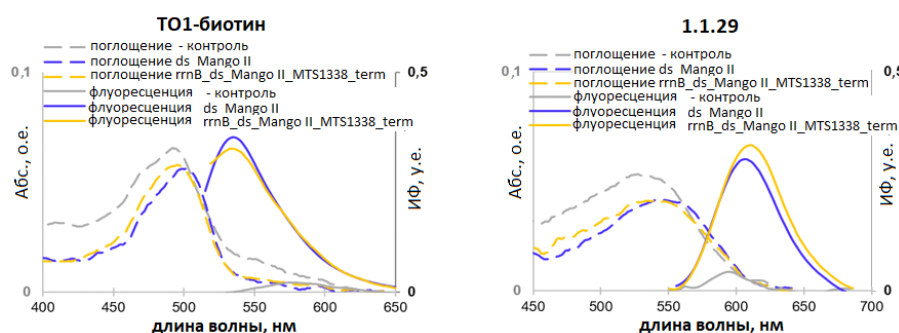
Чтобы исключить артефакты, связанные с цитотоксичностью, мы проверили влияние лидерного **1.1.29** и других красителей на метаболическую активность макрофагов-хозяев и скорость роста бактерий. Цитотоксичность красителей оценивали с использованием мышиных макрофагов (культура клеток RAW 264.7, ATCC® TIB-71™). Никаких изменений в морфологии клеток (данные не показаны) или метаболической активности не наблюдалось после 24-часовой инкубации с красителями (**Рисунок 2.1.20A**). На 7-й день даже при концентрации 50 мкМ ни одно из соединений не показало снижения уровня клеточного метаболизма более чем на 50%, что позволяет предположить, что  $CC_{50} > 50$  мкМ для всех тестируемых красителей. Однако красители **1.1.30** и **1.1.31** в этой концентрации вызывали морфологические изменения в клетках (данные не приведены). Мы

также провели анализы цитотоксичности красителя **1.1.29** для бактериальных клеток. Для бактерий не было обнаружено различий в скорости роста в присутствии/отсутствии красителя **1.1.29** в среде (**Рисунок 2.1.20Б**).



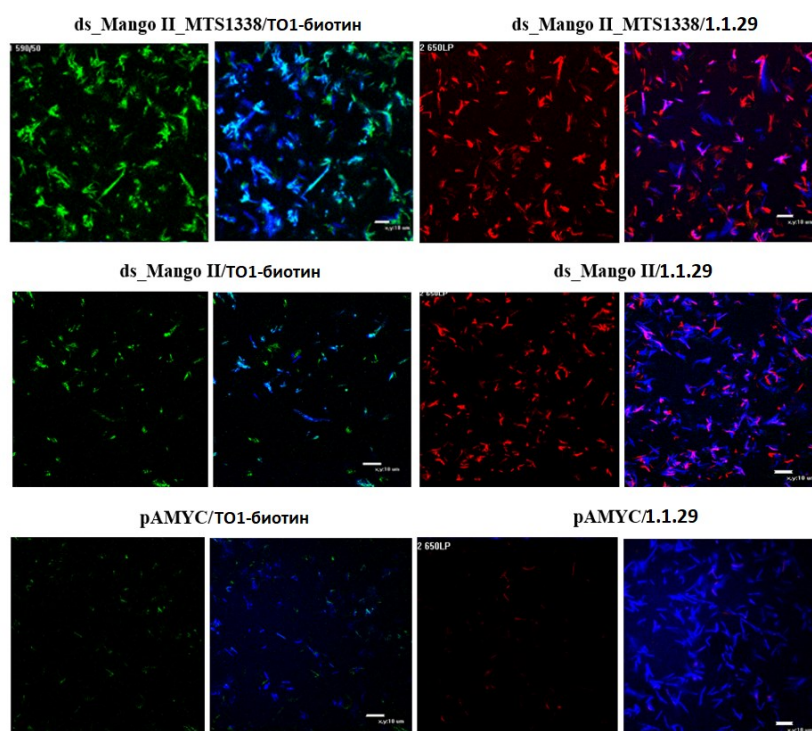
**Рисунок 2.1.20.** Оценка цитотоксичности красителей: (А) для клеточной линии RAW 264.7 после 7-дневной инкубации с **ТО1-биотин** или красителями **1.1.28-1.1.31** по ИФ с использованием реагента PrestoBlue® и (Б) бактериальных клеток с использованием измерений оптической плотности (OD<sub>600</sub>). Кривые роста *M. smegmatis\_pAMYC* в присутствии красителя **1.1.29** в концентрациях 400 нМ, 1 мкМ и без красителя (LB, положительный контроль). Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

Модульную РНК и контрольный ds\_Mango II получали с помощью транскрипции *in vitro*. Селективное увеличение ИФ красителя **1.1.29** и контрольного красителя **ТО1-биотин** при их взаимодействии с данной РНК подтверждали в кювете. В соответствии с данными на **Рисунке 2.1.15**, оба красителя показали выраженную флуоресценцию в присутствии РНК, меченной Манго II, но не в присутствии РНК без метки (отрицательный контроль) (**Рисунок 2.1.21**).



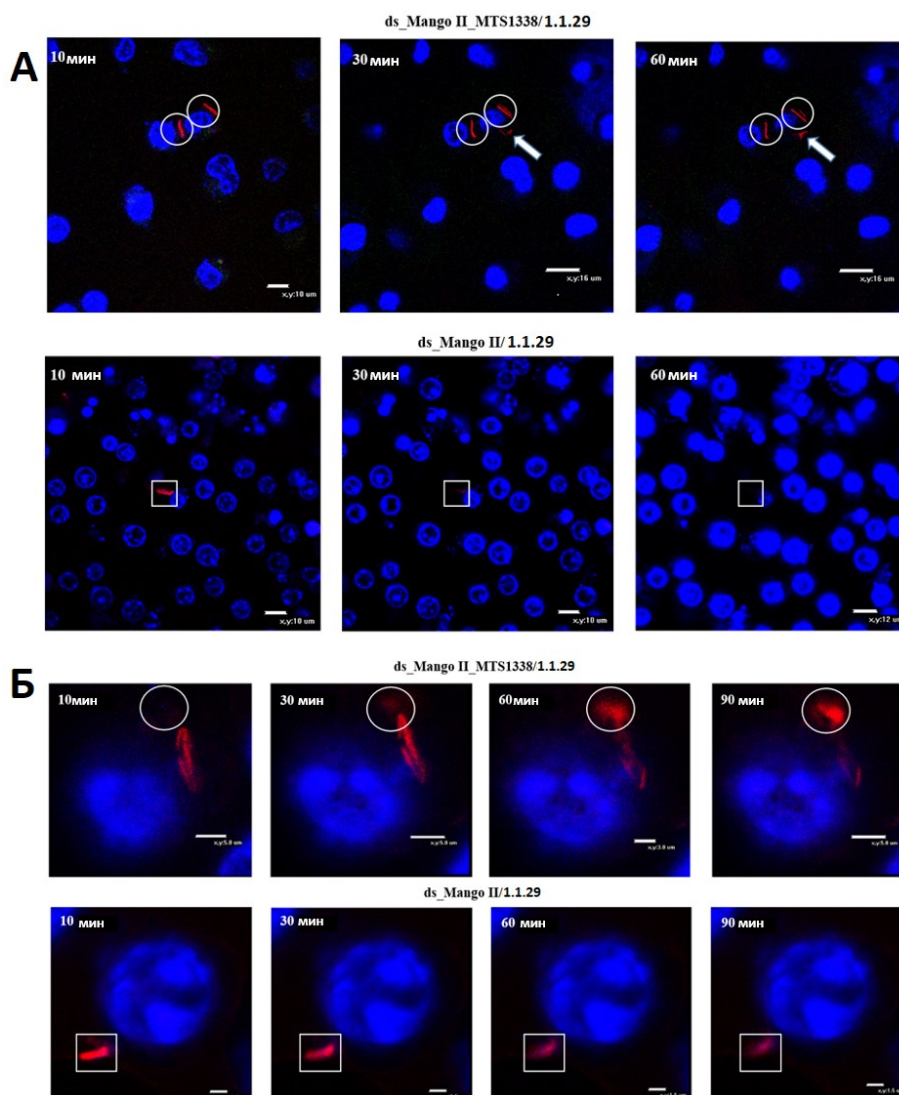
**Рисунок 2.1.21.** Спектры красителей **ТО1-биотин** и **1.1.29** в смеси с меткой, генетической конструкцией, меченной Манго II, и контрольной РНК. Спектры поглощения и флуоресценции красителей в смеси с rrnB\_Mango II\_MTS1338\_term, ds\_Mango II и случайной последовательностью РНК без Манго (отрицательный контроль). Условия: 1 мкМ РНК, 1 мкМ краситель, 20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,2, 0,05% Твин-20, 140 мМ KCl.

Затем мы создали клоны *Mycobacterium Smegmatis* (MSmeg), экспрессирующие модульную РНК, метку ds\_Mango II, и клон, трансформированный пустым вектором (в качестве отрицательного контроля). Мы использовали непатогенную *Mycobacterium smegmatis* mc(2)155, поскольку ее геном и метаболизм очень схожи с *Mycobacterium Tuberculosis*. MSmeg также имеет значительно более высокую скорость роста, гораздо легче подвергается генетическим модификациям и поэтому широко используется в качестве суррогатного организма [362]. MSmeg не содержит гена MTS1338. Визуализация модульной РНК и метки ds\_Mango II в живых бактериальных клетках показана на **Рисунке 2.1.22**. Изображения демонстрируют высокую флуоресценцию комплексов модульной РНК и ds\_Mango II как с **Т01-биотин**, так и с красителем **1.1.29**. Поскольку визуализацию живых бактерий проводили в растворе, флуоресцентные сигналы от комплексов конструкция/краситель (в зеленом/красном каналах) не всегда совпадали с сигналами, генерируемыми Хехст 33258 (синий канал) из-за движения бактерий. В экспериментах с бактериями, трансформированными пустым вектором pAMYC и окрашенными **Т01-биотин** или красителем **1.1.29**, ярко-зеленых или красных сигналов обнаружено не было.



**Рисунок 2.1.22.** Визуализация генетически кодируемых модульной РНК ds\_Mango II\_MTS1338 и ds\_Mango II в *M. smegmatis* в растворе с использованием красителя **Т01-биотин** (визуализация в зеленом канале) и красителя **1.1.29** (визуализация в красном канале). Бактерии, трансформированные pAMYC без вставки, использовали в качестве отрицательного контроля. Бактерии окрашивали красителем Хехст 33258 (визуализация в синем канале). Масштаб: 10 мкм.

Для дальнейшего изучения распределения и возможной секреции MTS1338 внутри инфицированных живых макрофагов мы отслеживали изменения флуоресцентного сигнала комплексов модульной РНК и метки ds\_Mango II с красителем **1.1.29** в течение 1 и 1,5 часов. Для этого эксперимента мы выбрали масштаб, обеспечивающий визуализацию ~1-2 фагоцитированных бактерий (Рисунок 2.1.23).



**Рисунок 2.1.23.** Отслеживание сигнала генетически кодируемой модульной РНК или метки ds\_Mango II в инфицированных макрофагах RAW 264.7 с красителем **1.1.29** в течение 1 часа (10, 30 и 60 минут) (А) и 1.5 часов (10, 30, 60 и 90 мин) (Б) (широкопольные изображения (А) и увеличенный масштаб (Б)). Ядра макрофагов окрашивали Хехст 33258. Кругками показано сохранение/перемещение сигнала, а квадратами - область снижения интенсивности/исчезновения флуоресцентного сигнала.

Поскольку *Mycobacterium smegmatis* не является патогенной, бактериальные клетки подвергаются лизису в фаголизосомах. Также бактериальные клетки могут располагаться внутри макрофагов в разных положениях относительно плоскости визуализации.



Следовательно, через некоторое время мы сможем визуализировать в основном флуоресцентные РНК, но не бактерии. Если бы в поле зрения было много фагоцитированных бактерий, флуоресцентные сигналы было бы трудно отследить и аннотировать для конкретной бактерии. Таким образом, небольшое количество бактерий в поле зрения позволяет идентифицировать флуоресцентные сигналы непосредственно от конкретной бактерии и наблюдать за их миграцией.

Анализ отдельных инфицированных клеток позволил наблюдать миграцию красного флуоресцентного сигнала от бактериальной клетки, экспрессирующей модульную РНК, внутри инфицированного макрофага, при этом очертания бактерии постепенно исчезали. В то же время в макрофагах, инфицированных контрольным штаммом, экспрессирующим только метку ds\_Mango II, подобной миграции сигнала не наблюдалось. Вместо этого мы наблюдали постепенное снижение интенсивности сигнала и исчезновение бактерии. Подобно результатам, полученным при визуализации MTS1338 в инфицированных макрофагах с помощью аптамера Брокколи [363], это может указывать на секрецию MTS1338 в цитоплазму макрофагов и согласуется с предполагаемой функцией MTS1338 [364]. Хотя для дальнейшей характеристики функций MTS1338 необходимы дополнительные эксперименты, полученные данные подтверждают участие MTS1338 во взаимодействиях бактерия-хозяин. Кроме того, результаты подтверждают применимость разработанной системы визуализации (укороченная метка для визуализации короткой РНК+флуорогенный краситель, флуоресцирующий в красной области видимого света) для визуализации мнкРНК внутри инфицированных живых клеток.

Таким образом, мы разработали новую эффективную схему синтеза и получили новый флуорогенный краситель **1.1.29** с повышенной селективностью и флуоресценцией в красной области видимого спектра, который выглядит перспективным, в сочетании со стабильным в живых клетках аптамером Манго II, для визуализации/отслеживания РНК и разработки FRET-систем. Кроме того, мы предложили сократить размер метки за счет сокращения длины широко используемого стабилизирующего остова F30, что особенно полезно для визуализации мнкРНК, обычно имеющих небольшую длину, в живых клетках. Эффективность предложенной системы была проверена на примере отслеживания миграции флуоресцентного сигнала от меченой бактериальной РНК в макрофагах, инфицированных суррогатом *M. tuberculosis* - *M. smegmatis*. Таким образом, наш подход может найти применение при разработке генетически кодируемых молекулярных инструментов для визуализации отдельных малых РНК в сложных системах, в том числе для прояснения роли РНК в патогенезе.

Выше была разработана система флуоресцентной визуализации на основе пары аптамер-флуоресцентный краситель. Далее, мы решили создать Раман-активный краситель, обладающий сродством к структурным мотивам, часто присутствующим в аптамерах, и применимый в качестве внешнего генератора сигнала в аптасенсорах.

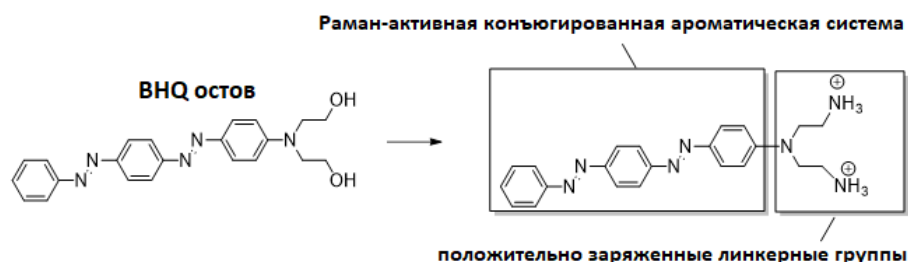
Рамановская спектроскопия представляет собой неразрушающий метод химического анализа, основанный на регистрации неупругого рассеяния света образцом (комбинационного рассеяния, КР). Спектры отражают колебательные моды характерных функциональных групп присутствующих в образце соединений. Для количественного определения низкопредставленных в образце аналитов чувствительность метода недостаточна; необходимы его модификации – например, иммобилизация аналита на поверхности металлических наночастиц, способных при облучении генерировать плазмон, что усиливает локальное электрическое поле и детектируемый сигнал КР. Данный эффект известен как гигантское комбинационное рассеяние (ГКР), а вариация метода – как поверхностно-усиленная Рамановская спектроскопия (ПУРС) Применение ПУРС для обнаружения аналитов в биологических жидкостях и иных многокомпонентных смесях [365] возможно при использовании аптамеров и Раман-активных красителей в качестве распознающих и генерирующих сигнал элементов сенсоров соответственно [366–368]. Примерами служат аптасенсоры для обнаружения вирусов гриппа А и коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома-2 (SARS-CoV-2) [369–372], а также ряд сенсоров на малые молекулы. Общий принцип действия ПУРС-аптасенсоров сводится к тому, что при связывании аналита с фиксированным на наночастицах аптамером происходит включение в комплекс РАМАН-активного красителя, вытеснение красителя, изменение конформации аптамера со встроенным красителем или иная перестройка, в результате которой увеличивается [371,372] или уменьшается [369,370] расстояние между красителем и поверхностью наночастицы, вызывая резкое уменьшение или увеличение сигнала соответственно [370,371]. В качестве Раман-активных красителей применяются молекулы с выраженным поглощением в УФ-видимом диапазоне, такие как малахитовый зеленый, кристаллический фиолетовый и нильский синий [373]. Краситель должен быть аффинен к аптамеру или встроен в него, следовательно, подбор оптимальных красителей следует проводить с учетом особенностей аптамеров. Наиболее частые элементы вторичной структуры аптамеров - G4 [374] или неканонические пары оснований гуанин-гуанин [375]. В этой связи при дизайне красителей целесообразно использовать критерии, применимые к G4-лигандам.

Эти лиганды обычно содержат конъюгированную/сопряженную ароматическую систему, обеспечивающую стэкинговые взаимодействия с остатками гуанинов, и



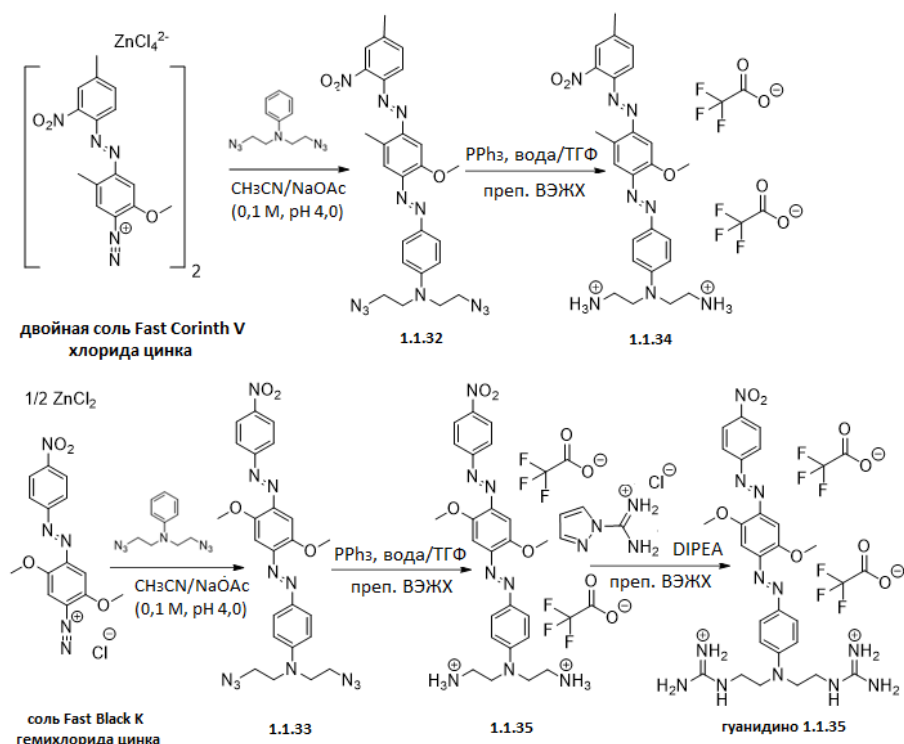
положительно заряженные линкерные группы, определяющие взаимодействия с сахарофосфатным остовом [376].

В нашем исследовании мы решили разработать Раман-активные красители, обладающие существенной аффинностью к различным ансамблям остатков гуанина (G-тетрадам и неканоническим G-G парам), и оценить их потенциал в составе аптасенсоров в качестве внешних генерирующих сигнал элементов. В качестве отправной точки для модификации мы выбрали два представителя азокрасителей Black Hole Quencher-1 (ВНQ-1) и Black Hole Quencher-2 (ВНQ-2) с большим коэффициентом молярной экстинкции и расширенной сопряженной ароматической системой. Действительно, ВНQ-2 проявляет рамановскую активность [377,378], а ряд азокрасителей с одной азогруппой между двумя ароматическими циклами взаимодействует с внешней G-тетрадой G4 [379–382]. Чтобы разрабатываемые нами молекулы содержали все элементы G4-лигандов, обеспечивающие значительную аффинность к G-богатым структурам, мы решили ввести положительно заряженные линкерные группы для взаимодействия с сахарофосфатным остовом (**Рисунок 2.1.24**).



**Рисунок 2.1.24.** Дизайн новых Раман-активных красителей, обладающих сродством к структурам, формируемым G-богатыми последовательностями.

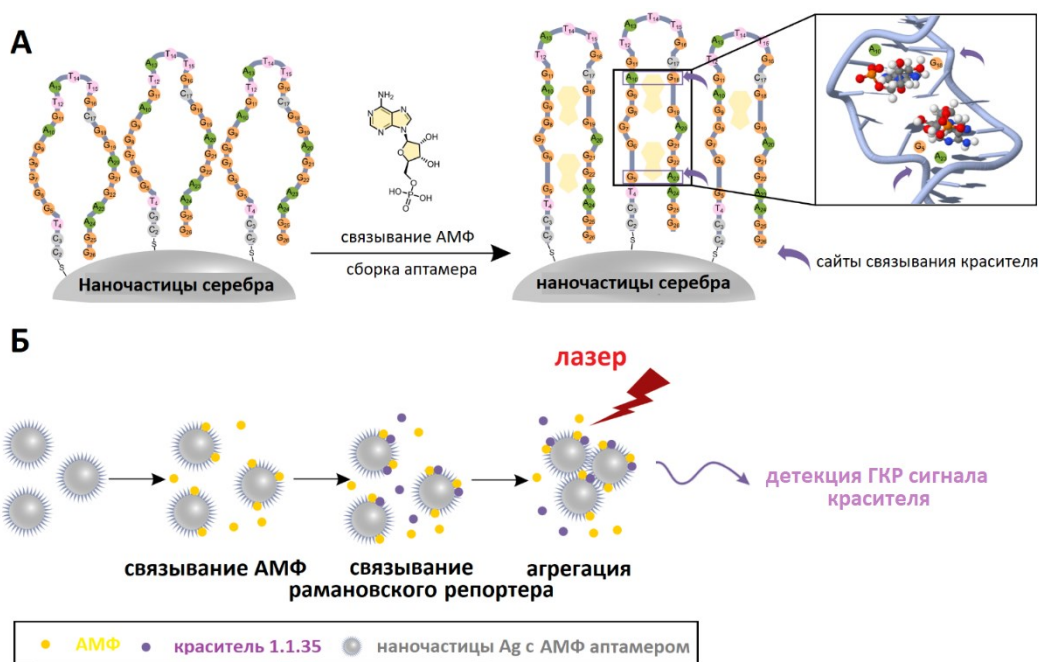
Азосочетание между диазониевой солью Fast Corinth V или Fast Black K и *N,N*-бис(2-азидоэтил)анилином [383] проводили по опубликованному протоколу с небольшими модификациями, получая новое соединение ВНQ-1-(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**1.1.32**) и описанное соединение ВНQ-2-(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**1.1.33**) [384] (**Схема 2.1.3.**). Затем азидогруппы были восстановлены до аминогрупп обработкой соответствующего производного трифенилфосфином в смеси тетрагидрофуран/вода. После препаративной ВЭЖХ получали производные ВНQ-1-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (**1.1.34**) и ВНQ-2-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (**1.1.35**) в виде трифторацетатных солей. Наконец, гуанидинилирование соли красителя **1.1.35** обработкой гидрохлоридом 1Н-пиразол-1-карбоксамидина в присутствии ДИПЭА [385] обеспечило, после препаративной ВЭЖХ, производное ВНQ-2-(NH(NH)NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (**гуанидино 1.1.35**) в виде трифторацетатной соли.



**Схема 2.1.3.** Синтез производных BNQ-1 и BNQ-2.

Сотрудники кафедры химии природных соединений (Химический факультет МГУ) под руководством д.х.н., доцента Завьяловой Е.Г. показали, что синтезированные красители являются Раман-активными на агрегированных наночастицах серебра, и использовали их в разработке аптасенсоров на АМФ и частицы вируса гриппа А.

Основным элементом аптасенсоров на АМФ является ДНК-аптамер, который связывает исключительно аденозин, АМФ или АТФ ( $K_D$  составляет приблизительно 6 мкМ) из пула других нуклеозидов и нуклеотидов [386]. Первоначально предполагалось, что аптамер имеет структуру антипараллельного G4. Однако последующая структурная работа Лина и Пателя [375] показала, что комплекс АМФ и аптамера содержит две молекулы АМФ, которые координируются со шпилькообразной структурой аптамера (**Рисунок 2.1.25А**). Каждая молекула АМФ образует пару гуанин-аденин (G-A) с неспаренным G9 или G22 аптамера, и пара располагается между фланкирующими парами оснований G8-G19 или G6-G21 и A10-G18 или A23-G5 аптамера (**Рисунок 2.1.25А**).



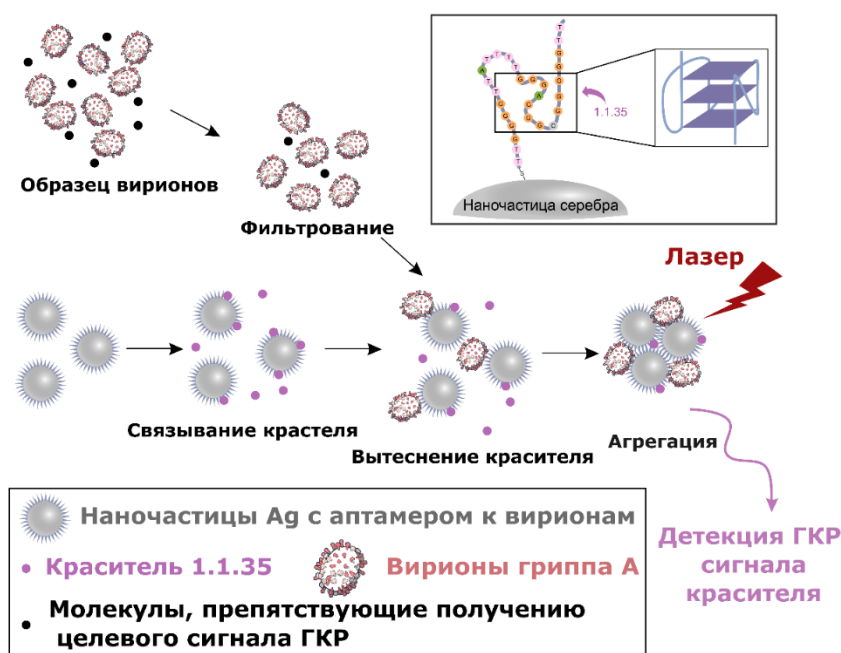
**Рисунок 2.1.25.** Схематическое изображение сборки аптамера при взаимодействии с двумя молекулами АМФ и красителем **1.1.35** (А) и принцип действия предлагаемого биосенсора (Б). АМФ-зависимая сборка аптамера, иммобилизованного на поверхности наночастиц серебра, обеспечивает встраивание в него Раман-активного красителя и, как следствие, сближение красителя с поверхностью наночастиц. При последующем облучении агрегировавших частиц детектируется ГКР-сигнал.

Синтезированные красители были протестированы с АМФ-аптамером, иммобилизованным на поверхности наночастиц на АМФ-зависимое изменение сигнала ГКР, в результате был отобран лидер - **1.1.35**. Стоит отметить, что связывание **1.1.35** не влияло на вторичную структуру аптамера, как было установлено с помощью КД-спектроскопии. По данным коллектива Е. Г. Завьяловой, аптасенсор с красителем **1.1.35** (**Рисунок 2.1.25Б**) обеспечивал количественное определение АМФ в диапазоне концентраций от 2 нМ до 200 мкМ, хотя АМФ-зависимость ГКР-сигнала красителя была нетривиальна (сигнал монотонно возрастал до 1 мкМ АМФ, а затем монотонно снижался) [387] — предположительно, из-за конкуренции между красителем и АМФ при высоких концентрациях последнего [386].

Сотрудники кафедры химии природных соединений (Химический факультет МГУ) под руководством д.х.н., доцента Завьяловой Е.Г. также использовали краситель **1.1.35** в качестве Раман-активного G4-лиганда в комбинации с аптамером RNA0385 [388] к гемагглютинирующему вирусу гриппа А, находящемуся на поверхности вирусных частиц.

Аптамер имеет структуру параллельного G4 с двумя наружными G-тетрадами, доступными для взаимодействия с полиароматическими молекулами [389].

Краситель **1.1.35** взаимодействовал с RHA0385 с  $K_D$  комплекса в наномолярном диапазоне, которая зависела от ионной силы используемого раствора. Основным преимуществом красителя являлся его интенсивный ГКР-сигнал на наночастицах коллоидного серебра, который снижался в 10 раз, но не исчезал полностью в биологических жидкостях, в отличие от сигнала таких красителей как Cyanine-3 и Bodipy FL. При этом, интенсивность ГКР-сигнала красителя увеличивалась в 2 раза при добавлении к наночастицам, функционализированным аптамером RHA0385, что указывало на сборку комплекса, которая увеличивала локальную концентрацию красителя вблизи поверхности наночастиц. Как и в случае сенсора на АМФ, наблюдалась конкуренция красителя с анализом — гемагглютининсодержащими вирусными частицами — за связывание с аптамером RHA0385. Это позволило разработать действующий по принципу конкурентного связывания сенсор для обнаружения вируса гриппа А (**Рисунок 2.1.26**) с пределом обнаружения около 1000 вирусных частиц/мл [390], что сопоставимо с характеристиками описанного ранее электрохимического сенсора [391] и метода на основе ОТ-ПЦР [392].



**Рисунок 2.1.26.** Схематическое изображение разработанного сенсора. Молекулы, препятствующие получению целевого ГКР-сигнала, отфильтровывают, и вирусные частицы, выделенные с мембраны, вытесняют краситель **1.1.35** из комплекса с аптамером на поверхности наночастиц серебра, снижая интенсивность ГКР-сигнала.

Эти результаты подтверждают применимость разработанного нами красителя **1.1.35** в качестве генерирующего сигнал элемента аптасенсора.

В результате приведенных в разделе исследований:

- Осуществлен дизайн и синтез флуоресцентных зондов с улучшенной способностью отличать G4 от других вторичных структур по сравнению с используемыми для этих целей стандартными зондами - тиофлавином Т (ThT) и тиазоловым оранжевым ТО;

- предложены принципы увеличения яркости комплексов аналогов хромофора GFP с двухмодульными структурами G4+дуплекс за счет варьирования длины дуплексного модуля;

- разработан высокоэффективный подход к синтезу красителей для аптамеров семейства Манго, используемых для визуализации РНК в живых системах. Продемонстрирована применимость платформы, включающей оптимизированную сверхкороткую метку на основе аптамера Манго II и новый флуорогенный краситель, флуоресцирующий в красной области видимого спектра, для визуализации мнкРНК микобактерии в инфицированных макрофагах;

- осуществлен дизайн и синтез Раман-активных красителей на основе каркаса семейства тушителers Black Hole Quencher с высокой аффинностью к ансамблям из остатков гуанина, применимых в качестве внешнего генерирующего сигнал элемента высокочувствительных аптасенсоров на основе поверхностно-усиленной Рамановской спектроскопии.

## 2.2. Регуляторы стабильности G4 и псевдоузла

Неканонические вторичные структуры нуклеиновых кислот, такие как G4, иМ, псевдоузлы (ПУ) и др., могут образовываться в ДНК и РНК животных, бактерий и вирусов и осуществлять регуляцию таких процессов как репликация, транскрипция, трансляция и образование биомолекулярных конденсатов. Например, G4 рассматриваются в настоящее время как многообещающие и привлекательные мишени для противораковой, противовирусной и антибактериальной терапии [73,266,393–395]. Широкомасштабные полногеномные исследования последовательностей, образующих G4, показали преобладание данных структур в регуляторных областях человеческого генома, например, в промоторных областях онкогенов *c-Kit*, *c-Myc*, *BCL-2*, *K-Ras*, *H-Ras* и подобных [396]. G4 могут быть мишенями для направленной регуляции экспрессии онкогенов. В свою очередь, G4, обнаруженные в теломерных областях, предположительно способствуют поддержанию целостности теломер, а их стабилизация может ингибировать теломеразу [266]. Кроме того, сайты, способные образовывать РНК G4, идентифицированы в геномах ВИЧ-1, вируса Зика, вируса Эбола, папилломавирусов и др. [395,397,398] Наконец, последовательности, предположительно образующие G4, обнаружены в геномах простейших (*Trypanosoma brucei* и *Plasmodium falciparum*) и бактерий (*Mycobacterium Tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* и др.) [399–404].

Регуляция, включающее как повышение, так и понижение стабильности подобных неканонических вторичных структур, может приводить к терапевтическому эффекту. Регуляторами могут выступать низкомолекулярные соединения (лиганды), специфичные к определенным типам неканонических структур, или модифицированные олигонуклеотиды, аффинные к элементам таких структур и способные переводить их в дуплексную форму. Отдельно стоит отметить соединения, имеющие повышенное сродство к двухмодульным неканоническим структурам – например, сочетаниям G4 и шпилечных элементов, обнаруженным в геномах вирусов.

Данный раздел написан по результатам совместной работы автора с сотрудниками лаборатории структуры и функций биополимеров (Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства, Москва), лаборатории структурной биологии ионных каналов (ИБХ РАН), лаборатории молекулярной диагностики (ИБХ РАН), лаборатории молекулярной иммунологии (ИБХ РАН), кафедры химии природных соединений (химический факультет МГУ, Москва), лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом (Федеральный научный центр исследований и

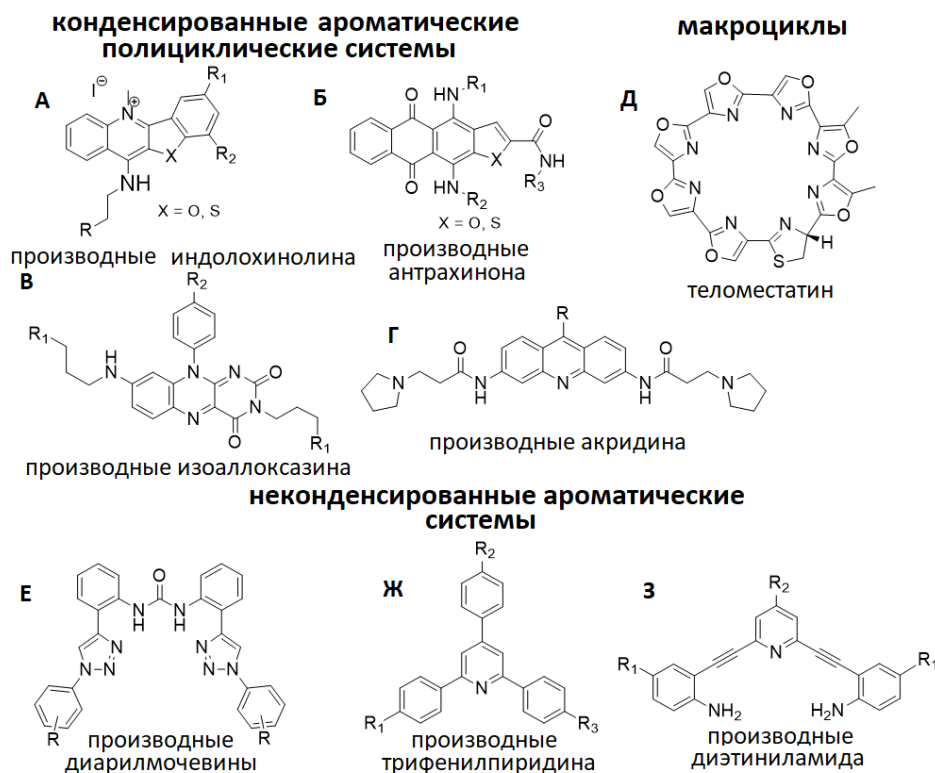
разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва), а также коллегами по группе молекулярных инструментов для исследования живых систем: *Org. Biomol. Chem.* 2020. № 18. С. 6147–6154; *Biochimie.* 2022. № 201. С. 43-52; *Biomolecules.* 2021. № 11. С. 1409; *Biomolecules.* 2023. № 13. С. 1660.

При этом, в данном разделе лично и под руководством автора или при его участии выполнены следующие эксперименты:

- синтез G4-лигандов **1.1.40, 1.1.42, 1.1.44, 1.1.45, 1.1.46, 1.1.49-1.1.51, 1.1.52, 1.1.53** и изучение их свойств (кроме оценки цитотоксичности соединений);
- скрининг и оценка селективности описанных аналогов хромофора GFP по отношению к двухмодульной структуре LTR-III G4, дизайн и синтез соединений **1.1.66-1.1.68, 1.1.74-1.1.79** и оценка их свойств;
- выбор сайтов воздействия, дизайн модифицированных олигонуклеотидов, нацеленных на выбранные сайты в ПУ генома SARS-CoV-2, и оценка их свойств с помощью КД-спектроскопии, электрофореза в ПААГ и двойного люциферазного теста.

G4-лиганды представляют собой низкомолекулярные соединения, которые могут связываться с G4 и модулировать их термическую стабильность. В геномном контексте взаимодействия G4-лиганда могут привести к нарушению репликации, трансляции или транскрипции [405]. В связи с этим было разработано большое количество соединений в попытке создать селективные и эффективные G4-связывающие молекулы [406], и одно такое соединение CX-5461 (пиднарулекс) прошло первую стадию клинических исследований [407]. Однако, недавно было показано, что пиднарулекс вызывает обширный, неселективный побочный мутагенез *in vitro* [408]. Тем не менее дизайн новых эффективных G4-лигандов выглядит перспективным в свете получения конъюгатов олигонуклеотидов и G4-лигандов, обеспечивающих селективное воздействие на целевую структуру [409].

Соединения, взаимодействующие с G4, в целом можно разделить на три группы: (i) конденсированные ароматические полициклические системы, такие как производные изоаллоксазина, индолохинолина, антрахинона и акридина [385,410–414] (**Рисунок 2.2.1А-Г**), (ii) макроциклические соединения, такие как теломестатин [415,416] (**Рисунок 2.2.1Д**), (iii) неконденсированные ароматические системы, в которых ароматические фрагменты из двух или более конденсированных колец соединены гибким линкером, например, производные диарилмочевина, трифенилпиридина, диэтиламида и т. д.) [417–422] (**Рисунок 2.2.1Е-З**).



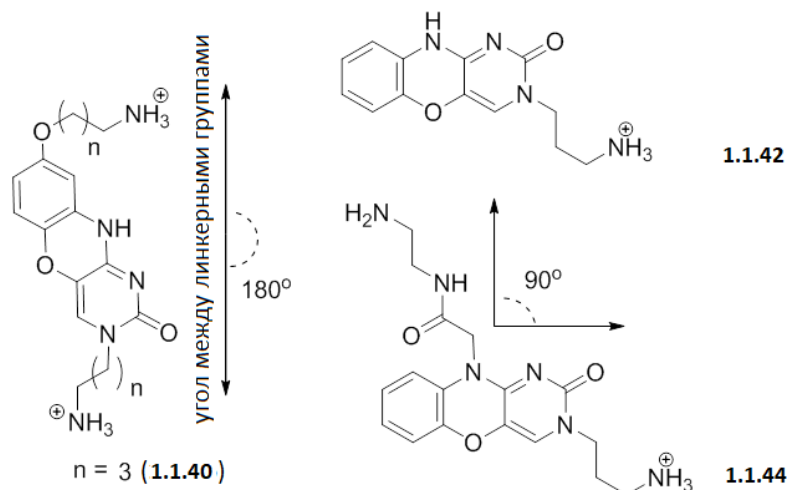
**Рисунок 2.2.1.** Структуры каркасов G4-лигандов: конденсированные ароматические полициклические системы (А-Г), макроциклы (Д) и неконденсированные ароматические системы (Е-З).

Феноксазин, природное трициклическое соединение, входит в состав хорошо известных антибиотиков и противоопухолевых агентов, таких как, актиномицин D (ActD) [423]. ActD может влиять на транскрипцию за счет связывания с одно- и двухцепочечным фрагментами и G4 ДНК [423–425]. Однако исследования связывания ActD с 27-нуклеотидным сегментом в промоторе гена *c-Мус* показали, что он не обладает селективностью к G4 по сравнению с дуплексом [426]. Используя двойной люциферазный тест, были идентифицированы два низкомолекулярных G4-лиганда на основе бензо[а]феноксазина с N-(3-диметиламинопропил)аминокарбонильной боковой группой, но их влияние на термостабильность G4 не было изучено [427]. Таким образом, феноксазин представляется подходящим каркасом для дизайна G4-лигандов. Однако для повышения G4-стабилизирующих свойств и, потенциально, специфичности необходимо введение и изучение дополнительных заместителей и модификаций.

На первом этапе настоящего исследования мы синтезировали несколько новых соединений, принадлежащих к классу конденсированных ароматических полициклических систем, на основе 1,3-диаза-2-оксофеноксазина с одним или двумя заместителями, изучили их G4-стабилизирующие эффекты и селективность.

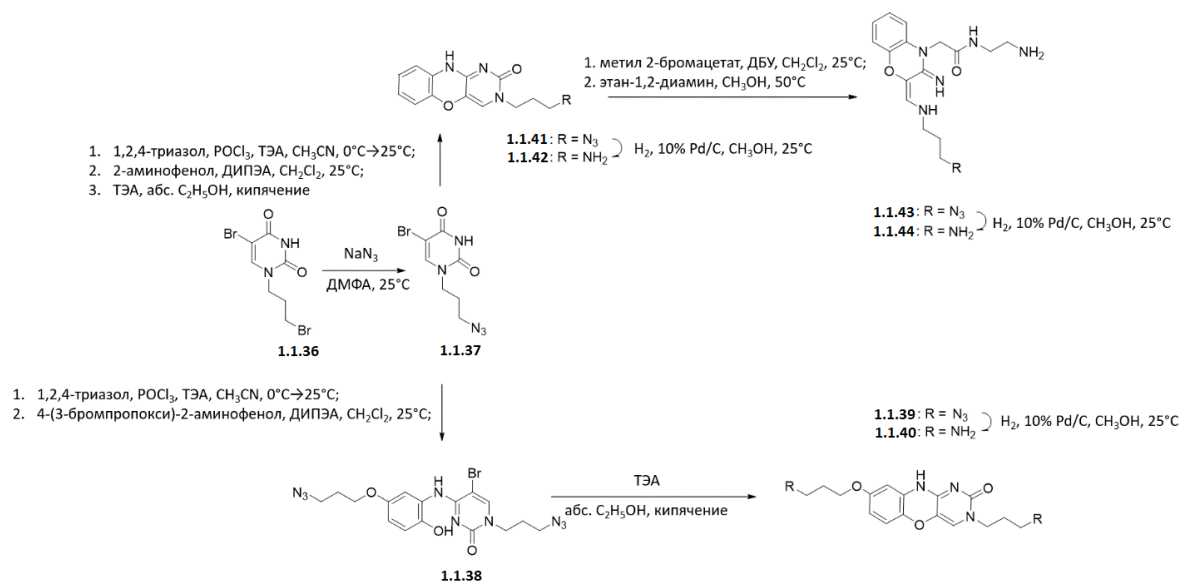


Производное 1,3-диаза-2-оксофеноксазина **1.1.40** с расположением двух аминоалкил-содержащих заместителей под углом «180°» и его аналоги **1.1.42** и **1.1.44** с одним или двумя заместителями, расположенными под углом «90°», соответственно показаны на **Рисунке 2.2.2**. Из литературы известно, что оптимальной длиной алкильного фрагмента аминоалкил-содержащего заместителя является С3 (пропил) [406].



**Рисунок 2.2.2.** Дизайн G4-лигандов на основе 1,3-диаза-2-оксофеноксазина.

Разрабатываемые лиганды являются новыми соединениями, и их синтез показан на **Схеме 2.2.1**. Для получения соединения **1.1.40** производное *N*-бромпропилурацила **1.1.36** [428] обрабатывали азидом натрия в ДМФА с образованием **1.1.37**. Активацию атома С4 урацильного кольца невозможно осуществить с помощью широко используемой реакции Аппеля [13], поскольку трифенилфосфин может реагировать с азидной группой соединения **1.1.37**. По этой причине активацию проводили обработкой 1,2,4-триазолом,  $\text{POCl}_3$  и ТЭА в  $\text{CH}_3\text{CN}$  [429] с последующим замещением 1,2,4-триазиольной группы на 4-(3-бромпропокси)-2-аминофенол в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с получением **1.1.38**. Последующая циклизация кипячением в смеси абсолютного этанола и ТЭА давала соединение **1.1.39**. Наконец, каталитическое гидрирование азидосодержащего производного **1.1.39** давало целевой лиганд **1.1.40**. Кроме того, по той же схеме, но с использованием 2-аминофенола вместо 4-(3-бромпропокси)-2-аминофенола, был получен аналог **1.1.42** с одним аминопропильным заместителем.



**Схема 2.2.1.** Синтез G4-лигандов на основе 1,3-диаза-2-оксофеноксазина.

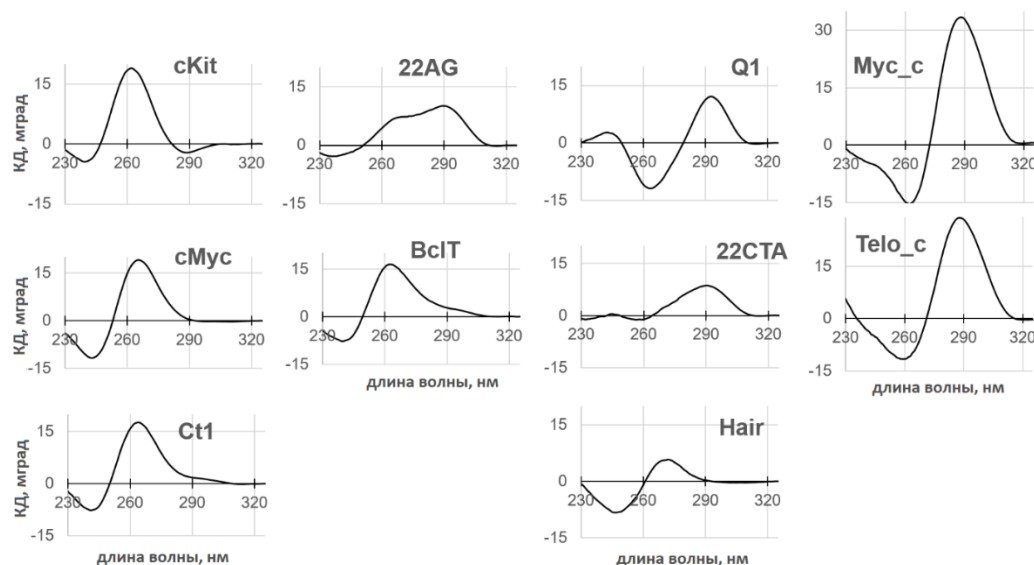
Можно условно считать, что аминопропильные заместители в соединении **1.1.40** ориентированы под углом 180° друг к другу. Для дальнейшего исследования влияния изменения расположения данных групп на G4-стабилизирующие свойства лигандов было разработано дополнительное производное **1.1.44**, в котором группы ориентированы под углом 90° относительно друг друга. С этой целью соединение **1.1.41** алкилировали обработкой метил 2-бромацетатом в присутствии ДБУ, и затем сложноэфирную группу подвергали взаимодействию с этан-1,2-диамином в CH<sub>3</sub>OH, получая **1.1.43**. Каталитическое гидрирование **1.1.43** давало целевой лиганд **1.1.44**.

G4-стабилизирующие эффекты лигандов оценивали с помощью теста с FRET-плавлением. Для этого теста мы получили набор меченных FAM/BNQ аналогов хорошо охарактеризованных G4-структур (Таблица 2.2.1). Набор включал внутримолекулярные антипараллельные G4 (а-G4) Q1 [315] и 22СТА [312], гибридный G4 (г-G4) 22AG [73], параллельные G4 (п-G4) с-Мус и с-Kit1 [430] и гибридные/параллельные несовершенные G4 (имп-G4) Ct1 и BclT [316]. В качестве контрольной шпильки использовали меченую шпильку Hair. Поскольку известно, что некоторые описанные G4-стабилизирующие лиганды влияют на иМ [176], мы дополнили набор ОДН мечеными аналогами двух известных иМ из промотора *с-Мус* [431] и теломерных областей [432] человека (Мус\_с и Telo\_с соответственно). Вторичная структура меченых ОДН была подтверждена методом КД-спектроскопии (Рисунок 2.2.3). Введение меток не привело к каким-либо принципиальным изменениям соответствующих топологий G4.

**Таблица 2.2.1.** Последовательности ОДН и их вторичная структура.

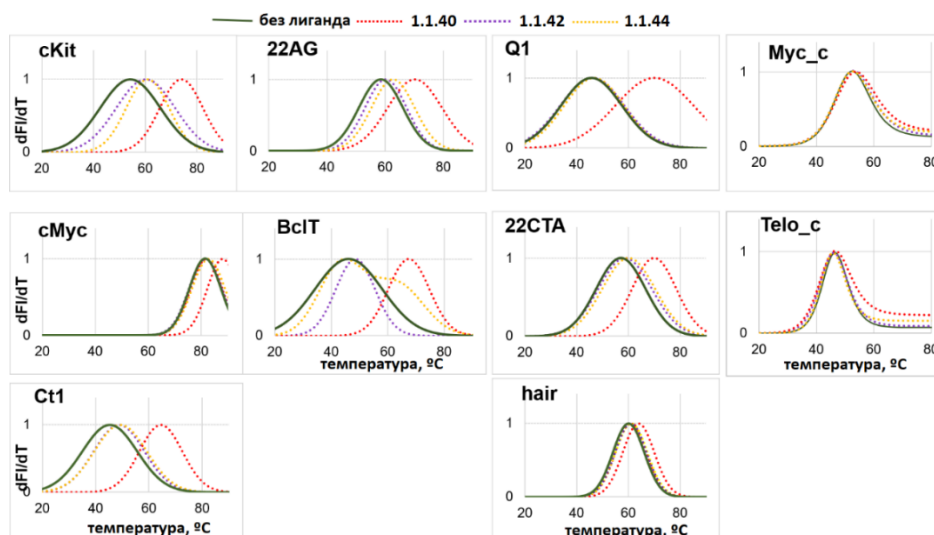
| шифр   | Тип фолдинга* | последовательность                        |
|--------|---------------|---|
| 22AG   | г-G4          | FAM-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-BHQ            |
| с-Myc  | п-G4          | FAM-TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA-BHQ            |
| с-Kit  | п-G4          | FAM-GGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG-BHQ             |
| Ct1    | п-импG4       | FAM-GGTGACAGGGGTATGGGGAGGGG-BHQ           |
| BclT   | п/г-импG4     | FAM-GGGGACTTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGG-BHQ |
| Q1     | а-G4          | FAM-GGTTAGGTTAGGTTAGG-BHQ                 |
| 22CTA  | а/г-G4        | FAM-AGGGCTAGGGCTAGGGCTAGGG-BHQ            |
| Hair   | шпилька       | FAM-GTATAGCTATTTTATAGCTATA-BHQ            |
| Myc_c  | иM            | FAM-CCCCACCCTCCCCACCCTCCC-BHQ             |
| Telo_c | иM            | FAM-CCCAATCCCAATCCCAATCCC-BHQ             |

\*г-G4, гибридный G4; п-G4, параллельный G4; а-G4, антипараллельный G4; импG4, имперфектный G4.



**Рисунок 2.2.3.** КД-спектры ОДН, меченных FAM/BHQ. Концентрация ОДН: 3,5 мкМ; условия: 20 мМ фосфат натрия, pH 7,4 (для ОДН с-Kit, с-Myc, Ct1, 22AG BclT, Q1, 22CTA и Hair) или 5,8 (для Myc\_c и Telo\_c) и 10 мМ KCl; температура: 15°C.

Кривые плавления меченых G4/шпильки в отсутствие и в присутствии лигандов, полученные в одинаковых условиях (ионная сила раствора низкая-средняя, pH 7,4), и аналогичные кривые для иM при pH 5,8 показаны на **Рисунке 2.2.4**.



**Рисунок 2.2.4.** Кривые плавления меченых ОДН в присутствии лигандов при фиксированной концентрации. Условия: 20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,4 (для ОДН c-Kit, c-Мус, Ct1, 22AG BclT, Q1, 22СТА и Hair) или 5,8 (для Мус\_c и Telo\_c) и 10 мМ KCl. концентрация ОДН: 0,5 мкМ; концентрация лиганда: 10 мкМ.

Температуры плавления G4/шпильки/иМ ( $T_{пл}$ ) и стабилизирующее действие лигандов ( $\Delta T_{пл} = T_{пл}^{G4+лиганд} - T_{пл}^{G4}$ ) при соотношении G4:лиганд = 1:20 приведены в **Таблице 2.2.2.**

**Таблица 2.2.2.** Вторичные структуры и термическая стабильность в присутствии/отсутствии лигандов.

| шифр   | Тип фолдинга | $T_{пл} \pm 1^\circ\text{C}$ ,<br>Без лиганда | Стабилизирующий эффект лигандов ( $\Delta T_{пл} \pm 2^\circ\text{C}$ ) |        |        |
|--------|--------------|---|---|--------|--------|
|        |              |   | 1.1.40  | 1.1.42 | 1.1.44 |
| 22AG   | Г-G4         | 57  | 8   | 0      | 3      |
| с-Мус  | п-G4         | 81/46 <sup>a</sup>                            | 7/18  | 0      | 2/9    |
| с-Kit  | п-G4         | 55  | 15  | 4      | 5      |
| Ct1    | п-импGQ      | 42  | 13  | 0      | 2      |
| BclT   | п/Г-импGQ    | 42 <sup>b</sup>                               | 20  | 5      | 0      |
| Q1     | а-G4         | 43  | 20  | 0      | 0      |
| 22СТА  | а/н-G4       | 56  | 10  | 0      | 3      |
| Hair   | шпилька      | 61  | 3   | 0      | 0      |
| Мус_c  | иМ           | 52  | 1   | 1      | 0      |
| Telo_c | иМ           | 46  | 0   | 0      | 0      |

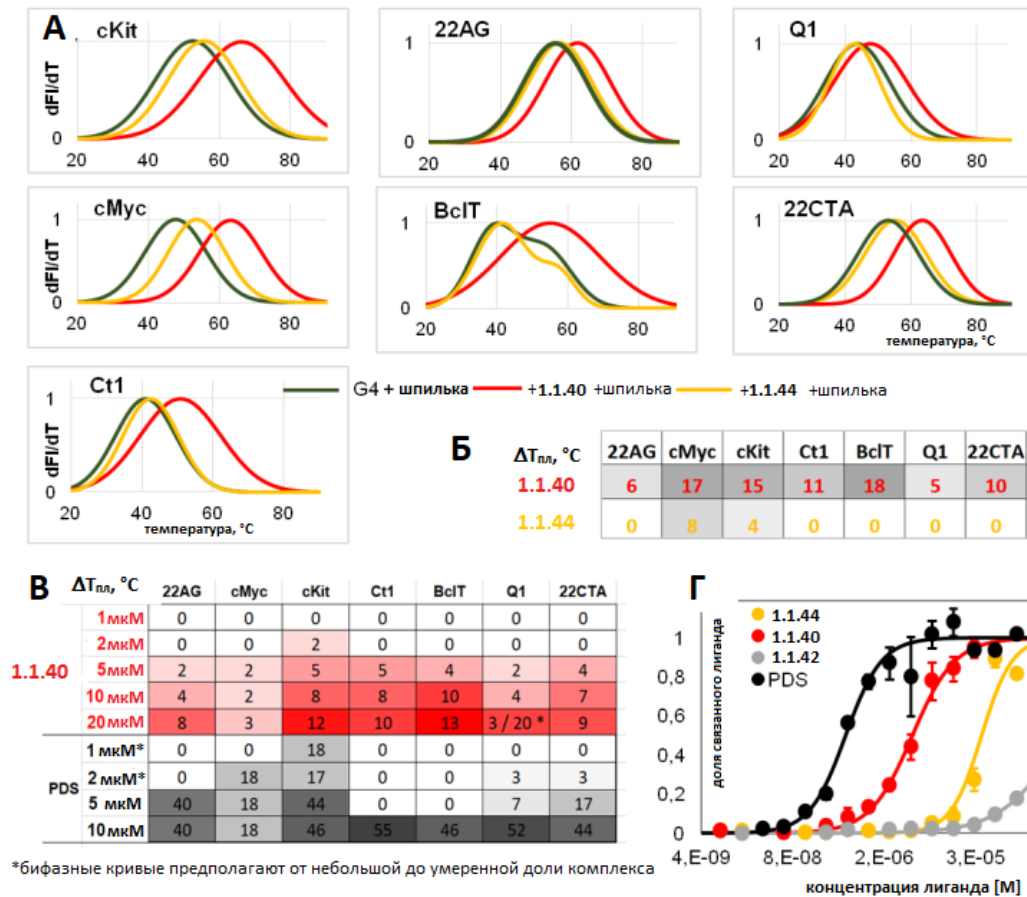
<sup>a</sup>Значения  $T_{пл}$  с-Мус получены в буфере 1/буфере 2. Буфер 1: 20 мМ фосфат натрия, pH 7,4, 10 мМ KCl. Буфер 2: 5 мМ фосфат натрия, pH 7,4, 0,1 мМ KCl и 25 мМ LiCl. Для других ОДН значения  $T_{пл}$  были получены только в буфере 1.

<sup>b</sup>Лиганд вызывает частичные конформационные перестройки, и на кривой связывания BclT появляется дополнительный незначительный переход. Приведенные значения  $\Delta T_{пл}$  относятся к основным переходам.

Ни один из лигандов не вызывал заметной стабилизации шпильчатой структуры или иМ, что указывает на селективность к G4 по сравнению с дуплексом/иМ. Лиганды **1.1.40**, **1.1.42** и **1.1.44** проявили высокое (до +20 °C), умеренное (до +9 °C) и слабое (до +5 °C) стабилизирующее действие на G4 соответственно. Лиганд **1.1.44** стабилизировал только параллельные или гибридные структуры, в то время как лиганд **1.1.40** не проявлял явного предпочтения к той или иной топологии G4, и его эффект снижался с увеличением стабильности исходной структуры ( $T_{пл}$  BclT, Q1, Ct1 < c-Kit, 22CTA, 22AG < c-Myc;  $\Delta T_{пл}^{1.1.40}$  BclT, Q1, Ct1, c-Kit > 22CTA, 22AG > c-Myc).

Отрицательная корреляция между  $T_{пл}$  и  $\Delta T_{пл}$  может указывать на общую тенденцию во взаимодействиях G4-лиганда (наименее стабильные структуры потенциально являются наиболее чувствительными к стабилизации). Однако стандартный анализ требует набора топологически различных структур с сопоставимой исходной стабильностью [433]. c-Myc был очевидным исключением в нашем случае, поскольку другие G4 имели значения  $T_{пл}$  в диапазоне 42–56 °C. Таким образом, мы скорректировали буферные условия для c-Myc, сместив его  $T_{пл}$  с 81 до 46 °C. В скорректированных условиях лиганд-индуцированная стабилизация c-Myc составила +18 °C и +9 °C для лигандов **1.1.40** и **1.1.44** соответственно.

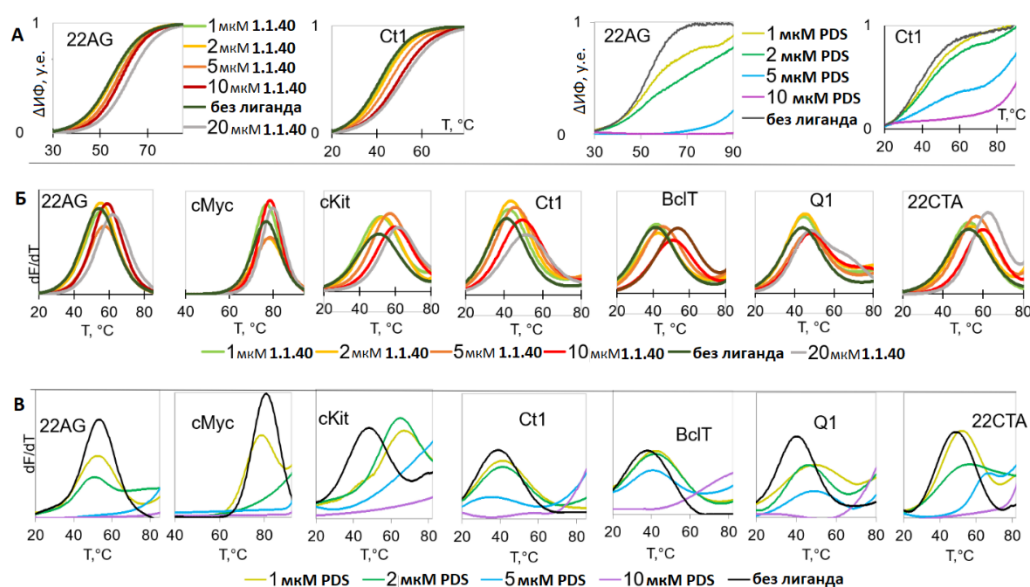
Чтобы оценить селективность лигандов **1.1.40** и **1.1.44** к G4 по сравнению с дуплексом, мы повторили эксперименты по FRET-плавлению в присутствии немеченого ОДН Na1g (20 эквивалентов на 1 эквивалент меченого G4). Шпилька не мешает сворачиванию G4 в отсутствие лиганда (начальная стабильность остается неизменной). Эффекты лигандов на G4 в присутствии конкурента-шпильки (**Рисунок 2.2.5**) также в основном аналогичны эффектам, наблюдаемым без шпильки (**Рисунок 2.2.4** и **Таблица 2.2.2**). Единственным исключением является Q1. Выраженное стабилизирующее действие лиганда **1.1.40** на этот антипараллельный G4 (+20 ± 2 °C) почти теряется после добавления шпильки, что указывает на низкую селективность к а-G4 по сравнению с дуплексом.



**Рисунок 2.2.5.** Стабилизирующие эффекты лигандов и их селективность к G4 по сравнению с дцДНК. (А) Первые производные кривых плавления меченых G4 (0,5 мкМ), полученные в присутствии немеченой шпильки (соотношение шпилька:G4 20:1). G4+шпилька, черная; G4+шпилька и лиганд **1.1.40**, красная; G4 + шпилька и лиганд **1.1.44**, желтая. (Б) Лиганд-индуцированная стабилизация G4 в присутствии конкурента-шпильки.  $\Delta T_{пл} = T_{пл}^{G4+лиганд} - T_{пл}^{G4}$ . (В) Лиганд-индуцированная стабилизация G4 (1 мкМ) в отсутствие конкурента-шпильки: концентрационная зависимость. (Д) Кривые связывания лиганда с 22AG G4, полученные методом микромасштабного терморефа (МСТ).

Чтобы оценить рабочий диапазон концентрации лиганда **1.1.40** и приблизительно оценить его аффинность связывания с G4, мы выполнили серию титрований. Мы повторили анализы с FRET-плавлением G4 в отсутствие конкурента-шпильки и варьировали концентрацию лиганда **1.1.40** от 1 до 20 мкМ. Для сравнительного анализа параллельно с этим мы провели аналогичные эксперименты с PDS – известным G4-стабилизирующим лигандом [322]. Полученные кривые плавления представлены на **Рисунке 2.2.6А**, а стабилизирующие эффекты показаны на **Рисунке 2.2.5В**. Разница между лигандом **1.1.40** и контрольным лигандом очевидна. У первого наблюдается постепенное нарастание стабилизирующего эффекта с увеличением концентрации. У второго в большинстве

случаев наблюдается резкий переход от нулевого к выраженному стабилизирующему эффекту при низких микромолярных концентрациях. Эффекты были рассчитаны на основе наиболее отчетливых переходов, выявленных с помощью FRET-плавления. В случае PDS многие кривые были двухфазными/многофазными (характерные примеры приведены на **Рисунке 2.2.6А**, а первые производные кривых – на **Рисунке 2.2.6В**). Например, кривые, полученные в присутствии 1–2 мкМ PDS, предполагают наличие нескольких комплексов G4-PDS, для которых стабилизация варьировалась от незначительной до умеренной. Чтобы выяснить основу данных, полученных из FRET-плавления, мы проанализировали связывание G4-лиганд с использованием метода МСТ [434].



**Рисунок 2.2.6.** Кривые плавления меченых ОДН в присутствии лиганда 1.1.40 или PDS: анализ концентрационной зависимости. (А) Репрезентативные кривые плавления, полученные в присутствии 1-20 мкМ лиганда **1.1.40** (слева) и 1-10 мкМ PDS (справа). (Б) Первые производные кривых плавления, полученных с лигандом **1.1.40**. (В) Первые производные кривых плавления, полученных с PDS. Условия: 20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,4 и 10 мМ KCl. Концентрация ОДН: 1 мкМ.

В анализах FRET-плавления разница между лигандом **1.1.40** и PDS, вероятно, была наиболее очевидной в случае 22AG (**Рисунок 2.2.5В**). Поэтому мы выбрали этот G4 для анализов с помощью МСТ и получили его меченный 5'-HEX аналог. Затем мы титровали HEX-22AG PDS или новыми лигандами и использовали флуоресценцию HEX для отслеживания изменений в термофоретической подвижности. Полученные данные были аппроксимированы моделью Хилла для оценки констант диссоциации лиганд-G4 ( $K_D$ ) и оценки кооперативности связывания. Как видно из кривых связывания на основе МСТ, лиганд **1.1.40** обладает меньшей аффинностью к 22AG, чем PDS ( $K_D^{1.1.40} = 4,0 + 0,6$  мкМ

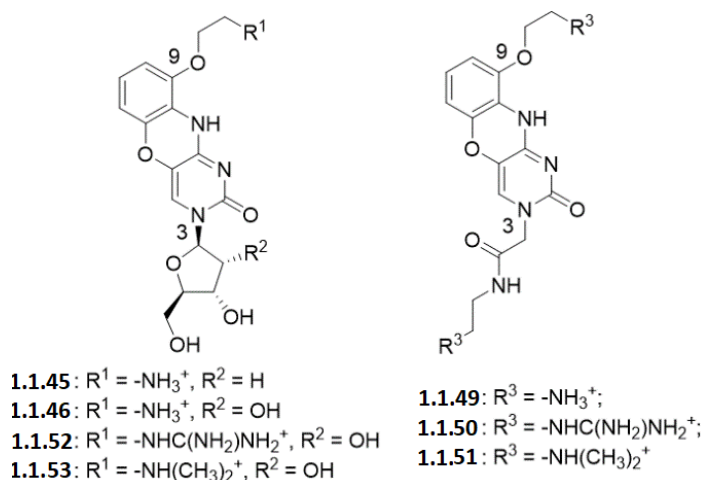
относительно  $K_D^{\text{PDS}} = 0,5 \pm 0,1$  мкМ). Полученное значение  $K_D^{\text{PDS}}$  соответствует литературным данным [435,436]. В соответствии с данными FRET-плавления (**Таблица 2.2.2**), лиганды **1.1.44** и **1.1.42** существенно уступают лиганду **1.1.40** ( $K_D^{1.1.44} \geq 50$  мкМ и  $K_D^{1.1.42} \geq 50$  мкМ). Значения коэффициента Хилла позволяют предположить множественное связывание лигандов (т.е. стехиометрия комплекса лиганд:G4, по меньшей мере, 2:1) как для лиганда **1.1.40**, так и для PDS. Важно отметить, что они также указывают на выраженную положительную кооперативность связывания PDS-G4 ( $n^{\text{PDS}} = 1,8 \pm 0,2$ ) в отличие от умеренной кооперативности связывания G4-лиганд **1.1.40** ( $n^{1.1.40} = 1,4 \pm 0,2$ ). Эти результаты качественно соответствуют приведенным выше данным FRET-плавления. Мы предполагаем, что при эквимольных концентрациях в низкомикромолярном диапазоне лиганд **1.1.40** и G4 могут образовывать комплексы 1:1, что приводит к умеренной стабилизации G4. Дальнейшая стабилизация при более высоких концентрациях лиганда **1.1.40** представляет собой совместное воздействие двух и более молекул лиганда на G4. PDS может работать аналогичным образом, но переход между несвязанным G4 и комплексом лиганд(ы):G4 происходит в довольно узком диапазоне концентраций.

Подводя итог, можно сказать, что лиганд **1.1.40**, производное 1,3-диаза-2-оксофеноксазина с двумя аминопропильными заместителями, расположенными под углом «180°» по отношению друг к другу (**Рисунок 2.2.2**), повышает термическую стабильность параллельных и гибридных G4 в присутствии дцДНК. Благодаря своей высокой эффективности и селективности к п-G4 по сравнению с дуплексом, лиганд **1.1.40** потенциально применим для направленного воздействия на биологически значимые G4 в геномном контексте. Лиганд **1.1.44**, производное 1,3-диаза-2-оксофеноксазина с двумя аминоалкильными заместителями, расположенными под углом «90°» по отношению друг к другу, существенно уступает лиганду **1.1.40**, а лиганд **1.1.42** с одним аминопропильным заместителем практически неэффективен с точки зрения стабилизации G4.

Поскольку лидерное соединение **1.1.40** обладало субоптимальными G4-стабилизирующими свойствами и уступало стандартному G4 стабилизатору PDS, мы решили провести дополнительную оптимизацию, изменить положение и структуру феноксазиновых заместителей (ввести дополнительные доноры и акцепторы водородных связей) и исследовать полученный набор производных на G4-связывающие свойства и цитотоксическую активность в отношении условно нормальных и опухолевых клеток. Набор соединений включал G-clamp 2'-дезоксирибонуклеозид **1.1.45** и рибонуклеозид **1.1.46**, а также аналог G-clamp **1.1.49** без остатка (2'-дезоксирибозы, но с дополнительным 2-((2-аминоэтил)амино)-2-оксоэтильным заместителем. Кроме того, производные **1.1.46** и

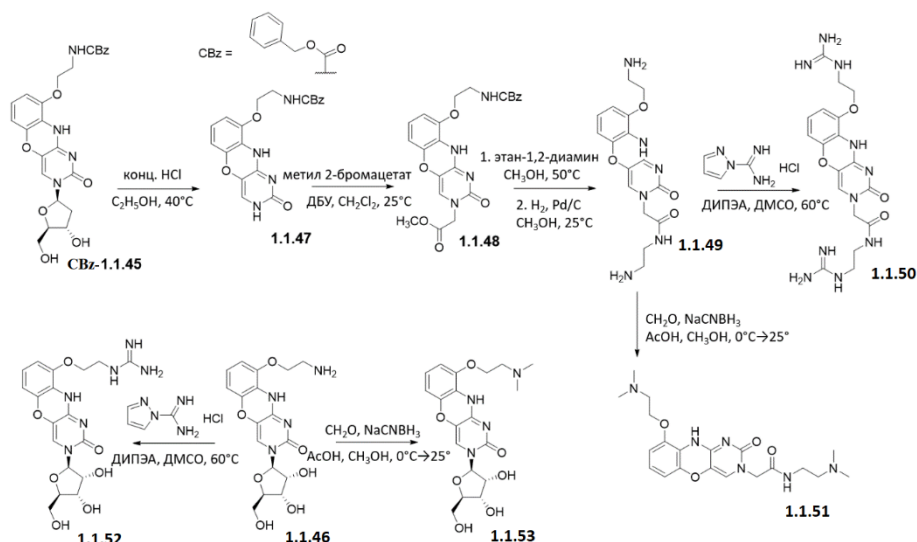


**1.1.49** были *N*-гуанидинилированы или *N*-диметилированы с образованием рибонуклеозидных аналогов **1.1.52** и **1.1.53** и ненуклеозидных аналогов **1.1.50** и **1.1.51** соответственно (**Рисунок 2.2.7**).



**Рисунок 2.2.7.** Структуры известных дуплекс-стабилизирующих G-clamp-нуклеозидных производных **1.1.45** и **1.1.46**, а также новых G4-стабилизирующих нуклеозидных производных **1.1.52** и **1.1.53** и ненуклеозидных производных **1.1.49-1.1.51**.

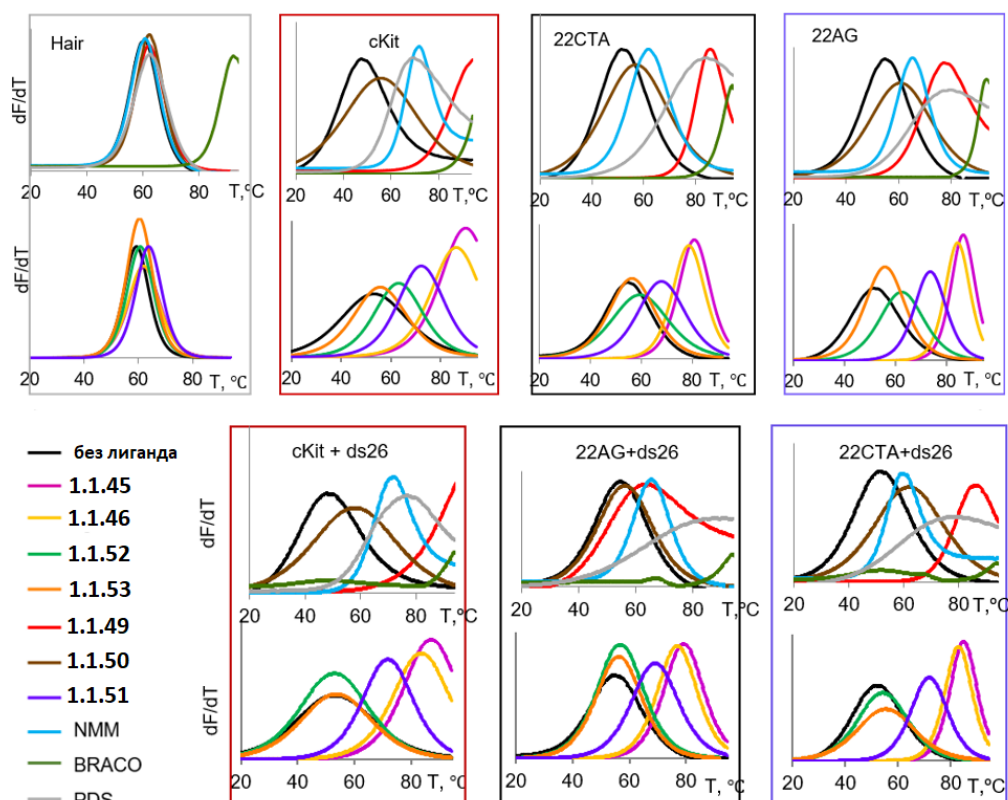
Лиганд на основе G-clamp **1.1.49** был получен из G-clamp 2'-дезоксирибонуклеозидного производного **1.1.45** [13] в 4 стадии (**Схема 2.2.2**). Сначала *N*-гликозидную связь G-clamp 2'-дезоксирибонуклеозидного производного **1.1.45** расщепляли обработкой концентрированной HCl в водном C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH с получением соединения **1.1.47**. Затем проводили селективное алкилирование *N*3 атома 1,3-диаза-2-оксофеноксазинового кольца обработкой ДБУ с последующим добавлением метил 2-бромацетата в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Последующее замещение метокси-группы эфира **1.1.48** на этан-1,2-диамин и удаление Cbz защиты каталитическим гидрированием приводило к получению целевого лиганда **1.1.49**. Для превращения аминогрупп в гуанидиновые группы использовали стандартный гуанидинилирующий агент - гидрохлорид 1H-пиразол-1-карбоксамида [437,438], получая лиганд **1.1.50**. Производное **1.1.51** было получено из аминосодержащего лиганда **1.1.49** его восстановительным метилированием [439]. Производные **1.1.52** и **1.1.53** были получены так же, как **1.1.50** и **1.1.51** соответственно. Производные, которые использовались в качестве предполагаемых G4-лигандов, очищали с помощью препаративной ВЭЖХ, и их чистота составляла >91%.



**Схема 2.2.2.** Синтез новых нуклеозидных и ненуклеозидных производных 1,3-диаза-2-оксофеноксазина.

Мы оценили G4-стабилизирующее действие нуклеозидных производных **1.145**, **1.146**, **1.152** и **1.153** и ненуклеозидных лигандов **1.149-1.151** на известные структуры G4 с-Kit, 22AG и 22СТА (Таблица 2.2.1). Чтобы оценить термическую стабильность G4 в присутствии и в отсутствии лигандов, мы получили ОДН, меченные FAM/BNQ, и провели тесты с FRET-плавлением [433]. Образующий шпильку ОДН Naig использовали в качестве отрицательного контроля. Вторичные структуры меченых ОДН в рабочем буфере, содержащем 10 mM K<sup>+</sup>, были подтверждены методом КД-спектроскопии (Рисунок 2.2.3).

Кривые плавления комплексов G4 и G4-лигандов показаны на Рисунке 2.2.8. Феноксазиновые производные повышали термическую стабильность всех трех G4 и незначительно влияли на контрольную шпильку (Таблица 2.2.3). Единственным исключением был лиганд **1.151**, который вызывал умеренную стабилизацию контрольной шпильки (Рисунок 2.2.8). G4-стабилизирующие эффекты **1.150-1.153** были слабее или сравнимы с эффектами известных G4-специфичных лигандов: PDS [322] и *N*-метилмезопорфирина IX (NMM) [440], а эффекты **1.145**, **1.146** и **1.149** превышали эффекты NMM и PDS. Известный лиганд BRACO-19 [441] превосходил производные феноксазина по способности стабилизировать G4, но столь же эффективно стабилизировал контрольную шпильку. Этот результат согласуется с ранее описанной низкой селективностью BRACO-19 в отношении G4 по сравнению с дуплексной ДНК [442], что является очевидным недостатком и ограничивает терапевтическое применение данного лиганда.



**Рисунок 2.2.8.** Кривые FRET-плавления (первые производные) ОДН, меченных FAM/BNQ, или их смесей с лигандами. ОДН использовали в концентрации 0,5 мкМ, и лиганды добавляли до конечной концентрации 10 мкМ. Эксперименты проводили в рабочем буфере, полученном в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 10 мМ KCl в отсутствие (верхняя панель) и в присутствии немеченого конкурента ds26 (10 мкМ).

**Таблица 2.2.3.** Влияние лигандов на термическую стабильность G4.

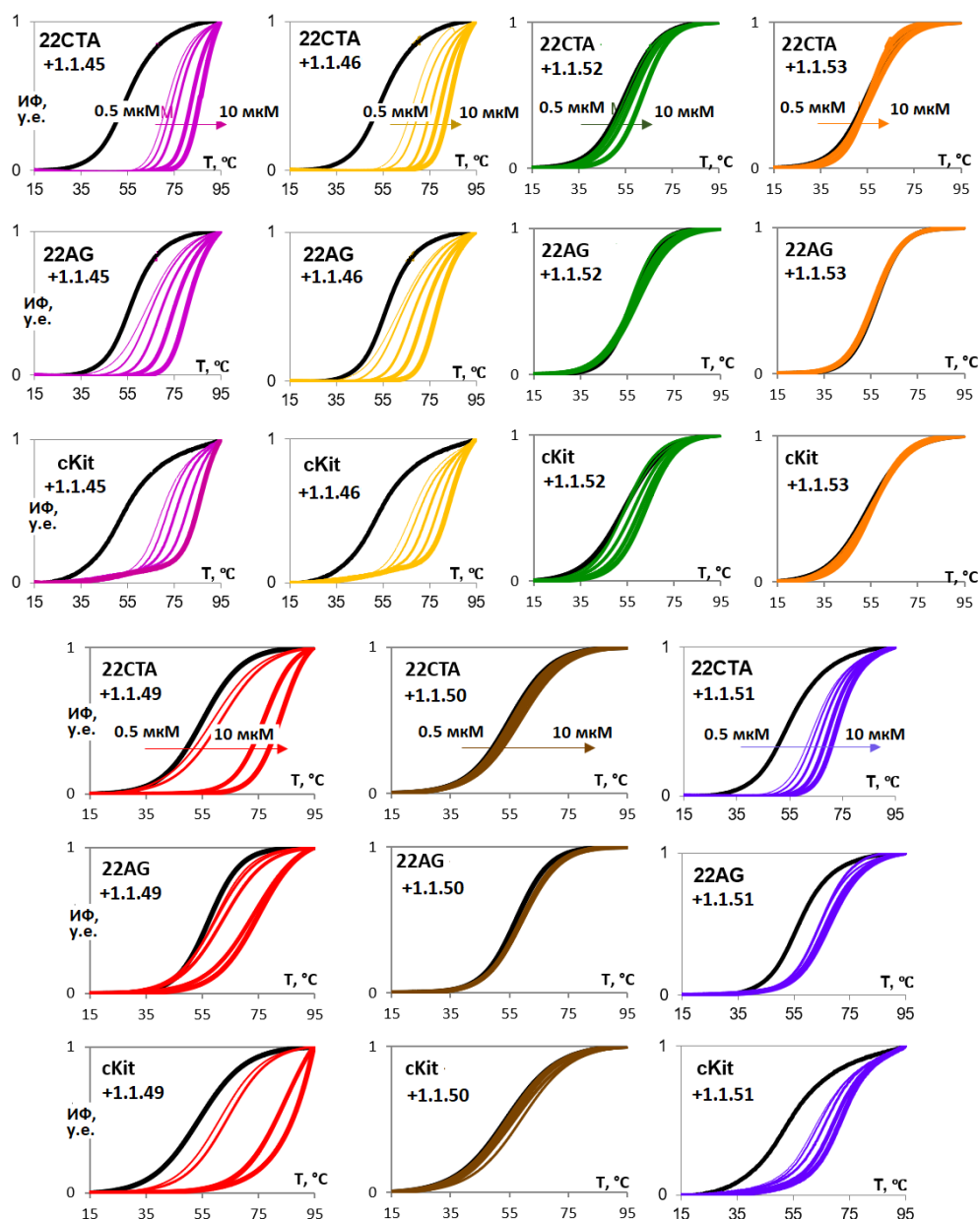
| шифр                    | $T_{пл},$<br>$^{\circ}\text{C} \pm 1$ | $\Delta T_{пл}, ^{\circ}\text{C} \pm 2 (T_{пл}^{лиганд} - T_{пл}^{без лиганда})$ |        |        |        |        |        |        |     |           |                 |
|-------------------------|---------------------------------------|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----------|-----------------|
|                         |                                       | 1.1.45   | 1.1.46 | 1.1.52 | 1.1.53 | 1.1.49 | 1.1.50 | 1.1.51 | NMM | PDS       | BRACO-19        |
| c-Kit                   | 54                                    | 37   | 33     | 9      | 2      | >41    | 4      | 19     | 23  | 22        | $\geq 41$       |
| c-Kit+ds26 <sup>a</sup> | 54                                    | 34   | 30     | 2      | 5      | >41    | 4      | 19     | 23  | 26        | 0; >41**        |
| 22AG                    | 57                                    | 24   | 22     | 2      | -1     | 18     | 5      | 11     | 10  | 24        | $\geq 38$       |
| 22AG+ds26 <sup>a</sup>  | 57                                    | 22   | 20     | 1      | 1      | 8      | 1      | 12     | 11  | $\geq 24$ | 10; $\geq 38^b$ |
| 22CTA                   | 55                                    | 31   | 29     | 7      | 1      | 28     | 5      | 18     | 11  | 20        | $\geq 40$       |
| 22CTA+ds26 <sup>a</sup> | 55                                    | 29   | 27     | 2      | 3      | 30     | 5      | 16     | 10  | 18        | 0; $\geq 40^b$  |
| Hair                    | 61                                    | 3  | 3      | 0      | 0      | 0      | 0      | 5      | 0   | 0         | $\geq 31$       |

<sup>a</sup>Концентрация G4/Hair составляла 0,5 мкМ. Лиганды и ds26 использовали в концентрации 10 мкМ.

<sup>b</sup>Два значения относятся к двум переходам G4, которые были видны на кривых плавления: незначительный, но обнаруживаемый переход при более низкой температуре и переход при более высокой температуре (частично выше 95 °C).

Чтобы оценить селективность производных феноксазина, мы повторили эксперименты по FRET-плавлению в присутствии избытка термостабильной немеченой шпильки ds26 (**Рисунок 2.2.8**). В случае контрольного лиганда PDS мы наблюдали уширенные кривые G4, что может быть связано с некооперативными процессами и предполагает повышенный конформационный полиморфизм (**Рисунок 2.2.8**). Как и ожидалось для BRACO-19, добавление шпильки дало кривые плавления с двумя переходами. Кривые плавления **1.1.45**, **1.1.46**, **1.1.53** и **1.1.51** были аналогичны кривым, полученным в отсутствие шпильки (**Рисунок 2.2.8**), лиганд **1.1.49** частично утратил стабилизирующее действие на 22AG, а лиганд **1.1.52** не оказывал воздействия на c-Kit и 22CTA, что указывает на ограниченную селективность.

Чтобы исследовать концентрационную зависимость стабилизирующих эффектов и оценить сродство связывания, мы варьировали концентрации лигандов в экспериментах по FRET-плавлению. Титрование показано на **Рисунке 2.2.9**. Стабилизация была умеренной при концентрации лиганда 0,5 мкМ и постепенно увеличивалась с увеличением соотношения лиганд:G4, что указывает на возможность множественного связывания лигандов и значений  $K_D$  в диапазоне от высоких наномолярных до низких микромолярных (**Рисунок 2.2.10**).

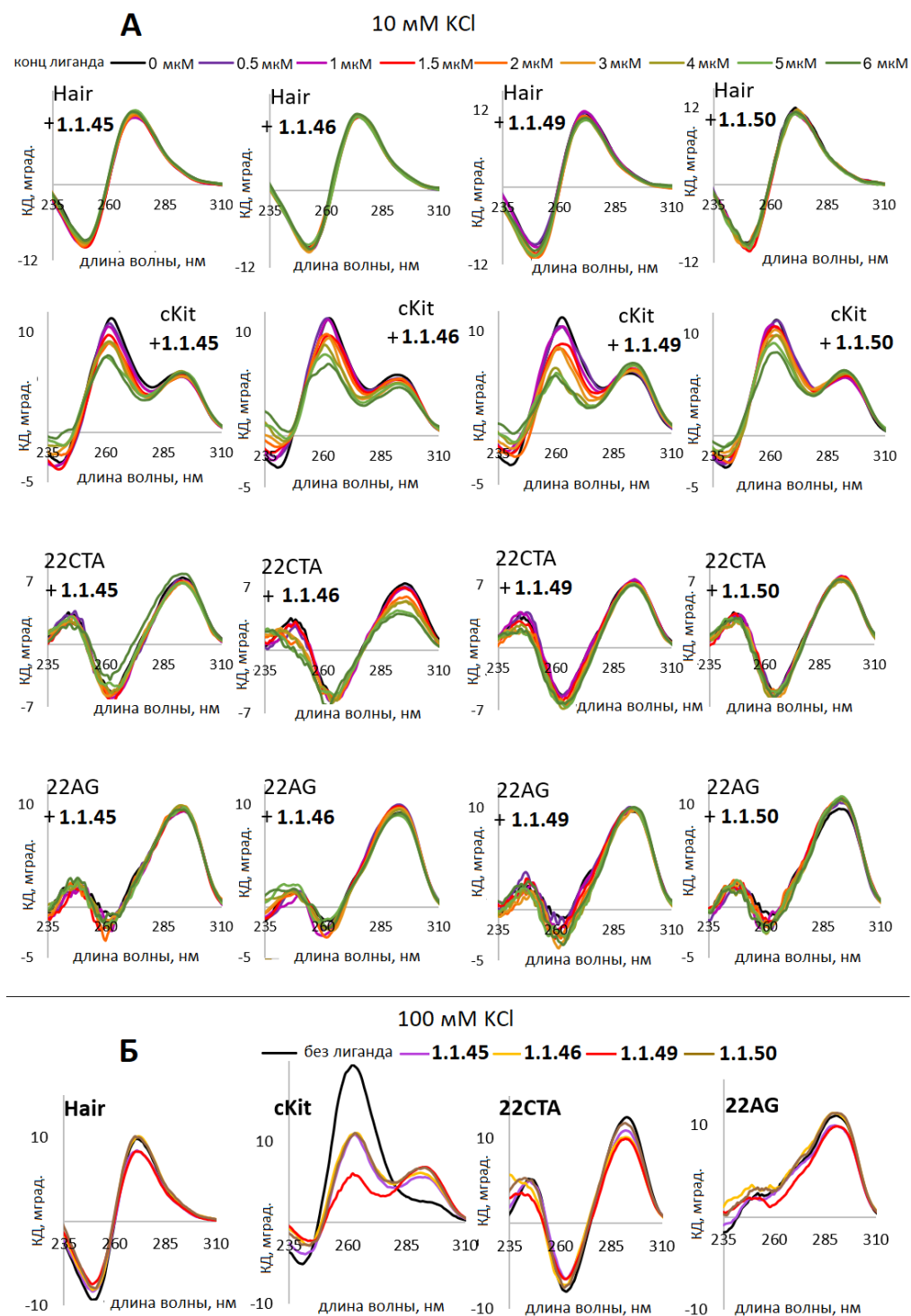


**Рисунок 2.2.9.** Концентрационная зависимость стабилизации G4, вызванной лигандом: кривые плавления. Кривые FRET-плавления ОДН (0,5 мкМ), полученные в присутствии лигандов (0,5, 1,0, 2,5, 5,0 или 10 мкМ) в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 10 мМ KCl.

|        |       | 0.5 мкМ | 1 мкМ | 2.5 мкМ | 5 мкМ | 10 мкМ |
|--------|-------|---------|-------|---------|-------|--------|
|        | 22AG  | 7       | 9     | 14      | 19    | 24     |
| 1.145  | 22CTA | 17      | 19    | 22      | 28    | 31     |
|        | cKit  | 17      | 19    | 23      | 29    | 36     |
|        | 22AG  | 6       | 8     | 12      | 17    | 22     |
| 1.1.46 | 22CTA | 13      | 17    | 21      | 25    | 29     |
|        | cKit  | 14      | 17    | 21      | 25    | 32     |
|        | 22AG  | -1      | -1    | 0       | 0     | 2      |
| 1.1.52 | 22CTA | 0       | 2     | 2       | 4     | 7      |
|        | cKit  | 1       | 0     | 4       | 7     | 9      |
|        | 22AG  | 0       | 0     | 0       | 0     | -1     |
| 1.1.53 | 22CTA | 0       | 0     | 2       | 2     | 1      |
|        | cKit  | 0       | 1     | 1       | 2     | 2      |
|        | 22AG  | 2       | 3     | 5       | 16    | 18     |
| 1.1.49 | 22CTA | 4       | 7     | 22      | 22    | 28     |
|        | cKit  | 8       | 10    | 31      | 31    | > 41   |
|        | 22AG  | 2       | 2     | 2       | 2     | 2      |
| 1.1.50 | 22CTA | 2       | 3     | 4       | 2     | 1      |
|        | cKit  | 1       | 5     | 3       | 2     | 1      |
|        | 22AG  | 7       | 8     | 8       | 10    | 11     |
| 1.1.51 | 22CTA | 10      | 11    | 13      | 16    | 18     |
|        | cKit  | 11      | 12    | 14      | 17    | 19     |

**Рисунок 2.2.10.** Концентрационная зависимость стабилизации G4, вызванной лигандом: тепловые карты. Вызванную лигандом стабилизацию  $\Delta T_{пл} \pm 2$  (°C) рассчитывали на основе кривых плавления как разницу между значениями  $T_{пл}$  в присутствии и в отсутствие лигандов.

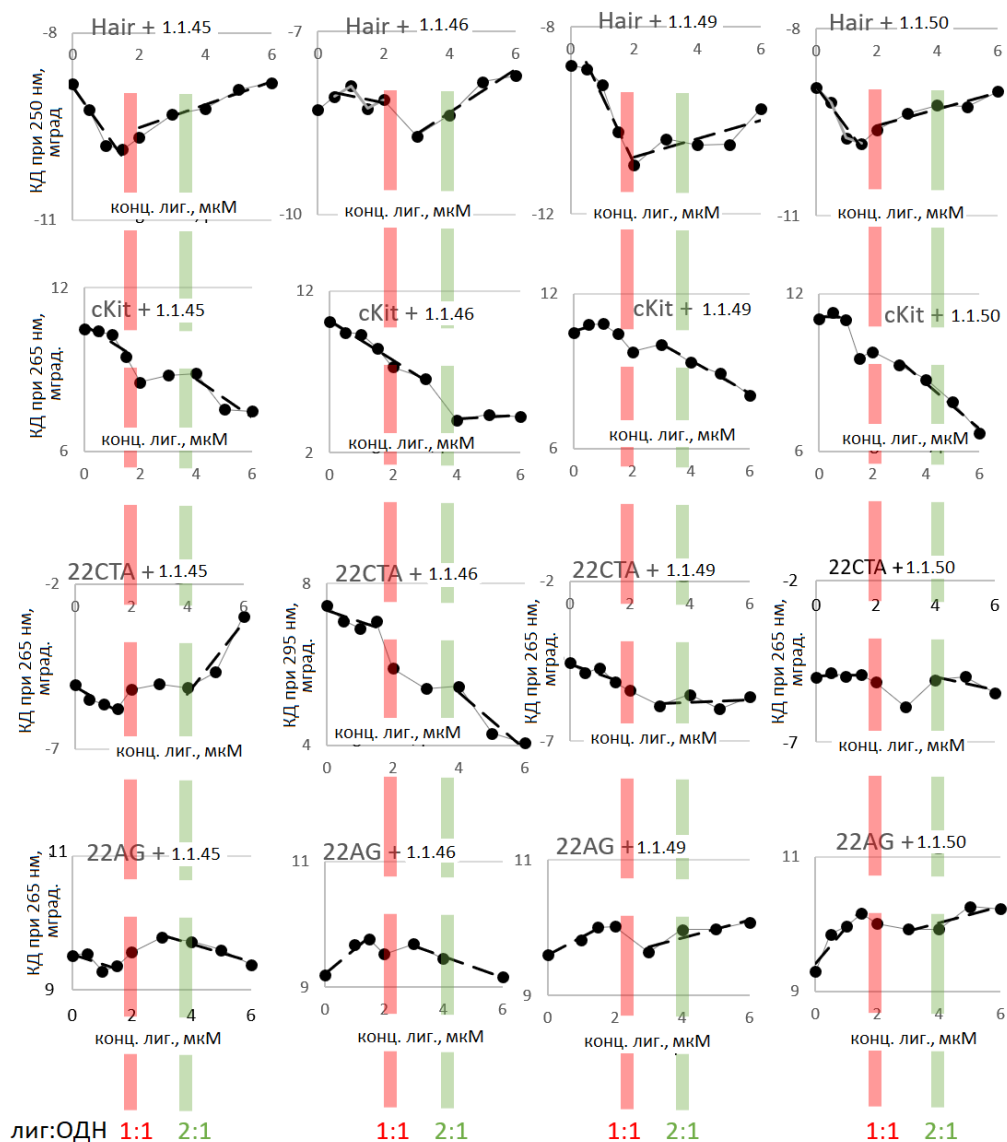
Для дальнейшей проверки аффинности связывания и стабилизации, индуцированной лигандами, мы выбрали независимые методы без использования меток: КД-анализы и анализы с вытеснением флуоресцентного интеркалятора (ВФИ) с немечеными ОДН. Сначала мы анализировали немеченые ОДН в тех же условиях, что и их FAM/BNQ-аналоги, т.е. в 10 мМ  $K^+$ -содержащем буфере. Интересно, что КД-спектры немеченых ОДН (**Рисунок 2.2.11А**) отличались от полученных ранее при концентрациях  $K^+$ , близких к физиологическим [54,58,85] или показанных на **Рисунке 2.2.3**. Вклад сигнатуры, соответствующей параллельному G4, с положительной полосой КД при 265 нм и отрицательной полосой при 240 нм уменьшен в спектрах немеченых G4 по сравнению с мечеными, а доля сигнатуры, соответствующей антипараллельному G4, с положительной полосой при 295 нм и отрицательной полосой при 265 нм увеличена.



**Рисунок 2.2.11.** КД-спектры немеченых ОДН и их комплексов с лигандами. Концентрация ОДН: 2 мкМ. Буфер: 20 мМ фосфат натрия (рН 7,4) и 10 мМ КСl (А) или 100 мМ КСl (Б).

Лиганды оказали незначительное, но заметное влияние на КД-амплитуды в специфичных для G4 максимумах. В большинстве случаев они вызывали небольшое снижение КД-амплитуды, что можно объяснить незначительным нарушением укладки остатков гуанина. Аналогичные, но едва заметные вызванные лигандом изменения наблюдались в спектре шпильки. Поскольку КД-измерения требуют относительно высоких

концентраций ОДН, мы не смогли воспроизвести условия FRET-плавления (большое соотношение лиганд:G4) в этих анализах. Таким образом, результаты (**Рисунок 2.2.11А** и **Рисунок 2.2.12**) нельзя сравнивать напрямую с данными FRET-плавления (**Рисунок 2.2.10**). В большинстве случаев мы наблюдали псевдолинейную зависимость КД-изменений от концентрации лигандов с двумя точками перегиба при соотношениях лиганд:G4 1:1 и 2:1 (**Рисунок 2.2.12**), что указывает на возможность существования двух или более сайтов связывания лигандов.



**Рисунок 2.2.12.** КД-изменения, индуцированные лигандами: концентрационная зависимость. Концентрация ОДН: 2 мкМ. Буфер: 20 мМ фосфат натрия (рН 7,4) и 10 мМ KCl.

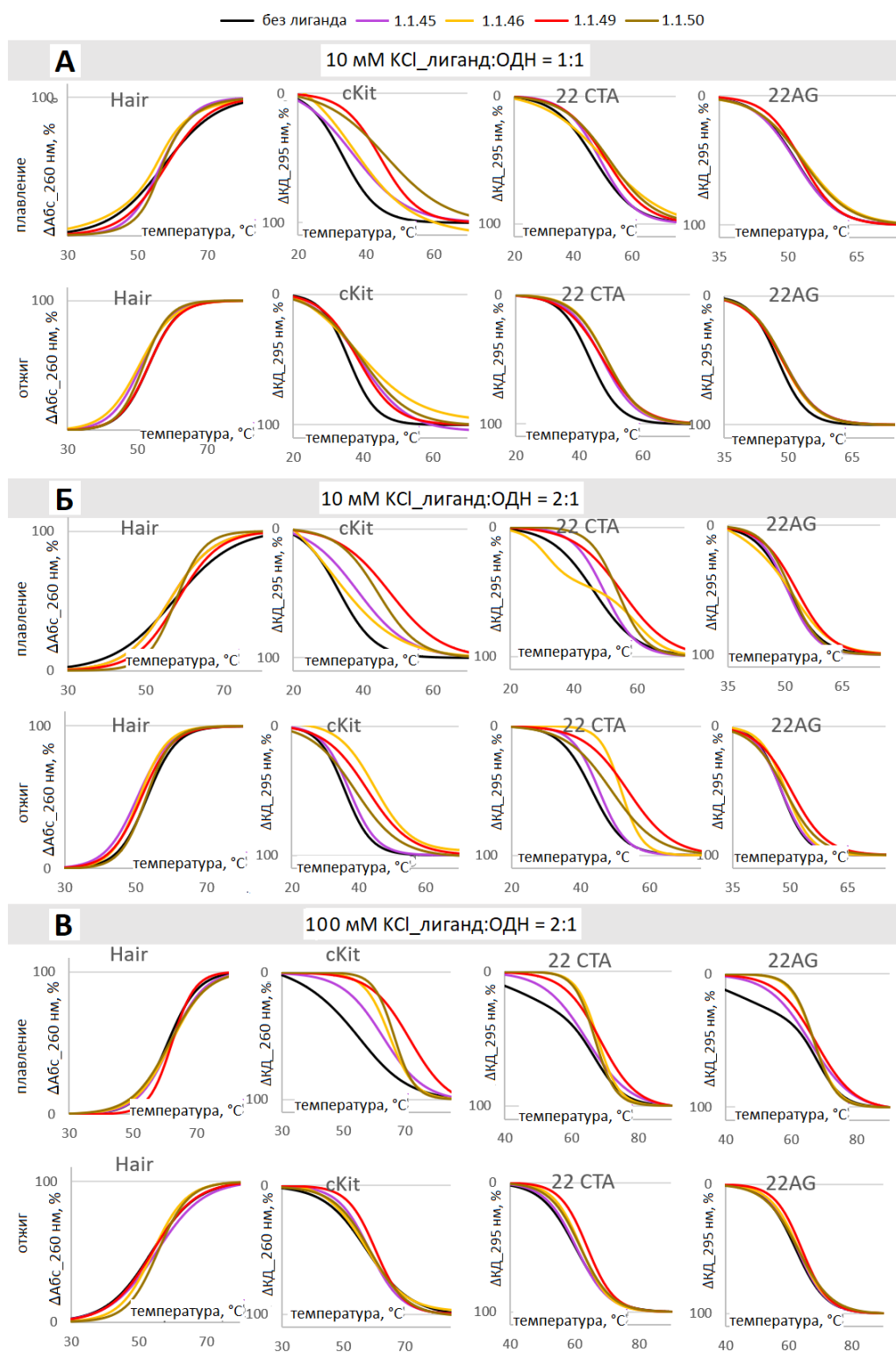
Затем мы увеличили концентрацию  $K^+$  до 100 мМ и повторили КД-измерения. Полученные спектры немеченых ОДН G4 (**Рисунок 2.2.11Б**) были аналогичны спектрам их



аналогов, меченных FAM/BNQ (**Рисунок 2.2.3**), в плане соотношения сигнатур параллельного и антипараллельного G4. Таким образом, метки и дополнительные ионы калия, по-видимому, действуют аналогично. Оба вызвали частичную перегруппировку антипараллельного 22СТА G4 в гибридную форму; сместили равновесие между гибридными/преимущественно антипараллельными формами 22AG в сторону классической гибридной формы и индуцировали перегруппировку с-Kit из смеси гибридного и параллельного G4 в чистую параллельную форму.

В присутствии 100 мМ  $K^+$  не наблюдали никаких КД-изменений 22СТА и 22AG, индуцированных лигандами, в то время как с-Kit показал умеренное индуцированное лигандом уменьшение КД-полосы, специфической для параллельного G4 (**Рисунок 2.2.11Б**). Мы пришли к выводу, что лиганды вызывают незначительные изменения топологии G4, за исключением параллельного с-Kit, который показал снижение эффективности стэкинга гуанинов в присутствии лиганда **1.1.49** и, в меньшей степени, лигандов **1.1.45**, **1.1.46** и **1.1.50** (**Рисунок 2.2.11Б**).

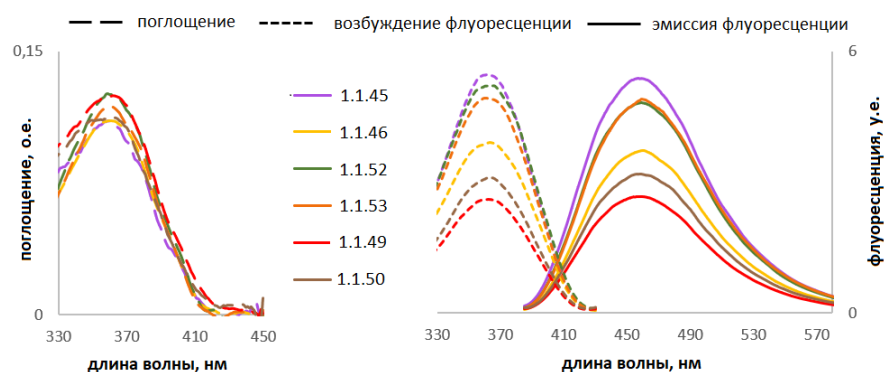
Чтобы дополнить данные по FRET-плавлению, мы провели эксперименты по КД-плавлению в буферах, содержащих как 10 мМ  $K^+$ , так и 100 мМ  $K^+$  (**Рисунок 2.2.13**). В отсутствие лигандов значения  $T_{пл}$  немеченых G4 в 100 мМ  $K^+$ -буфере были значительно выше, чем в 10-мМ  $K^+$ -буфере, и сравнимы со значениями  $T_{пл}$  меченых G4 в 10-мМ  $K^+$ -буфере. Это дополнительно подтверждает, что буфер и схема маркировки были выбраны правильно, и подтверждает достоверность данных FRET-плавления. КД-плавление выявило индуцированную лигандами стабилизацию всех G4 и отсутствие стабилизации шпильки. В соответствии с данными FRET-плавления, воздействие на G4 зависело от концентрации и имело тенденцию к снижению в следующем порядке с-Kit>22СТА>22AG. Среди всех перспективных производных феноксазина **1.1.45**, **1.1.46**, **1.1.49** и **1.1.50**, лиганд **1.1.49** в большинстве случаев лидировал. Мы пришли к выводу, что данные КД-плавления качественно согласуются с результатами FRET-плавления.



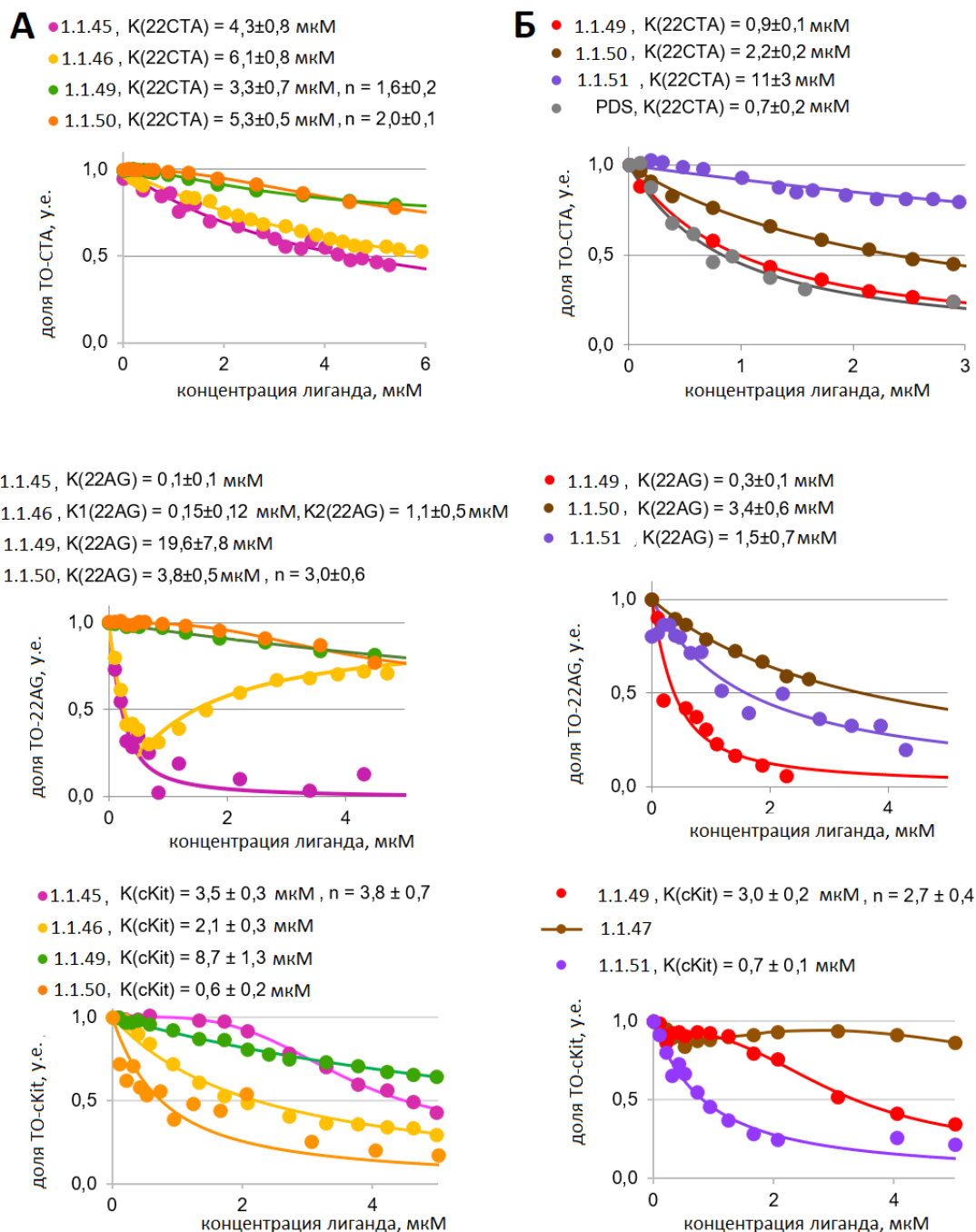
**Рисунок 2.2.13.** Кривые КД-плавления немеченых ОДН и их комплексов с лигандами. Концентрация ОДН: 2 мкМ. Буфер: 20 мМ фосфат натрия (рН 7,4) и 10 мМ КСl (А, Б) или 100 мМ КСl (В). Концентрация лиганда: 2 мкМ (А) или 4 мкМ (Б и В).

Наконец, чтобы проверить аффинность связывания, мы провели анализ с вытеснением флуоресцентного интеркалятора (ВФИ). Интеркалятор, тиазоловый оранжевый (ТО), вытеснялся из комплексов с немечеными теломерными G4 мишенями

лигандами на основе 1,3-диаза-2-оксофеноксазина, и его ИФ уменьшалась. Феноксазины слабо флуоресцируют при длине волны около 460 нм при возбуждении при 360 нм (**Рисунок 2.2.14**), и поэтому они не мешали измерениям флуоресценции ТО. Константы вытеснения, полученные из кривых ВФИ (**Рисунок 2.2.15**), качественно согласовывались с результатами FRET-титрования (**Рисунке 2.2.10**). Лиганд **1.1.46** проявил себя как эффективный конкурент ТО при низких концентрациях, но в анализе с 22AG дальнейшее титрование вызывало эффект свечения, указывая на повторное связывание ТО из-за аллостерических эффектов или образования тройного комплекса. Аналогичный артефакт наблюдали для лиганда **1.1.50** в эксперименте с с-Kit. В экспериментах с 22AG и 22СТА лиганды **1.1.45** и **1.1.49** или **1.1.49** и **1.1.50** соответственно были наиболее эффективными конкурентами ТО, тогда как для мишени с-Kit лидерами оказались лиганды **1.1.51** и **1.1.53**, аффинность связывания которых с G4 находилась в диапазоне от высокой наномолярной до низкой микромолярной.



**Рисунок 2.2.14.** Спектры поглощения и флуоресценции лигандов. Спектры лигандов (10 мкМ) получали в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 10 мМ KCl. Спектры эмиссии флуоресценции регистрировали при возбуждении в максимуме поглощения (360 нм). Спектры возбуждения флуоресценции регистрировали при максимуме излучения (460 нм).



**Рисунок 2.2.15.** Анализ с вытеснением флуоресцентного интеркалятора. Конечные концентрации: 0,25 мкМ G4 и 0,5 мкМ TO. Буфер: 20 мМ фосфат натрия, pH 7,4, 10 мМ KCl.

Таким образом, можно сказать, что эффективное связывание G4 и наибольшая стабилизация G4 продемонстрированы для феноксазиновых лигандов **1.1.45**, **1.1.46** и **1.1.49** с одной или двумя аминоалкильными группами. Снижение эффекта **1.1.52** и **1.1.50** по сравнению с аминоксодержащими лигандами **1.1.46** и **1.1.49** соответственно - достаточно неожиданно. Заряженные гуанидиновые остатки склонны к взаимодействию с основной цепью ДНК независимо от вторичной структуры ОДН. Поэтому мы ожидали, что

гуанидиногруппа повысит стабильность, но с потерей селективности. Однако ее влияние на стабилизирующие свойства лиганда было фактически отрицательным (средняя стабилизация G4 с-Kit, 22AG и 22CTA составила  $6\pm 2^\circ\text{C}$  и  $5\pm 2^\circ\text{C}$  для гуанидино-содержащих лигандов **1.1.52** и **1.1.50**,  $28\pm 2^\circ\text{C}$  и  $29\pm 2^\circ\text{C}$  для аминокислотосодержащих лигандов **1.1.46** и **1.1.49**). Вероятным объяснением могут быть стерические затруднения, возникающие при позиционировании лиганда с объемной гуанидиногруппой вблизи петли G4.

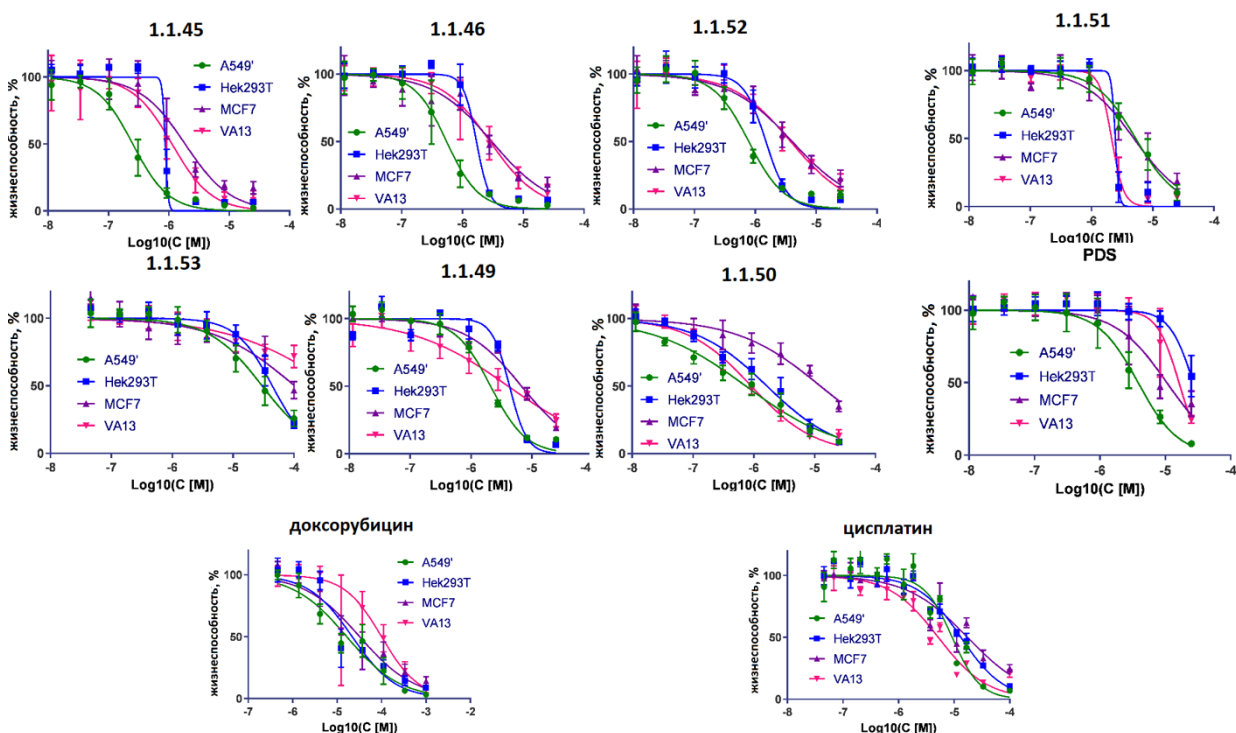
Чтобы оценить противораковый потенциал исследуемых феноксазиновых производных, мы протестировали их цитотоксичность *in vitro* в отношении четырех клеточных линий, а именно A549' (сублиния клеток аденокарциномы легких с быстрой скоростью роста), MCF7 (линия клеток рака молочной железы), НЕК293Т (линия клеток эмбриональной почки человека, неракового происхождения, но демонстрирующая быструю скорость роста и канцерогенный потенциал) и VA13 (линия клеток, происходящая из нормальных фибробластов легких и имеющая медленную скорость роста). МТТ анализ после 72-часовой инкубации клеток с феноксазиновыми производными выявил дозозависимое ингибирование жизнеспособности клеток (**Рисунок 2.2.16**). Все соединения, за исключением обычно неактивного **1.1.53**, были умеренно токсичными для нераковых клеток. Поскольку активность соединений предположительно обусловлена взаимодействием с ДНК, их сравнивали с известными агентами, воздействующими на ДНК: агентом прямого повреждения ДНК цисплатином, ингибитором топоизомеразы доксорубицином и функционально близким G4-лигандом PDS. Характер цитотоксичности соединений **1.1.45-1.1.53** отличался от такового для цисплатина и доксорубицина. Производные **1.1.45-1.1.53** уступали доксорубину по цитотоксичности и селективности в отношении клеток MCF7, но обладали более высокой селективностью в отношении клеток A459' по сравнению с НЕК293Т. Соединение **1.1.46** показало наиболее заметный эффект с индексами селективности (ИС) (VA13/A549') 6,1, что близко к ИС препарата доксорубин, и ИС (НЕК293Т/A549') 3,7), превышающий значение для доксорубина (**Таблица 2.2.4**).

**Таблица 2.2.4.** Антипролиферативное действие тестируемых соединений в отношении клеточных линий VA13, HEK293T, A549' и MCF7.

| Соединение    | CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> , мкМ |           |           |          | ИС <sup>b</sup> | ИС <sup>b</sup> |
|---------------|-------------------------------------|-----------|-----------|----------|-----------------|-----------------|
|               | VA13                                | HEK293T   | A549'     | MCF7     | VA13 / A549'    | HEK293T / A549' |
| <b>1.1.45</b> | 1,4±0,4                             | 0,8±0,1   | 0,3±0,1   | 1,8±0,6  | 4,9±0,5         | 3,1±1,4         |
| <b>1.1.46</b> | 2,9±1,7                             | 1,8±0,4   | 0,5±0,3   | 2,8±0,8  | 6,1±3,2         | 3,7±1,4         |
| <b>1.1.52</b> | 4±0,9                               | 1,5±0,3   | 0,8±0,1   | 4,3±1,2  | 4,9±0,6         | 2±0,6           |
| <b>1.1.53</b> | >100                                | 44,8±6,6  | 31±11     | 119±47   | >3              | 1,7±0,8         |
| <b>1.1.49</b> | 5,8±1,6                             | 4,1±0,6   | 2,4±0,3   | 8,8±2    | 2,4±0,4         | 1,7±0,3         |
| <b>1.1.50</b> | 2,1±1,2                             | 1,8±0,5   | 0,8±0,3   | 12,4±0,3 | 3,9±3,1         | 2,9±1,7         |
| <b>1.1.51</b> | 1,7±0,5                             | 3,2±1,1   | 5,6±1,8   | 5,5±2,7  | 0,3±0,1         | 0,6±0,2         |
| PDS           | 7,9±4,5                             | 26,3±5,3  | 3,8±1,7   | 10,4±0   | 2±0,3           | 7,1±3,6         |
| доксорубин    | 0,14±0,04                           | 0,02±0,01 | 0,03±0,02 | 0,9±0,07 | 6,7±3,4         | 1±0,8           |
| цисплатин     | 4,4±2,4                             | 10,4±5,2  | 6,2±2,5   | 15,5±9,6 | 0,7±0,3         | 1,7±0,8         |

<sup>a</sup> 50% цитотоксическая концентрация (CC<sub>50</sub>) представляет собой концентрацию, которая снижает жизнеспособность клеток на 50% по сравнению с необработанным контролем.

<sup>b</sup> Индекс селективности (ИС) представляет собой соотношение CC<sub>50</sub> для нераковых клеточных линий VA13 или HEK293T к CC<sub>50</sub> для раковой клеточной линии A549'.



**Рисунок 2.2.16.** Зависимость цитотоксичности соединений от дозы для клеточных линий A549', HEK293T, MCF7 и VA13.

По данным МТТ-анализа, соединения **1.1.45** и **1.1.46** оказались наиболее цитотоксичными в нуклеозидном ряду, что согласуется с их наибольшим G4-

стабилизирующим действием, селективностью по сравнению с дуплексом и средним сродством к G4. Среди ненуклеозидных производных лиганд **1.1.49** продемонстрировал самый высокий G4-стабилизирующий эффект и был хорошим конкурентом ТО, но потерял селективность по сравнению с дуплексом в случае 22AG G4. Однако в серии соединений он ничем не выделялся. Соединения **1.1.50** и **1.1.51** проявили наибольшую токсичность в отношении клеток A549' и MCF7 соответственно, что свидетельствует о различных механизмах действия и мишенях на этих клеточных линиях.

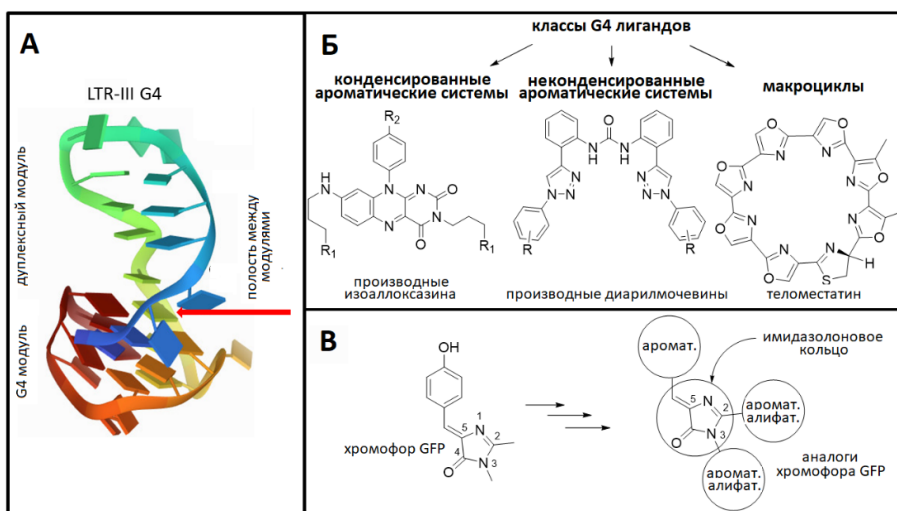
Таким образом, мы синтезировали новые производные 1,3-диаза-2-оксофеноксазина, и оценили их и известные G-clamp-нуклеозиды в качестве G4-лигандов в сравнении с контрольными G4-лигандами. Кандидаты из первого набора **1.1.40**, **1.1.42** и **1.1.44** уступали известному G4-лиганду PDS по способности стабилизировать G4. Учтя полученные данные по связи структуры со стабилизирующими свойствами, мы синтезировали второй набор соединений. Используя анализы FRET-плавления и ВФИ, мы показали, что два G-clamp-нуклеозидных производных **1.1.45** и **1.1.46** и два ненуклеозидных производных **1.1.49** и **1.1.50** стабилизируют теломерный и c-Kit G4 с высокой эффективностью и селективностью по сравнению с дуплексами. Лидерные соединения превосходили известные лиганды G4 или по стабилизирующему эффекту (PDS, NMM), или по селективности (BRACO-19). Большинство из них также превосходили доксорубин в тестах МТТ по индексу селективности НЕК293Т/А549'. Антипролиферативные эффекты лигандов в основном коррелировали со стабилизирующими G4 свойствами, при этом соединение **1.1.50** с заместителями в феноксазиновом цикле, содержащими гуанидиногруппы, заметно отличалось от других соединений. Хотя его G4-стабилизирующий эффект был незначительным, соединение **1.1.50** проявляло выраженную цитотоксичность. Подводя итог, производные 1,3-диаза-2-оксофеноксазина с аминоксодержащими группами являются надежными G4-лигандами и могут быть использованы в будущем в составе конъюгатов с олигонуклеотидами для разработки селективных противоопухолевых, антибактериальных и противовирусных терапевтических агентов.

После неклассических ДНК-структур в геноме человека мы сфокусировались на неклассических структурах в геномах вирусов. В данном разделе рассмотрены ДНК-мишени ВИЧ-1 [443–446]. Среди наиболее привлекательных мишеней для подавления репродукции вируса ВИЧ-1 называют G4, образующиеся в 5'-длинном концевом повторе (LTR), функционирующем как промотор, который имеет решающее значение для эффективного протекания жизненного цикла вируса [447]. Среди данных G4 LTR-III G4

считается основной структурой с самой высокой термостабильностью и необычным дуплекс-квадруплексным сочленением, образующим уникальную полость для селективного воздействия (**Рисунок 2.2.17А**) [334].

Как уже упоминалось выше, G4-лиганды представляют собой низкомолекулярные соединения, которые могут связываться с G4 и изменять их термическую стабильность. Это взаимодействие может приводить к нарушению регуляции репликации, трансляции или транскрипции и, следовательно, может быть использовано при разработке лекарственных средств [405,427,430,448]. Полиароматические углеводороды, содержащие варьирующееся количество аминотетильных групп, были недавно выявлены в качестве агентов, избирательно связывающихся с высоким сродством с дуплекс-квадруплексной структурой LTR-III G4 [449]. Данные производные можно отнести к классу конденсированных ароматических полициклических систем – одному из трех основных классов G4-лигандов (**Рисунок 2.2.17Б**).

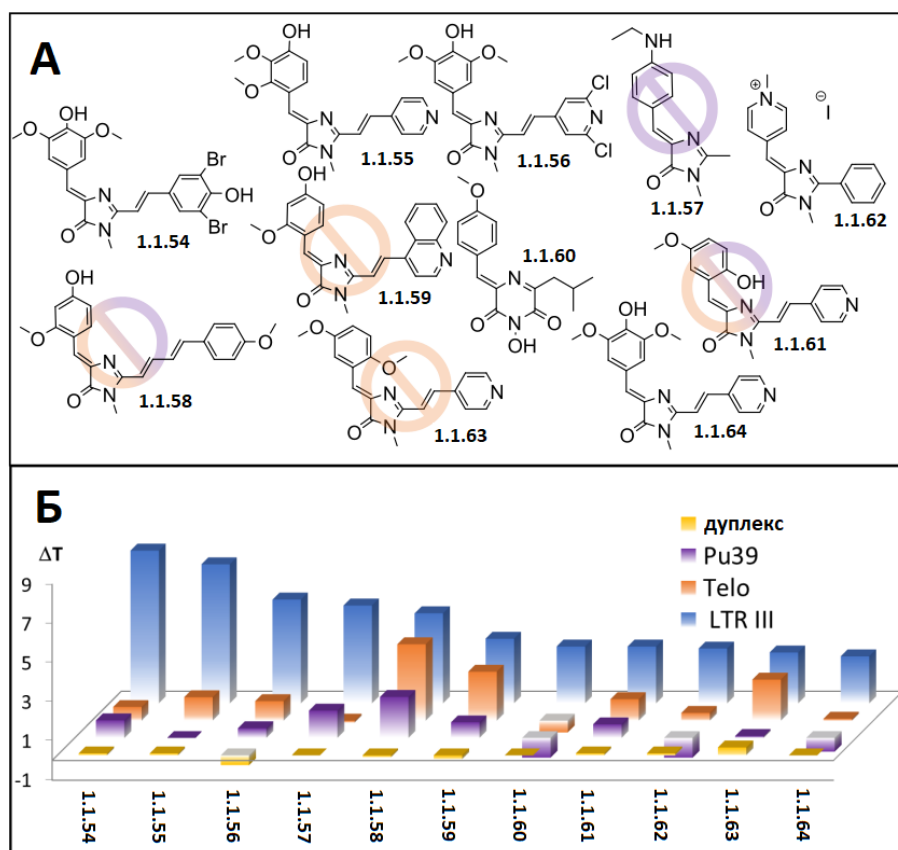
Хромофор GFP и его синтетические аналоги находят разнообразное применение для визуализации биомолекул и создании флуоресцентных зондов [450–453]. Интересно, что структура этих соединений (**Рисунок 2.2.17В**) в значительной степени напоминает второй тип G4-связывающих соединений — неконденсированные ароматические системы (**Рисунок 2.2.17Б**). Данный тип стабилизаторов никогда ранее не использовался для воздействия на гибридные неканонические структуры, подобные LTR-III G4. В связи с этим, мы решили исследовать набор производных хромофора GFP в качестве G4-лигандов и противовирусных агентов.



**Рисунок 2.2.17.** Основная G4-мишень, используемая в исследовании, классы G4-лигандов и принципы дизайна лигандов на основе хромофора GFP: (А) структура LTR-III G4 ВИЧ-1 (PDB: 6H1K); (Б) основные типы G4-связывающих соединений; (В) структура хромофора GFP и стратегия получения его синтетических производных.



Первоначально мы проверили библиотеку из 440 синтетических аналогов хромофора GFP, предоставленную д.х.н. Барановым М.С. (ГНЦ ИБХ РАН), на взаимодействие с последовательностью LTR-III G4 ВИЧ-1, которая участвует в регуляции активности промотора ВИЧ-1 [334,443], используя высокопроизводительный скрининг в планшетном формате с FRET-плавлением [454]. Первичная оценка выявила ряд соединений, способных стабилизировать LTR-III G4 ВИЧ-1. Мы выбрали 11 соединений (**Рисунок 2.2.18А**), демонстрирующих стабилизацию в диапазоне 2,4–7,8 °С, и оценили их способность стабилизировать другие последовательности, образующие G4, включая теломерную последовательность человека Telo [455], имеющую две конформации, гибрид-1 и гибрид-2 [58]), и модельный Pu36 G4 (G-богатая область Pu39 промотора P1 онкогена *BCL-2* [456] с конформационно полиморфной структурой [98]), а также контрольную последовательность, образующую дуплекс (**Рисунок 2.2.18Б**, **Таблица 2.2.5**). Выбранные производные, за исключением **1.1.57**, **1.1.58**, **1.1.59**, **1.1.61** и **1.1.63**, показали значительную селективность в отношении LTR-III G4.



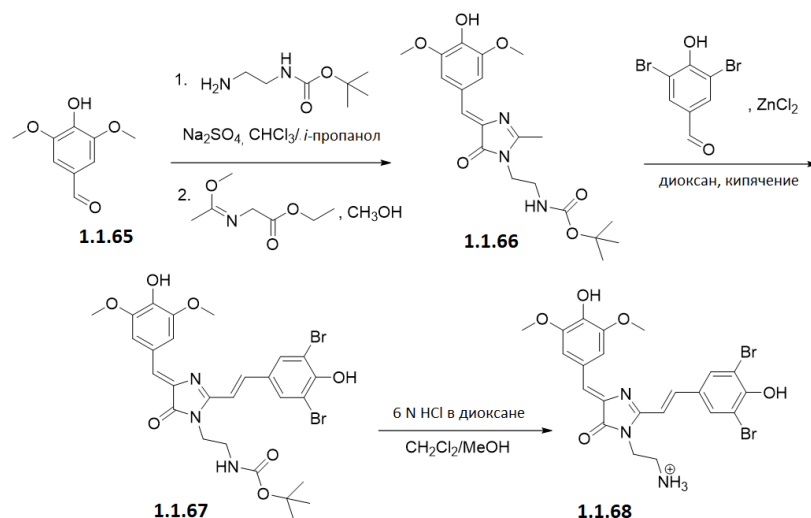
**Рисунок 2.2.18.** Результаты первичного скрининга: (А) структуры соединений, выбранных при первичном скрининге, демонстрирующие стабилизацию ВИЧ-1 LTR-III G4 ( $\Delta T$  выше 2°С); запрещающий знак соответствует отсутствию селективности; (Б) сравнение стабилизации различных вторичных структур лидерными соединениями.

**Таблица 2.2.5.** Сравнение стабилизации модельных G4 и контрольного дуплекса лидерными соединениями первичного скрининга.

| $\Delta T_{пл}^a$ | LTR III | Telo     | Pu39     | дуплекс  |
|-------------------|---------|----------|----------|----------|
| <b>1.1.54</b>     | 7,8±0,3 | 0,7±0,2  | 0,9±0,6  | 0,1±0,1  |
| <b>1.1.55</b>     | 7,1±0,3 | 1,2±0,2  | 0,0±0,4  | 0,1±0,0  |
| <b>1.1.56</b>     | 5,3±0,2 | 1,0±0,7  | 0,5±0,0  | -0,5±0,1 |
| <b>1.1.57</b>     | 5,0±0,1 | -0,1±0,0 | 1,4±0,6  | 0        |
| <b>1.1.58</b>     | 4,6±0,2 | 3,9±0,1  | 2,1±0,2  | -0,1±0,0 |
| <b>1.1.59</b>     | 3,3±0,2 | 2,5±0,3  | 0,8±0,2  | -0,2±0,1 |
| <b>1.1.60</b>     | 2,9±0,2 | -0,6±0,9 | -1,5±1,0 | 0        |
| <b>1.1.61</b>     | 2,9±0,1 | 1,1±0,2  | 0,7±0,3  | 0,1±0,1  |
| <b>1.1.62</b>     | 2,8±0,3 | 0,4±0,1  | -1±0,5   | 0,1±0,1  |
| <b>1.1.63</b>     | 2,6±0,2 | 2,1±0,0  | 0,1±0,4  | 0,4±0,0  |
| <b>1.1.64</b>     | 2,4±0,2 | 0,1±0,1  | -0,7±0,2 | 0        |

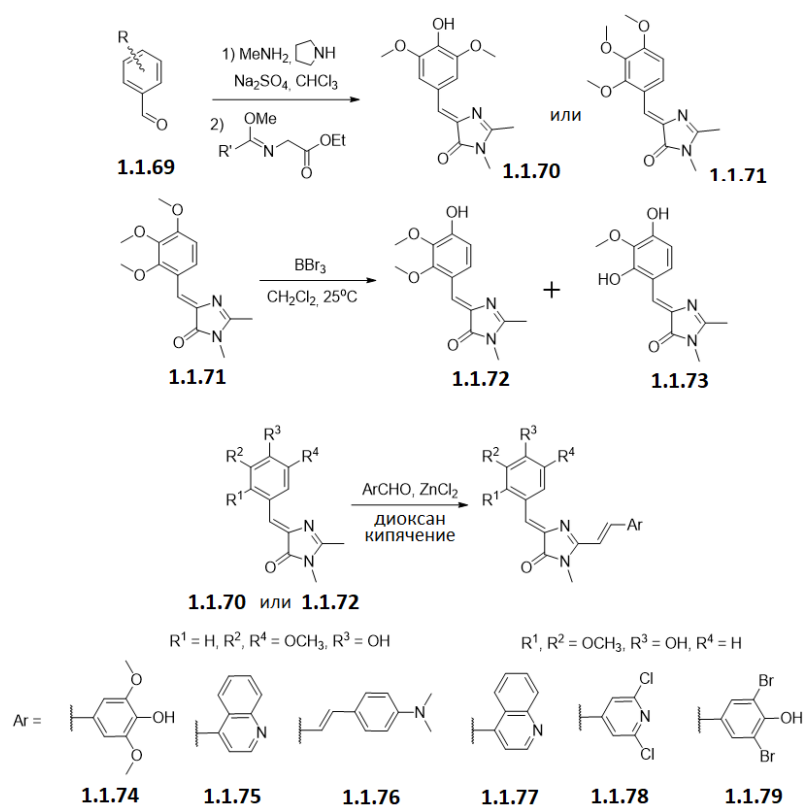
<sup>a</sup>  $\Delta T_{пл} = T_{пл}^{ДНК\ мишень+лиганд} - T_{пл}^{ДНК\ мишень}$ .

Первый раунд оптимизации структуры лигандов включал синтез производных, содержащих аминоэтильный заместитель в третьем положении имидазолонового кольца (Схема 2.2.3). Такой подход был успешно использован нами (раздел 2.2.1) и другими [385] при создании лигандов для повышения термостабильности G4. На основе наиболее эффективного соединения **1.1.54** были получены варианты, содержащие защищенную или протонированную аминоэтильную группу (**1.1.66**, **1.1.67**, **1.1.68**). К сожалению, эта модификация привела к полной потере стабилизирующих свойств, что позволяет предположить, что введенные заместители препятствует правильному позиционированию лиганда на поверхности G4, а ионные взаимодействия не вносят существенного вклада в стабилизирующие свойства этого класса лигандов.

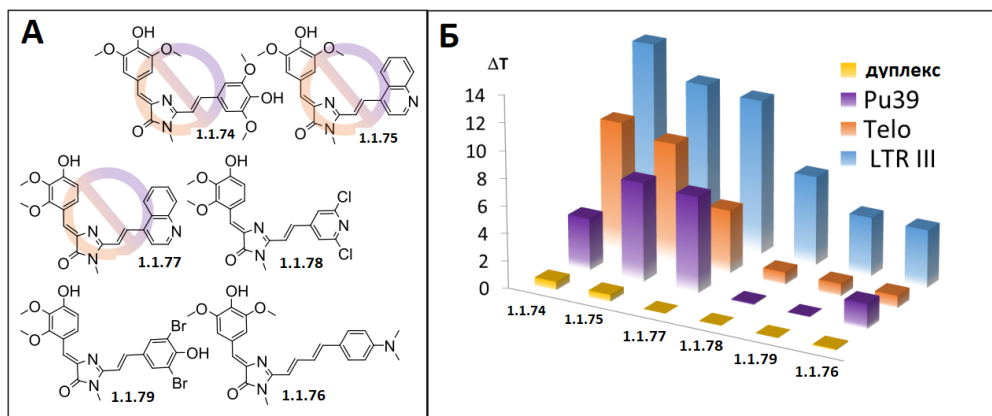


**Схема 2.2.3.** Синтез аналогов лидерного соединения **1.1.54**, содержащих в 3 положении имидазолонового кольца аминоэтильную группу.

Анализ взаимосвязи структуры с активностью (SAR) отобранных соединений, а также сравнение с тестируемыми структурами, содержащими те же фрагменты, но с низкой или отсутствующей стабилизирующей способностью, выявили фрагменты, потенциально способные вносить вклад в стабилизацию LTR-III G4. Было обнаружено, что присутствие в пятом положении ядра хромофора GFP (**Рисунок 2.2.17**) 2,3- или 3,5-диметокси-4-гидроксиарильного фрагмента (например, в соединениях **1.1.54-1.1.56**, **1.1.64**) обеспечивает наибольший стабилизирующий эффект. Аналогичный эффект оказывали пиридиновый или дибромфенильный фрагмент во втором положении имидазолонового кольца (**1.1.54**, **1.1.55**, **1.1.61**, **1.1.63**, **1.1.64**). На основе этих результатов мы провели дизайн и синтез шести дополнительных структур (**Схема 2.2.4**) и оценили их взаимодействие с тем же набором последовательностей, образующих G4, и контрольным дуплексом (**Рисунок 2.2.19**, **Таблица 2.2.6**).



**Схема 2.2.4.** Синтез дополнительных аналогов хромофора GFP.



**Рисунок 2.2.19** Дизайн лигандов на основе GFP-хромофора к LTR-III G4: (А) структуры соединений, синтезированных по результатам изучения взаимосвязи структуры с активностью; запрещающий знак соответствует отсутствию селективности; (Б) сравнительная стабилизация различных ДНК-структур синтезированными соединениями.

**Таблица 2.2.6.** Сравнение стабилизации синтезированными соединениями модельных G4 и контрольного дуплекса.

| лиганд        | $\Delta T_{пл}^a$ |         |          |          |
|---------------|-------------------|---------|----------|----------|
|               | LTR III           | Telo    | Pu39     | дуплекс  |
| <b>1.1.74</b> | 14±0,5            | 9,5±0,1 | 3,8±0,04 | 0,6±0,1  |
| <b>1.1.75</b> | 11,7±0,5          | 8,7±0,2 | 7,2±0,4  | 0,5±0,1  |
| <b>1.1.76</b> | 4,2±0,1           | 0,9±0,3 | 1,8±0,1  | 0,1±0,1  |
| <b>1.1.77</b> | 11,3±0,2          | 4,6±0,2 | 7,0±0,7  | -0,4±0,2 |
| <b>1.1.78</b> | 6,5±0,3           | 0,9±0,2 | 0,1±0,1  | 0±0,1    |
| <b>1.1.79</b> | 4,3±0,2           | 0,9±0,1 | 0,0±0,2  | 0,0±0,1  |

<sup>a</sup>  $\Delta T_{пл} = T_{пл}^{ДНК\ мишень+лиганд} - T_{пл}^{ДНК\ мишень}$ .

Интересно, что все соединения продемонстрировали высокую стабилизацию LTR-III G4, причем наиболее эффективные соединения имели диапазон стабилизации 11-14 °С (**1.1.74**, **1.1.75**, **1.1.77**), значительно превышая максимальные значения для лучших соединений из первичного скрининга ( $\Delta T = 7,8$  °С для **1.1.54**). Эти результаты подтверждают наше предположение о решающей роли использованных фрагментов для связывания и стабилизации мишени. Тем не менее, наиболее эффективные соединения не были селективными; диапазон стабилизации альтернативных G4-образующих последовательностей был значительным ( $\Delta T = 4-10$  °С). В то же время менее эффективные стабилизаторы **1.1.76**, **1.1.78** и **1.1.79** повышали температуру плавления LTR-III G4 на 4-7 °С, что сравнимо с лучшими исходно протестированными соединениями. Эксперименты по титрованию (Таблица 2.2.7) показали, что наиболее эффективные стабилизаторы **1.1.74**,

**1.1.75** и **1.1.77** сохраняли значительную стабилизирующую способность ( $\Delta T_{пл} = 7-9$  °C) при молярном соотношении LTR-III G4/лиганд 1:20.

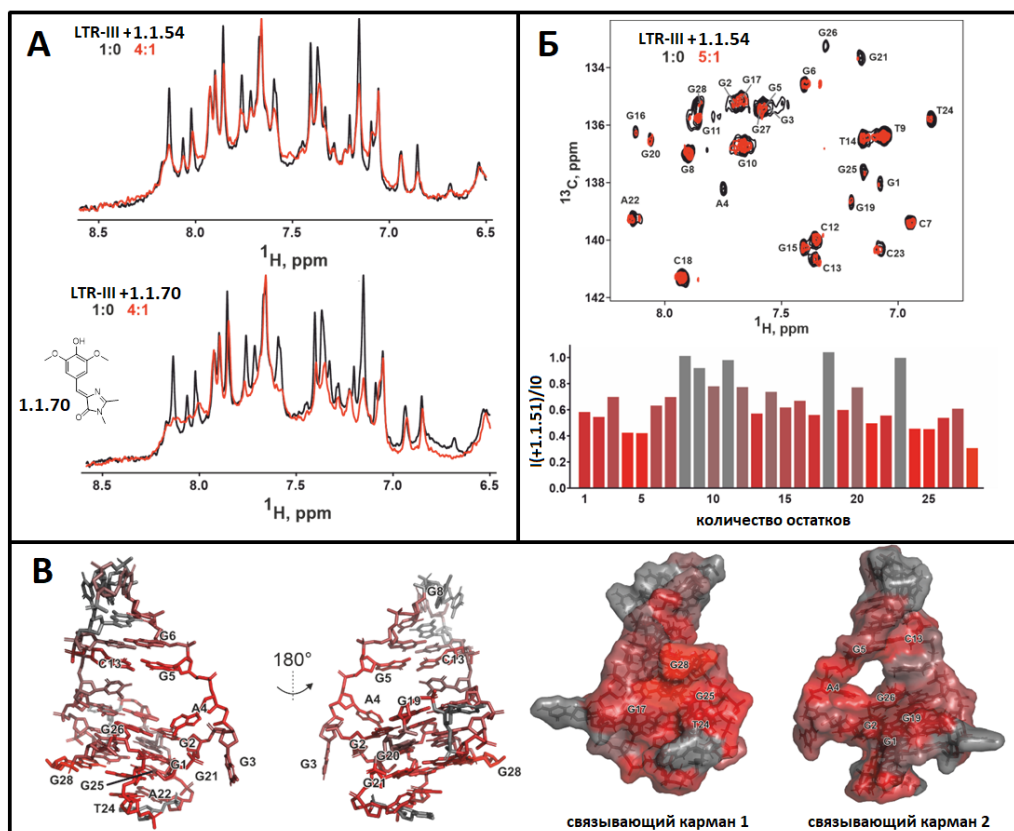
**Таблица 2.2.7.** Эксперименты по титрованию **1.1.74**, **1.1.75** и **1.1.77** при различных молярных соотношениях LTR-III G4:лиганд.

| лиганд        | Молярное соотношение LTR-III G4/лиганд |         |         |
|---------------|--|---------|---------|
|               | 1:50                                   | 1:20    | 1:2     |
| <b>1.1.74</b> | 13,1±0,2 <sup>a</sup>                  | 9,1±0,6 | 2,4±0,6 |
| <b>1.1.75</b> | 11,3±0,3                               | 7,9±0,4 | 2±1     |
| <b>1.1.77</b> | 11,4±0,2                               | 8,5±0,3 | 2,3±0,5 |

<sup>a</sup>  $\Delta T_{пл} = T_{пл}^{ДНК\ мишень+лиганд} - T_{пл}^{ДНК\ мишень}$ .

Для изучения механизма избирательного взаимодействия соединения **1.1.54** с LTR-III G4 мы, совместно с сотрудниками лаборатории структурной биологии ионных каналов ИБХ З.О. Шенкаревым и М.Ю. Мышкиным, разработали схему и провели ЯМР-эксперименты. LTR-III G4 ВИЧ-1 имеет необычную двухмодульную конфигурацию (**Рисунок 2.2.17А**), и его уникальные структурные особенности могут обеспечить возможность его селективного связывания и стабилизации соединениями с определенной геометрией ароматической системы и расположением заместителей. Мы изучили с помощью ЯМР взаимодействие наиболее многообещающего селективного стабилизатора LTR-III G4 - **1.1.54** по сравнению с его структурным аналогом **1.1.70** (**Рисунок 2.2.20**) без стабилизирующей способности.

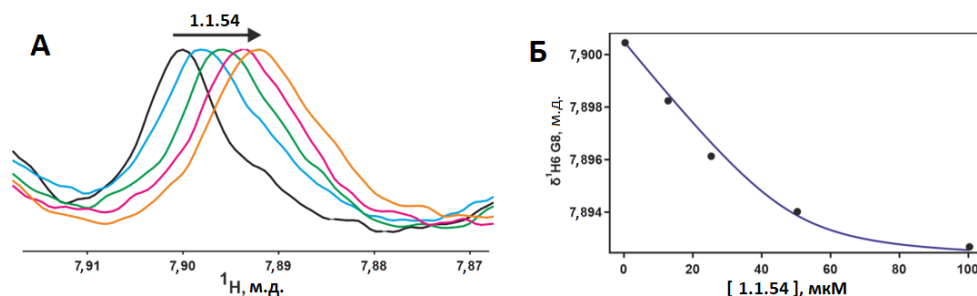
Титрование LTR-III G4 **1.1.54** и **1.1.70** приводило к падению интенсивности некоторых сигналов LTR-III G4 в областях HN (13,0-10,5 м.д.) и H6/H8 (8,5-6,5 м.д.) <sup>1</sup>H ЯМР-спектра (**Рисунок 2.2.20А**). Наблюдаемое избирательное снижение интенсивности сигналов указывает на то, что оба лиганда взаимодействуют с молекулой LTR-III G4. Процессы связывания лиганда, вероятно, протекают в режиме от среднего до быстрого по временной шкале ЯМР. Поэтому резонансы остатков, находящихся вблизи сайта(ов) связывания лиганда, уширяются и их интенсивность снижается (режим промежуточного обмена). В то же время нуклеотиды, находящиеся далеко от сайта(ов) связывания лиганда, демонстрировали лишь слабые изменения химических сдвигов и не уширялись (**Рисунок 2.2.21А**, режим быстрого обмена). Отметим, что образование комплекса с лигандом не обязательно предполагает стабилизацию структуры G4.



**Рисунок 2.2.20.** Результаты исследований ЯМР-титрования. (А) Изменения в 1D  $^1\text{H}$  спектрах (область, соответствующая пиримидиновым протонам Н6 и пуриновым протонам Н8) 50 мкМ LTR-III G4 при титровании лигандами **1.1.54** и **1.1.70**. (Б) Наложение спектров  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC 0,5 мМ LTR-III G4 до (черный) и после (красный) добавления соединения **1.1.54** (LTR-III G4/1.1.54 = 5:1) при 25 °С (вверху). Показано отнесение кросс-пиков Н6/С6 (Т, С) и Н8/С8 (А, Г). Диаграмма соответствует относительному уменьшению интенсивности при добавлении соединения **1.1.54** (внизу). (В) Нуклеотиды структуры LTR-III G4 (PDB: 6H1K), наиболее чувствительные к добавлению **1.1.54** (слева) и два возможных связывающих кармана (справа). Структура окрашена в соответствии с ослаблением кросс-пиков Н6/С6 и Н8/С8 в спектре  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (панель Б, внизу).

Мы оценили нуклеотиды, которые предположительно принимают участие в связывании лиганда **1.1.54**, измеряя снижение интенсивности кросс-пиков Н6/С6 и Н8/С8 в спектре  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (**Рисунок 2.2.20Б**). Наиболее чувствительны к лиганду **1.1.54** три кластера остатков: в нижней части LTR-III G4 (G21, T24, G25, G28), в верхней части G4 (G1, G2, G19, G26), а также в области петли в полости между двумя модулями (A4, G5, C13) (**Рисунок 2.2.20Б**). Положение этих нуклеотидов предполагает, что на поверхности LTR-III G4 могут находиться два лиганд-связывающих кармана: образованный G17, T24, G25, G28 и, таким образом, стабилизирующий 3'-конец LTR-III G4 (связывающий карман 1); и

образованный G1, G2, A4, G5, C13, G19, G26 в полости между двумя модулями и стабилизирующий 5'-конец LTR-III G4 (связывающий карман 2, **Рисунок 2.2.20B**).



**Рисунок 2.2.21.** Изменения химического сдвига H8 G8 LTR-III G4 при 50 мкМ при добавлении лиганда **1.1.54** при 20 °C, pH 7,0, 800 МГц (A) и кривая связывания, описывающая взаимодействие LTR-III G4 с лигандом **1.1.54**, аппроксимированная уравнением диссоциации.

Для определения сродства лиганда **1.1.54** к LTR-III G4 мы проанализировали изменения химического сдвига H8 остатка G8 в спектрах 1D <sup>1</sup>H ЯМР. Этот нуклеотид находится на расстоянии нескольких остатков от второго связывающего кармана и поэтому демонстрирует быстрый (по шкале ЯМР) химический обмен. Концентрационная зависимость относительного изменения химического сдвига была аппроксимирована уравнением связывания для стехиометрии 1:1 (**Рисунок 2.2.2.5Б**) [449]. Константа диссоциации комплекса LTR-III/**1.1.54** ( $K_D$ ) составляла порядка 3 мкМ.

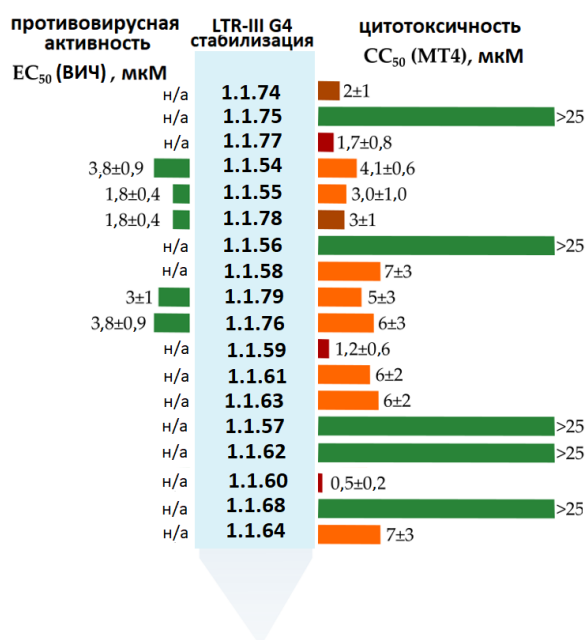
Противовирусную активность *in vitro* отобранных соединений оценивали в сравнении с цитотоксичностью (**Таблица 2.2.8, Рисунок 2.2.22**). Большинство соединений были токсичны для клеток МТ4 (цитотоксическая концентрация ( $CC_{50}$ ) < 10 мкМ). Ни одно из 10 нетоксичных соединений ( $CC_{50}$  > 25 мкМ) не ингибировало репродукцию ВИЧ-1 в клетках МТ4. LTR-III G4-стабилизирующие соединения **1.1.54**, **1.1.55** и **1.1.78** проявляли ингибирующую активность с  $EC_{50}$  в микромолярном диапазоне, которая, однако, сопровождалась значительной цитотоксичностью. Цитотоксичность в основном увеличивалась со стабилизирующими LTR-III G4 свойствами и коррелировала с ингибирующей активностью. Из этого следует, что соединения могут иметь аналогичные мишени в вирусном и человеческом геномах, принимая во внимание предполагаемое существование квадруплекс-дуплексных гибридов в геноме человека [457]. Использование ограниченной целевой панели G4 казалось оправданным для предварительной оценки селективности в наших скрининговых анализах. Однако, как видно из тестов на ингибирование, в будущих раундах оптимизации потребуются более детальные

исследования селективности. Кроме того, побочные эффекты выбранных соединений также могут возникать из-за связывания с внутриклеточными белками [458].

**Таблица 2.2.8.** Противовирусная активность тестируемых соединений на клетках МТ4 против ВИЧ-1 (штамм NL4-3).

| соединение | EC <sub>50</sub> , мкМ | CC <sub>50</sub> (МТ4), мкМ | LTR-III G4 ΔT (среднее), °C |
|------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1.1.54     | 3,8±0,9                | 4,1±0,6                     | 8,4                         |
| 1.1.55     | 1,8±0,4                | 3,0±1,0                     | 6,9                         |
| 1.1.56     | н/а                    | >25                         | 5,2                         |
| 1.1.57     | н/а                    | >25                         | 3,1                         |
| 1.1.58     | н/а                    | 7±3                         | 4,5                         |
| 1.1.59     | н/а                    | 1,2±0,6                     | 3,7                         |
| 1.1.60     | н/а                    | 0,5±0,2                     | 1,7                         |
| 1.1.61     | н/а                    | 6±2                         | 3,3                         |
| 1.1.62     | н/а                    | >25                         | 2,3                         |
| 1.1.63     | н/а                    | 6±2                         | 3,2                         |
| 1.1.64     | н/а                    | 7±3                         | 0,1                         |
| 1.1.68     | н/а                    | >25                         | 1,2                         |
| 1.1.74     | н/а*                   | 2±1                         | 14,0                        |
| 1.1.75     | н/а                    | >25                         | 11,7                        |
| 1.1.76     | 3,8±0,9                | 6±3                         | 4,2                         |
| 1.1.77     | н/а                    | 1,7±0,8                     | 11,3                        |
| 1.1.78     | 1,8±0,4                | 3±1                         | 6,5                         |
| 1.1.79     | 3±1                    | 7±3                         | 4,3                         |
| AZT        | 0,0071±0,0004          | 8±2                         | -                           |

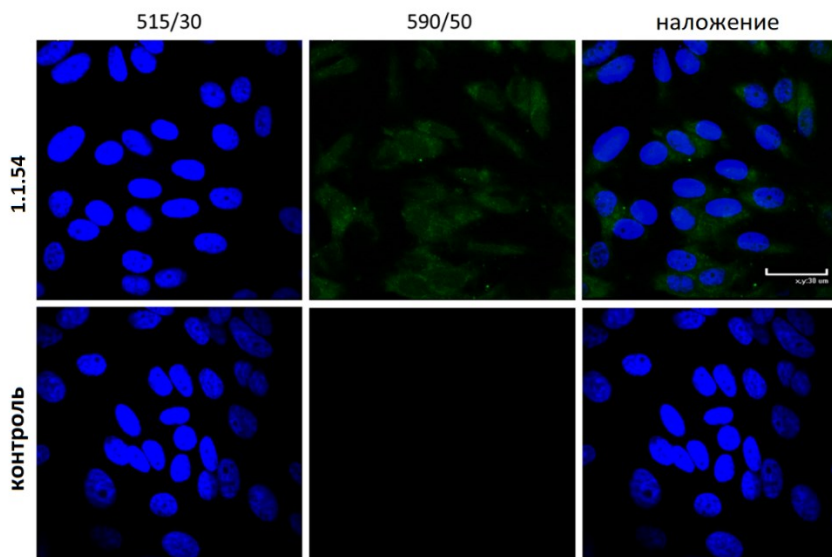
\* – неактивно при нетоксичных концентрациях



**Рисунок 2.2.22.** Термическая стабилизация, цитотоксичность и противовирусная активность тестируемых соединений в клетках МТ4 против ВИЧ-1 (штамм NL4-3). н/а – неактивен в нетоксичных концентрациях.



Таким образом, сравнение данных стабилизации LTR-III G4 и противовирусных свойств не выявило устойчивой корреляции. Однако отсутствие обнаруживаемой противовирусной активности у некоторых эффективных стабилизаторов LTR-III G4 может быть результатом их высокой цитотоксической активности (низкие значения  $CC_{50}$ , например, для **1.1.77**). Механизм действия, опосредованный ДНК G4, предполагает, что потенциальный кандидат должен проникать в ядро клетки. Показано, что некоторые из ранее изученных аналогов хромофора GFP проникают в клетку и ядро [459]. Однако высокая гидрофобность отобранных соединений может препятствовать внутриклеточному накоплению. В связи с этим мы проверили накопление наиболее перспективного стабилизатора LTR-III G4, **1.1.54**, в клетках, используя метод флуоресцентной конфокальной микроскопии (**Рисунок 2.2.23**).



**Рисунок 2.2.23.** Результаты конфокальной микроскопии клеток, обработанных Хехст 33342 и лигандом **1.1.54** или ДМСО в качестве контроля.

Полученные результаты показывают, что лиганд **1.1.54** (флуоресцирующий в зеленом канале) способен накапливаться в клетках и может обнаруживаться как в цитоплазме, так и в ядрах клеток (окраска Хехст 33342).

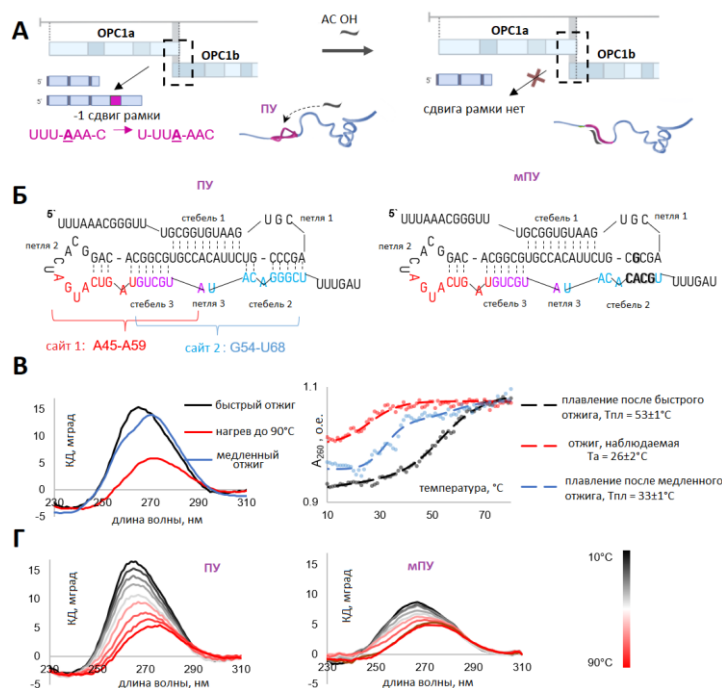
Аналоги хромофора GFP находят широкое применения для визуализации биомолекул. Однако их потенциал в качестве кандидатов в лекарственные средства изучен недостаточно. Мы проверили имеющуюся в ГНЦ ИБХ РАН большую библиотеку синтетических аналогов хромофора GFP в качестве лигандов на способность стабилизировать перспективную и уникальную мишень – последовательность LTR-III G4 в промоторе ВИЧ-1. Скрининг выявил ряд эффективных стабилизаторов и позволил нам, на основе изучения связи структура-активность, провести дизайн соединений с улучшенными

свойствами. Тестирование селективности и исследование противовирусной активности *in vitro* выявили наиболее перспективное соединение-лидер – лиганд **1.1.54**. Структуру комплекса LTR-III G4/**1.1.54** охарактеризована с помощью ЯМР-экспериментов, которые показали вероятное расположение соединения внутри полости между дуплексным и G4 модулями последовательности LTR-III. Таким образом, результаты подтверждают возможность разработки селективных по сравнению с другими ДНК-мишенями лигандов, аналогов хромофора GFP, для нестандартных двухмодульных G4-содержащих структур. Последующие исследования должны быть направлены на снижение их цитотоксичности при сохранении способности ингибировать репродукцию вируса.

Выше были описаны подходы к стабилизации неканонических структур ДНК, которые в норме являются короткоживущими (транзиентными), т.е. формируются на этапах транскрипции и репликации, но быстро расплетаются хеликазами. Транзиентные структуры обнаружены и в РНК, в том числе вирусной. Помимо прочего они могут участвовать в регуляции трансляции. Ярким примером являются псевдоузловые структуры (ПУ) в геномной РНК коронавирусов. Стабилизация или дестабилизация ПУ сказывается на трансляции и в итоге нарушает жизненный цикл вируса, причем наиболее выраженный и быстрый эффект (полная остановка биосинтеза компонентов репликационного комплекса) ожидается именно при дестабилизации ПУ малыми молекулами, либо его расплетении комплементарными модифицированными олигонуклеотидами. Ниже представлена апробация подхода к подавлению репликации SARS-CoV-2, основанного на расплетении ПУ в геномной РНК вируса с помощью высокоаффинных олигонуклеотидных инструментов.

Комплекс транскрипции-репликации SARS-CoV-2 включает несколько неструктурных белков (НСБ), образующихся в результате протеолитического расщепления полипротеинов-предшественников pp1a (НСБ1-11) и pp1ab (НСБ1-16). Эти полипротеины-предшественники кодируются перекрывающимися рамками считывания ORC1a и ORC1b [460]. Трансляция последней рамки требует запрограммированного рибосомного сдвига рамки считывания (RSCS) на один нуклеотид к 5'-концу (-1 нуклеотид) в сайте проскальзывания UUUAAC РНК SARS-CoV-2 [461] (**Рисунок 2.2.24А**). Вероятность RSCS повышается за счет расположенного вблизи 3'-конца сайта проскальзывания ПУ, который должен быть расплетен перед входом РНК в рибосому, что обеспечивает ее торможение. Эффект ПУ частично уравнивается петлей-аттенюатором, находящейся ближе к 5'-концу от сайта проскальзывания, что приводит к общей эффективности сдвига рамки считывания между 25 и 70%. Для всех коронавирусов характерно сочетание сайта проскальзывания, 5'-петли-аттенюатора и трехпетельного 3'-ПУ [462].

Исследования структуры ПУ SARS-CoV-2 методами криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) [463], кристаллографии [464,465] и структурного/молекулярного моделирования [466] выявили несколько возможных конформеров, а их динамику удалось отчасти прояснить с помощью метода молекулярных пинцетов [467]. В итоге было выделено 2 основных ансамбля конформеров ПУ: с кольцевым элементом, который образуется за счет продевания 5'-конца через трехспиральный фрагмент на стыке элементов “петля-стебель” (более стабильный вариант), и без кольцевого элемента (менее стабильный вариант). РСРС предположительно требует сосуществования этих двух ансамблей конформеров. Смещение равновесия в сторону или стабилизированных или дестабилизированных конформеров может повлиять на соотношение НСБ1-11:НСБ1-16 и в конечном итоге нарушить жизненный цикл вируса [462,468]. Соответствующие стратегии разработки терапевтических средств включают таргетирование кармана кольцевого элемента ПУ небольшими молекулами [469] или структур петля-стебель с помощью АС ОН [463] (Рисунок 2.2.24А). В последнем подходе обоснование выбора сайтов таргетирования (конкретных стеблей ПУ) является предметом дискуссий.



**Рисунок 2.2.24.** Псевдоузел SARS-CoV-2: функция, структура и потенциальные участки для таргетирования. (А) Схематическое изображение зависящего от ПУ РСРС при трансляции ORC1a SARS-CoV-2 (левая панель) и ожидаемое снижение его эффективности в присутствии ПУ-расплетающих АС ОН (правая панель). (Б) Схематическое изображение вторичной структуры ПУ (левая панель) и его мутанта мПУ (правая панель). Показаны потенциальные сайты для таргетирования. (В) Влияние скорости отжига на сворачивание ПУ. (Г) Сравнение КД-плавления ПУ и мПУ.

Стебель 1 является наиболее стабильным и первым сворачивается обратно после разрушения ПУ [467], тогда как стебли 2 и 3 относительно подвижны и складываются вслед за стеблем 1. С одной стороны, такая иерархия указывает на перспективность стебля 1 для таргетирования его АС ОН, поскольку это гарантировано предотвратит восстановление исходной структуры. С другой стороны, она предполагает большую доступность для воздействия фрагментов ПУ, образующих стебель 2/3. Первое поколение ингибиторов РСРС коронавируса включало пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК), направленные на вытеснение одной из цепей в стеблях 2 и 3 ПУ SARS-CoV-1 [470], который практически идентичен ПУ у SARS-CoV-2. ПНК подавляли репликацию вируса в микромолярных концентрациях. Для таргетирования ПУ SARS-CoV-2 недавно были предложены гэдмеры, содержащие остатки LNA и фосфоротиоатные межнуклеотидные связи (PS) [463]. Гэдмеры, направленные на разрушение стебля 1, были активны при высоких наномолярных концентрациях как в модельной системе для отслеживания сдвига рамки считывания, так и при анализе репликации псевдовируса, тогда как несколько протестированных гэдмеров к стеблям 2/3 оказались неэффективными.

Чтобы выяснить, отражает ли ингибирующая активность АС ОН в модельной системе со сдвигом рамки считывания их способность нарушать сворачивание ПУ, мы сосредоточились на стеблях 2 и 3 ПУ SARS-CoV-2. При выборе конкретных участков для таргетирования мы отталкивались от вероятности вытеснения цепи из стебля комплементарным олигонуклеотидом, прогнозируемой на основе сравнительной стабильности РНК-дуплекса в стебле и удлиненного дуплекса, образованного РНК ПУ и модифицированным олигонуклеотидом, захватывающего участок петли. Мы получили три типа АС ОН, нацеленных на стебель 2/3 с прилегающими петлевыми участками, а именно гэдмеры LNA (LDL), полностью модифицированные LNA, и ОН (CPS), модифицированные остатками G-clamp и PS межнуклеотидными связями. Мы оценили их влияние на структуру ПУ с помощью теста на изменение электрофоретической подвижности (ТИЭП) и КД-спектроскопии. Затем мы оценили ингибирующую активность АС ОН, используя метод оценки эффективности сдвига рамки считывания на основе двойного люциферазного теста (ДЛТ). Наконец, мы сравнили данные ТИЭП и ДЛТ и протестировали отобранные лидеры на живом SARS-CoV-2 в двух клеточных линиях.

Чтобы выбрать АС ОН, которые разрушают стебли ПУ SARS-CoV-2 и расплетают структуру ПУ, мы получили 96-нуклеотидный ПУ-образующий фрагмент вирусной РНК (**Рисунок 2.2.24Б**) и проверили его сворачивание с помощью КД-спектроскопии (**Рисунок 2.2.24В**). КД-спектр быстро отожденного ПУ содержал признаки А-формы, а именно выраженный максимум при 260-265 нм, что указывает на присутствие фрагментов дцРНК

[471]. После медленного отжига основная полоса смещалась, а ее амплитуда слегка уменьшалась, что указывает на повышенный вклад оцРНК с основным максимумом примерно при 272 нм и второстепенным минимумом при 240 нм [472].

В соответствии с данными КД, УФ-плавление быстро отожженного образца подтвердило наличие свернутой структуры, которая выдерживала физиологическую температуру ( $T_{пл} > 37^{\circ}\text{C}$ , **Рисунок 2.2.24В**), в то время как медленно отожженный образец показал снижение гипохромизма при 260 нм и дал неотчетливую кривую плавления с кажущимся значением  $T_{пл}$ , близким к  $37^{\circ}\text{C}$ . Поэтому во всех последующих экспериментах с АС ОН мы использовали быстрый отжиг ПУ РНК.

Чтобы проверить разницу в электрофоретической подвижности между свернутой и частично или полностью развернутой структурой РНК, помимо нативного ПУ мы получили его аналог - мПУ с пятью мутациями, препятствующими образованию стебля 2 (**Рисунок 2.2.24Б**). Хотя большинство мутаций, обнаруженных в нативных вариантах SARS-CoV-2, допускают альтернативные узловые структуры (например, за счет спаривания между фрагментами стебля 2 и петель 3 или 5'-выступом) [473], было предсказано, что мутации, выбранные для мПУ, исключают образование альтернативных узлов. По данным КД-спектроскопии, в отличие от ПУ, мПУ был хотя бы частично развернут даже в отсутствие АС ОН (**Рисунок 2.2.24Г**).

Затем мы сравнили фрагменты «стебель-петля» ПУ как возможные сайты-мишени для АС ОН с точки зрения гомологии с мРНК человека, что может определять потенциальные побочные эффекты АС ОН. Каждый стебель ПУ SARS-CoV-2 имеет сходство по крайней мере с одним человеческим транскриптом. Стебли 1 и 3 гомологичны фрагментам мРНК, кодирующим противовоспалительный белок TSC22D3 и аргининметилтрансферазу CARM1 соответственно. Частичные гомологи стебля 2 включают РНК, кодирующие OSTF1 (стимулирующий остеокласты фактор 1), BAIP3 (белок-связывающий партнер BAIP, который кодирует специфический для мозга ингибитор ангиогенеза) и USP18 (убиквитин-специфическую пептидазу 18). Мы пришли к выводу, что незначительного побочного действия на человеческие транскрипты в любом случае исключать нельзя, и сосредоточили внимание на мишенях длиной 15 нуклеотидных остатков (но), сходство которых с фрагментами мРНК человека не превышало 13 н.

Наконец, мы сравнили фрагменты ПУ с точки зрения доступности для АС ОН и термической стабильности соответствующих дуплексов. Из-за наличия выпетливаний стебли 2 и 3 легче разрушить, чем стебель 1, поэтому мы сосредоточились на фрагменте ПУ, охватывающем стебель 2, петлю 3 и стебель 3. В пределах этой области мы выбрали участки 1 и 2 (**Рисунок 2.2.24Б**) со средним содержанием G/C пар (40 и 53 %

соответственно). Их гипотетические дуплексы с АС ОН демонстрируют сопоставимые прогнозируемые температуры плавления, значительно превышающие физиологическое значение (45°C и 49°C соответственно). Оба сайта перекрываются с местом соединения стеблей 3 и 1. Предполагается, что нарушение этого соединения предотвращает образование стабильных конформеров ПУ с кольцевым элементом. Таким образом, мы выбрали сайты 1 (A45-A59) и 2 (G54-U68) ПУ в качестве мишеней для АС ОН. Ранее сайт G54-U68 ПУ SARS-CoV-1, почти аналогичный сайту SARS-CoV-2, был успешно таргетирован АС ПНК *in vitro* [474].

Мы разработали три набора АС ОН, нацеленных на сайты 1 и 2 ПУ (Таблица 2.2.9): LNA-олигомеры G54-LNA и A45-LNA; гэтмеры G54-LDL и A45-LDL, а также фосфоротиоатные олигомеры со вставками G-clamp-нуклеотида (CPS1-5).

**Таблица 2.2.9.** Последовательности и активность АС ОН в анализах ТИЭП и ДЛТ.

| шифр    | последовательность, 5'-3' <sup>a</sup> | EC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> |
|---------|--|---|
| G54-LDL | <b>AGCCCTGTATACGAC</b>                 | < 0,5 мкМ (ТИЭП)                                |
| A45-LDL | <b>TACGACATCAGTACT</b>                 | 0,6 ± 0,1 мкМ (ТИЭП)                            |
| G54-LNA | <b>AGCCCTGTATACGAC</b>                 | < 0,5 мкМ (ТИЭП); 26 ± 9 нМ (ДЛТ)               |
| A45-LNA | <b>TACGACATCAGTACT</b>                 | 0,3 ± 0,1 мкМ (ТИЭП)                            |
| CPS-1   | <i>AGCXCTGTATACGAC</i>                 | > 5 мкМ (ТИЭП)                                  |
| CPS-2   | <i>AGCXCTGTATAXGAC</i>                 | > 5 мкМ (ТИЭП)                                  |
| CPS-3   | <i>AGXCXTGTATACGAC</i>                 | 2,3 ± 0,4 мкМ (ТИЭП)                            |
| CPS-4   | <i>TAXGACATXAGTACT</i>                 | > 5 мкМ (ТИЭП)                                  |
| CPS-5   | <i>TACGACATXAGTAXT</i>                 | > 5 мкМ (ТИЭП)                                  |
| SCR     | <b>CATACGTCTATACGCT</b>                | -   |

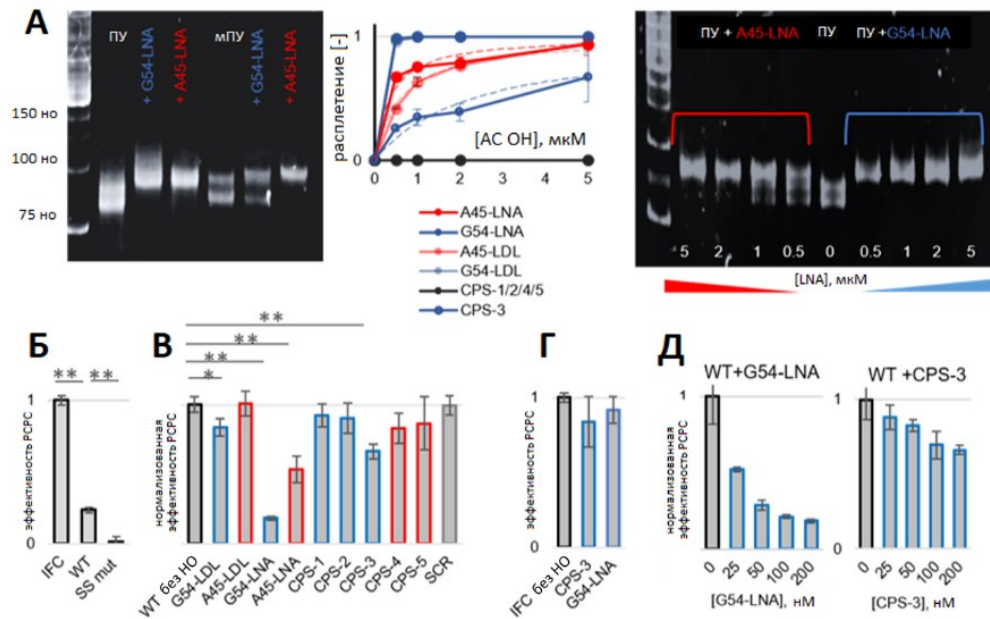
<sup>a</sup> полужирный, LNA; курсив, фосфоротиоат; X, G-clamp.

<sup>b</sup> 50% разрушение ПУ подтверждено тестом на изменение электрофоретической подвижности (ТИЭП) или ингибированием сдвига рамки считывания с помощью двойного люциферазного теста (ДЛТ).

Модификация олигонуклеотидного (ОН) остова LNA-звеньями предотвращает расщепление нуклеазой и повышает термическую стабильность дуплексов АС ОН-РНК [475]. Тотальная модификация LNA также затрудняет распознавание дуплексов АС ОН-РНК РНКазой Н, тогда как наличие нативного центрального фрагмента (≥7 нп) в LDL гэтмерах восстанавливает активацию РНКазы Н [475]. Фосфоротиоатная межнуклеотидная модификация повышает устойчивость к расщеплению нуклеазами, не препятствует привлечению РНКазы Н и оказывает незначительное влияние на термическую стабильность дуплекса [475–477]. Замена нативного остатка 2'-дезоксцитидина на G-clamp-нуклеозид, образующий четыре водородные связи с остатком гуанина в комплементарной цепи, улучшает распознавание однонуклеотидных замен, повышает устойчивость к расщеплению

нуклеазами [10] и стабильность дуплекса в зависимости от последовательности, не препятствуя активации РНКазы Н [10,13]. Таким образом, мы ожидали, что АС ОН LNA, LDL и CPS будут защищены от гидролиза нуклеазами и будут разрушать ПУ за счет эффективного связывания с целевой РНК. АС ОН LDL и CPS могут как разрушать ПУ, так и активировать РНКазу Н [18,475]. Потенциал разрушения (расплетения) ПУ за счет гибридизации с каждым из АС ОН был оценен с использованием ТИЭП (**Рисунок 2.2.25А**).

В первую очередь, мы сравнили ПУ и мПУ, чтобы проверить разницу между преимущественно свернутым (ПУ) и преимущественно развернутым (мПУ) вариантами (**Рисунок 2.2.25А**, левая панель). Оба варианта дали две близкие полосы в ТИЭП, и ПУ был немного менее подвижен, чем мПУ. В случае ПУ мы объясняем две полосы наличием двух свернутых, либо свернутого и частично развернутого конформеров. В случае мПУ две полосы могут соответствовать частично или полностью развернутым конформерам. SYBR Green II окрашивал ПУ более эффективно, чем мПУ, что согласуется с большим количеством элементов дцРНК в ПУ. Электрофоретическая подвижность ПУ снижалась в присутствии избытка АС ОН, нацеленных на сайт 1 (A45-LNA) и сайт 2 (G54-LNA). Наличие четырех эквивалентов АС ОН приводило к полному исчезновению нижней полосы, что указывает на полный переход к менее компактной структуре. Этот результат согласуется с нашим предположением, что оба типа АС ОН разрушают ПУ. Напротив, нижняя полоса мПУ исчезла только в присутствии АС ОН A45-LNA, нацеленного на сайт 1, тогда как эффект G54-LNA, нацеленного на сайт 2, был незначительным из-за мутированного сайта 2 в мПУ. Таким образом, мы показали, что исчезновение нижней полосы в ТИЭП указывает на разрушение ПУ.

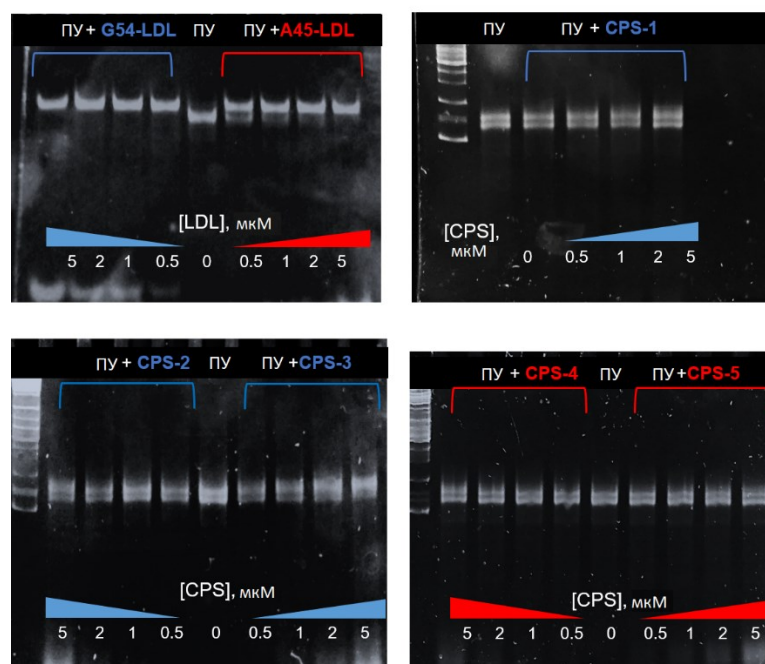


**Рисунок 2.2.25.** Разрушение псевдоузла с помощью АС ОН: электрофоретическая подвижность (А) и двойные люциферазные тесты (Б-Д). (А) Тест на изменение электрофоретической подвижности. Левая панель: электрофорез в ПААГ ПУ, мПУ и их комплексов с LNA, нацеленными на сайт 1 (красный) и сайт 2 (синий). Концентрация ПУ/мПУ: 0,5 мкМ; концентрация LNA: 2 мкМ. Средняя панель: сводная информация на основе электрофореза в ПААГ о разрушении ПУ с помощью АС ОН LNA, LDL и CPS. Правая панель: электрофорез в ПААГ ПУ (0,5 мкМ) в присутствии различных концентраций LNA. (Б) Двойной люциферазный тест: эффективность сдвига рамки считывания в конструкциях с сайтом проскальзывания SARS-CoV-2 дикого типа и ПУ (ДТ), положительным контролем, в котором оба люциферазных гена объединены в одну рамку считывания (in-frame control, IFC) и отрицательным контролем с мутированным сайтом проскальзывания (SS mut) между генами люцифераз. (В) Влияние АС ОН или ОН со случайной последовательностью (SCR) при концентрации 200 нМ на эффективность сдвига рамки считывания ДТ. (Г) Влияние двух лидеров АС ОН (200 нМ) на эффективность сдвига рамки считывания IFC. (Д) Дозозависимость влияния двух лидеров на эффективность сдвига рамки считывания ДТ. Все данные в (А) представляют собой средние значения не менее двух повторов, в (Б-Д) представляют собой средние значения трех биологических повторов, по три технических повтора в каждом. Планки погрешностей отражают значения стандартного отклонения. \* $P < 0,05$ , двусторонний тест Стьюдента; \*\* $P < 0,01$ . В (Г) данные представлены как среднее значение трех технических повторов (СО не превышало 10%).

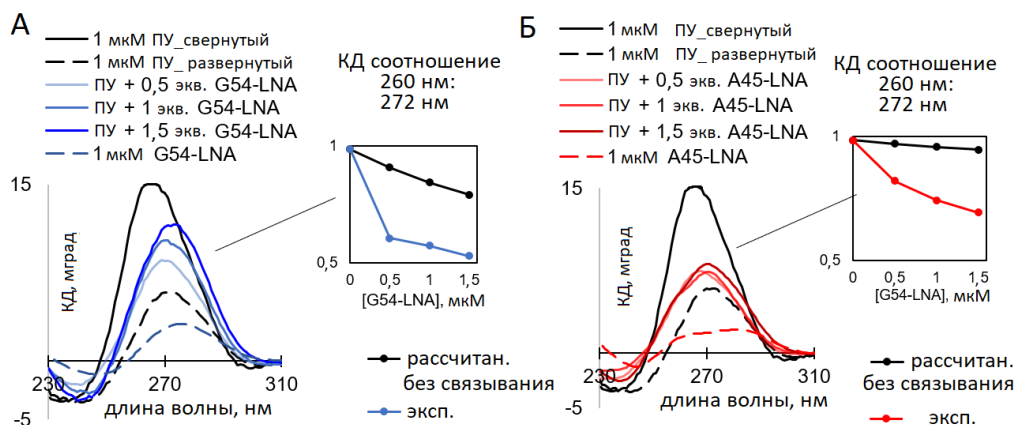
Затем мы провели те же анализы со всеми наборами АС ОН и проанализировали концентрационную зависимость для предварительной оценки значений  $EC_{50}$  (**Рисунок 2.2.25А**, средняя панель). АС ОН из набора CPS не смогли разрушить ПУ, за исключением



нацеленного на сайт 2 АС ОН CPS-3 с двумя близко расположенными остатками G-clamp (значение  $EC_{50}$  находилось в низком микромолярном диапазоне). Во всех наборах АС ОН, нацеленные на сайт 2, в целом превосходили АС ОН, нацеленные на сайт 1. Эта тенденция может быть результатом разницы в термической стабильности соответствующих дуплексов РНК-АС ОН или повышенной доступности сайта 2, учитывая, что стебель 2 образуется после стебля 3 при сворачивании ПУ [467]. LNA и LDL дали сопоставимые результаты (значения  $EC_{50}$  находились в субмикромолярном диапазоне), но A54-LNA немного превосходил A54-LDL. Репрезентативная электрофореграмма, иллюстрирующая эффекты LNA, показана на **Рисунке 2.2.25А**, правая панель, а электрофореграммы с другими АС ОН показаны на **Рисунке 2.2.26**. Эффекты LNA были дополнительно подтверждены с помощью теста с КД-титрованием, и результаты соответствовали ТИЭП (**Рисунок 2.2.27**). Хотя фракции расплетенного ПУ не могли быть оценены напрямую из-за вклада избытка LNA в эллиптичность, спектры смесей явно отличались от спектров, предсказанных для несвязанных ПУ и LNA, что подтверждает структурную перестройку ПУ при субмикромолярных концентрациях LNA.



**Рисунок 2.2.26.** ТИЭП ПУ в присутствии гэтмеров LNA-DNA-LNA (LDL) и фосфотиоатов (CPS), содержащих G-clamp, нацеленных на сайт 1 (синий) или сайт 2 (красный).



**Рисунок 2.2.27.** Проверка разрушения ПУ с помощью LNA методом КД-спектроскопии. Спектры регистрировали при титровании 1 мкМ ПУ растворами LDL, нацеленных на сайт 1 (синий) и сайт 2 (красный). Вынесенные графики иллюстрируют разницу между наблюдаемыми (экспериментальными) КД-изменениями при взаимодействии LNA-ПУ и предсказанными (расчетными) для смесей с несвязанными АС ОН.

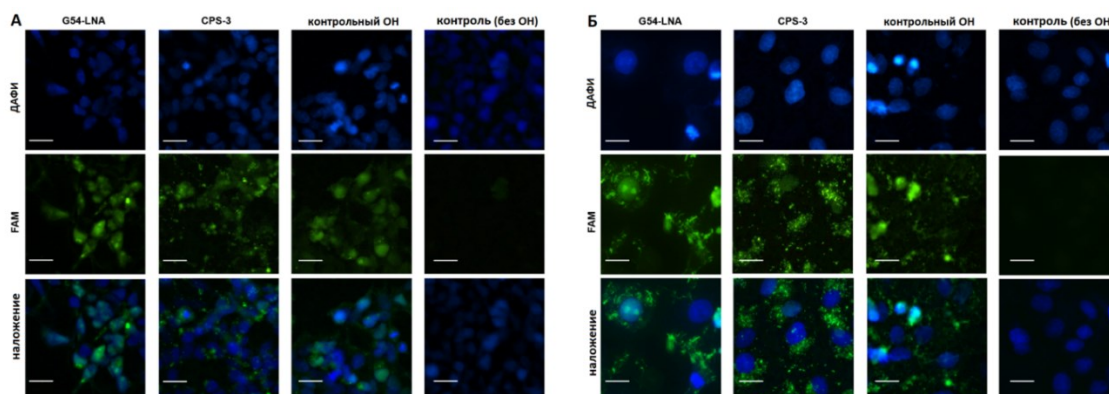
Способность АС ОН ингибировать PCPC оценивали с помощью двойного люциферазного теста (ДЛТ). Для этого мы трансфицировали клетки HEK-293T АС ОН и плазмидой дикого типа (ДТ), кодирующей две люциферазы (аттенуатор + сайт проскальзывания дикого типа + ПУ SARS-CoV-2 между генами люцифераз Renilla и Firefly) или IFC-плазмидой (положительный контроль с генами обеих люцифераз в одной рамке считывания) и рассчитывали эффективность PCPC на основе нормированной относительной активности люцифераз Firefly/Renilla в клеточных лизатах. В отсутствие АС ОН эффективность PCPC в образцах ДТ составила  $86 \pm 2\%$ , что хорошо согласуется с опубликованными данными [461], в то время как плазида отрицательного контроля SSmut с мутированным сайтом проскальзывания показала незначительный PCPC (**Рисунок 2.2.25Б**). Для первичного скрининга использовали АС ОН в концентрации 200 нМ. АС ОН A45-LNA, нацеленный на сайт 1, и АС ОН G54-LDL, CPS-3 и G54-LNA, нацеленные на сайт 2, вызывали статистически значимое снижение эффективности PCPC (**Рисунок 2.2.25В**). Случайная последовательность (SCR) [463] не оказала существенного влияния. АС ОН серии LDL уступали LNA, что качественно согласуется с данными ТИЭП. В соответствии с данными ТИЭП, АС ОН, нацеленные на сайт 2, превосходили АС ОН, нацеленные на сайт 1, с аналогичными модификациями. В частности, эффект G54-LNA (снижение эффективности PCPC на  $82 \pm 2\%$ ) был в 1,5 раза сильнее, чем у A45-LNA (снижение эффективности PCPC на  $50 \pm 10\%$ ). Поэтому в последующих исследованиях мы сосредоточились на АС ОН, нацеленных на сайт 2.

Относительные эффекты АС ON LNA и CPS в ДЛТ немного отличались от тех, которые наблюдались в ТИЭП. В частности, преимущество LNA над LDL гэлмерами было более выраженным, а CPS-3 превосходил G54-LDL (**Рисунок 2.2.25В**). Этот результат можно объяснить повышенной нуклеазной устойчивостью АС ОН с тотальной модификацией цепи (LNA и CPS) по сравнению с LDL гэлмерами. Для последующих экспериментов мы выбрали два полностью модифицированных АС ОН, вызывающих статистически значимые ( $p < 0,01$ ) изменения PCPC ДТ при концентрации 200 нМ (**Рисунок 2.2.25В**): G54-LNA и CPS-3. Важно отметить, что G54-LNA не оказывал существенного влияния на PCPC IFC, тогда как CPS-3 вызывал незначительное снижение PCPC ICF (**Рисунок 2.2.25Г**). Эти данные подтверждают, что расплетение ПУ является основным механизмом действия G54-LNA, тогда как CPS-3 может дополнительно активировать РНКазу H и вызывать разрушение мРНК в дополнение к расплетению ПУ. Эффекты обоих АС ОН показали концентрационную зависимость (**Рисунок 2.2.25Д**), но только G54-LNA был активен в среднем наномолярном диапазоне концентраций ( $EC_{50} \approx 26 \pm 9$  нМ).

Активность лидерных АС ОН G54-LNA и CPS-3 была дополнительно проверена на SARS-CoV-2 с использованием теста на цитопатический эффект (ЦПЭ). Для этого использовали экспрессирующие ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) клетки HEK-293T (HEK-293T-ACE2) и клетки глиобластомы GBM6138. Первая была выбрана в качестве одной из наиболее распространенной неопухолевой модельной клеточной линии в анализах SARS-CoV-2 [478]. Вторая линия была добавлена для учета предполагаемой восприимчивости раковых клеток к инфекции SARS-CoV-2 [479]. Клетки GBM6138 особенно восприимчивы к SARS-CoV-2 из-за недостаточной выработки интерферона первого типа и сверхэкспрессии ACE2 [480]. В будущем для комплексной характеристики АС ОН могут потребоваться дополнительные тесты с клетками, полученными из эпителия и/или легочной ткани. Однако такие клетки имеют тенденцию демонстрировать гетерогенность по уровням ACE2 или протеаз клеточной поверхности [481], тогда как модельные клеточные линии с эктопической экспрессией ACE2 обеспечивают воспроизводимое заражение.

Клетки трансфицировали АС или контрольным (SCR) ОН в конечных концентрациях до 200 нМ; затем их обрабатывали суспензией SARS-CoV-2 и инкубировали в течение 5 дней перед ЦПЭ-тестом. Параллельно с этим оценивали жизнеспособность незараженных клеток через 4 дня после трансфекции ОН. Внутриклеточную локализацию АС ОН исследовали с помощью флуоресцентной микроскопии через 24 часа после трансфекции с использованием 10% примесей 5'-FAM-меченных аналогов АС ОН. G54-LNA и контрольный ОН показали аналогичное внутриклеточное распределение: оба

локализовались в цитоплазме с периодическим попаданием в ядро в клетках НЕК-293Т-ACE2. CPS-3 ОН наблюдался только в цитоплазме (**Рисунок 2.2.28А**). В клетках глиобластомы все АС ОН накапливались в цитоплазме, но демонстрировали неравномерное распределение, что указывает на возможные нецелевые взаимодействия с клеточными белками или РНК (**Рисунок 2.2.28Б**).

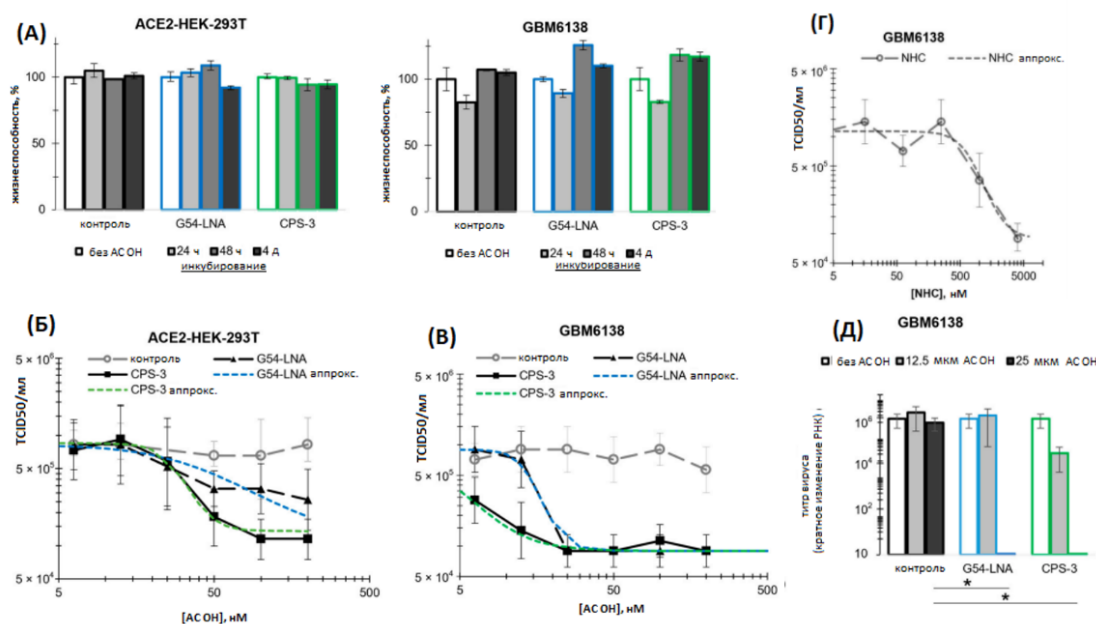


**Рисунок 2.2.28.** Распределение АС ОН в клетках HEK293T-ACE2 (А) и GBM6138 (Б). Масштаб: 20 мкм.

Ни один из ОН не показал статистически значимой токсичности по отношению к клеткам, экспрессирующим ACE2 (**Рисунок 2.2.29А**). В клетках ACE2-НЕК-293Т контрольный ОН оказывал незначительное влияние на репликацию SARS-CoV-2, тогда как АС ОН G54-LNA и CPS-3 снижали среднюю инфекционную дозу в культуре (TCID<sub>50</sub>) на  $\geq 50\%$  при концентрации 50 нМ ( $p < 0,05$  для CPS-3) (**Рисунок 2.2.29Б**). Значения IC<sub>50</sub> составляли  $50 \pm 30$  нМ (G54-LNA) и  $30 \pm 10$  нМ (CPS-3). В клетках GBM6138 (**Рисунок 2.2.29В**) оба АС ОН снижали TCID<sub>50</sub> на 85,5% при концентрации 25 нМ ( $p < 0,01$ ). Значения IC<sub>50</sub> составляли  $15 \pm 5$  нМ (G54-LNA) и  $4 \pm 3$  нМ (CPS-3). Оба АС ОН превосходили контрольный низкомолекулярный противовирусный агент *N*<sup>4</sup>-гидроксицитидин (ННС) [482], который показал умеренную активность в клетках GBM6138 (IC<sub>50</sub> =  $800 \pm 300$  нМ, **Рисунок 2.2.29Г**), сравнимую с активностью, наблюдавшейся ранее в различных клеточных линиях. [463,483]. Эффекты АС ОН в концентрациях  $>12$  нМ в клетках GBM6138 были дополнительно подтверждены с помощью кПЦР в реальном времени (**Рисунок 2.2.29Д**). Результаты качественно согласуются с ЦПЭ-тестами. Интересно, что активность CPS-3 в ЦПЭ-тестах с ACE2-НЕК-293Т была выше, чем активность, наблюдаемая в DLA (**Рисунок 2.2.25Д**), что указывает на то, что при этом могут иметь место дополнительные механизмы действия (например, активация РНКазы H).

Мы пришли к выводу, что лидерные АС ОН G54-LNA и CPS-3, выбранные на основе ТИЭП и ДЛТ, ингибируют репликацию вируса при субтоксических концентрациях в

наномолярном диапазоне в HEK-293T-ACE2 и GBM6138. Противовирусная активность CPS-3 должна быть результатом комбинации ингибирования PCPC и активации РНКазы Н или некоторых других механизмов, тогда как активность G54-LNA можно объяснить исключительно ингибированием PCPC. Будущие исследования, включая иммуноблоттинг, необходимы для получения убедительных доказательств доминирующего механизма, особенно в случае CPS-3.



**Рисунок 2.2.29.** Токсичность и противовирусная активность АС ОН. (А) Токсичность АС ОН в отношении ACE2-экспрессирующих клеток HEK-293T-ACE2 (слева) и клеток глиобластомы GBM6138 (справа). Процент метаболически активных клеток (жизнеспособность) оценивали на основе присутствия АТФ через 24 часа, 48 часов или 4 дня после трансфекции АС ОН или контрольных растворов. (Б) Противовирусная активность АС ОН в клетках HEK-293T-ACE2. Прямой титр вируса. (В) Противовирусная активность АС ОН в клетках GBM6138. Вторичный титр вируса. (Г) Противовирусная активность контрольного низкомолекулярного соединения  $N^4$ -гидроксцитидина (ННС) в клетках GBM6138. Вторичный титр вируса. Медианную инфекционную дозу в культуре ткани (TCID<sub>50</sub>) в (Б-Г) оценивали на основе ЦПЭ в клетках, трансфицированных АС ОН или контрольными растворами через 5 дней после заражения суспензией SARS-CoV-2, штаммом P1K35 (прямой титр вируса) или аликвотами среды, собранной из инфицированных клеток (титр вторичного вируса). Эксперименты проводили в 2 биологических повторах по 3 повторности каждый. (Д) Проверка противовирусного действия АС ОН в выбранных концентрациях с использованием кПЦР в реальном времени. Титр вируса оценивали методом ΔCt после экстракции РНК из образцов в (В). \*  $p$ -значение < 0,05, двусторонний критерий Стьюдента.

Таким образом, мы провели дизайн, синтезировали и изучили свойства трех типов АС ОН против SARS-CoV-2, нацеленных на разрушение структур стебель-петля 2/3 вирусного ПУ и расплетение всего ПУ. АС ОН CPS-3 и G54-LNA, нацеленные на стебель 2 (**Рисунок 2.2.24Б**), расплетают ПУ (**Рисунок 2.2.25А** и **Рисунок 2.2.26**), ингибируют РСРС (**Рисунок 2.2.25Д**) и снижают репликацию вируса при наномолярных концентрациях в клетках HEK293T-ACE2 и GBM6138 (**Рисунок 2.2.29Б** и **В**). Они превосходили аналогичные АС ОН, нацеленные на предположительно менее доступный стебель 3, во всех анализах *in vitro* (**Таблица 2.2.9**, **Рисунок 2.2.25** и **Рисунок 2.2.26**). Этот результат подтверждает важность рационального выбора мишени для АС ОН.

Гэпмер G54-LDL, нацеленный на стебель 2, расплетал ПУ так же эффективно, как G54-LNA в ТИЭП (**Рисунок 2.2.25А**), но не смог предотвратить РСРС в люциферазных тестах (**Рисунок 2.2.25В**), предположительно из-за недостаточной устойчивости к действию нуклеаз. Этот результат указывает на важность полной модификации остова АС ОН.

АС ОН CPS-3, модифицированный двумя вставками G-clamp и содержащий полностью модифицированный фосфоротиоатный остов, показал лишь умеренный потенциал расплетения ПУ (**Рисунок 2.2.25А**) и уступал G54-LNA в люциферазных тестах (**Рисунок 2.2.25Д**), но в конечном итоге превзошел G54-LNA в клетках, подвергшихся воздействию живого вируса (**Рисунок 2.2.29**). Этот результат можно объяснить тем фактом, что, в отличие от LNA, ОН CPS может активировать РНКазу H, что подчеркивает преимущества противовирусных препаратов двойного действия.

Хотя для окончательного выяснения молекулярных механизмов в основе ингибирования репликации SARS-CoV-2, требуются дальнейшие исследования, можно констатировать перспективность таргетирования доступного элемента ПУ – стебля 2 – аналогами ОН. Таким образом, разработаны два АС ОН CPS-3 и G54-LNA, являющиеся эффективными противовирусными агентами *in vitro* с наномолярными значениями IC<sub>50</sub>, которые могут рассматриваться в качестве кандидатов в терапевтические средства.

В результате приведенных в разделе исследований:

- проведен дизайн и синтез специфичных и эффективных стабилизаторов G4 на основе 1,3-диаза-2-оксофеноксазинового каркаса с повышенной цитотоксичностью для опухолевых клеток *in vitro*;
- осуществлены скрининг аналогов хромофора GFP на способность стабилизировать уникальную двухмодульную ДНК-мишень LTR-III G4 из генома ВИЧ-1 и выявлено высокоспецифичное соединение, обладающее анти-ВИЧ активностью *in vitro*;

- проведен дизайн антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих остатки G-clamp или конформационно-запертых нуклеиновых кислот (LNA), которые способны расплетать псевдоузел в геномной РНК SARS-CoV-2 и подавлять репликацию вируса *in vitro*.

### 2.3. Химическая модификация иМ для создания рН-сенсоров и систем скрининга низкомолекулярных модуляторов стабильности иМ

Рассмотренная выше регуляция термической стабильности G4 и ПУ с использованием производных оксофеноксазина нашла применение в дизайне потенциальных терапевтических агентов. В текущем разделе представлено использование феноксазиновых производных как регуляторов стабильности и репортеров сворачивания иМ. Модифицированные таким образом иМ находят применение в качестве рН-сенсоров и систем скрининга лигандов. Идея встраивания оксофеноксазинового нуклеозидного аналога в иМ опирается на более ранние исследования эффектов подобных нуклеозидных аналогов в дуплексах, поскольку ядро иМ представляет собой интеркалированные параллельные дуплексы.

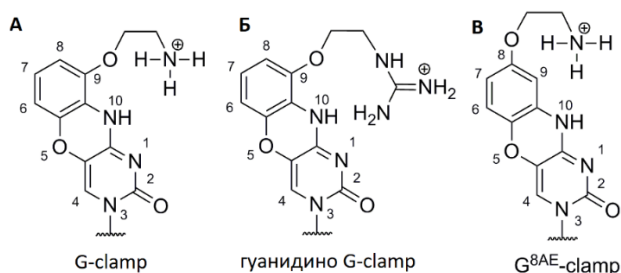
Данный раздел написан по результатам совместной работы автора с коллективом лаборатории структуры и функций биополимеров (Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства, Москва), а также Т.С. Зацепиным (химический факультет МГУ, Москва), А.В. Головиным (факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ, Москва) и Е.С. Беляевым (Институт физической химии и электрохимии имени А. Н. Фрумкина РАН, Москва): Bioorg. Med. Chem. 2017. № 25. С. 3597–3605; Nucleic Acids Res. 2018. № 46. С. 2751–2764; Comput. Struct. Biotechnol. J. 2019. № 17. С. 527–536; Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. № 47. С. 1351–1354; Biosens. Bioelectron. 2021. № 175. 112864; ACS Sens. 2023. № 8. С. 619–629; Sens. Actuators B Chem. 2024. № 411. С. 135747; Bioorg. Med. Chem. Lett. 2025. № 25. 130131 и Analyst. 2021. № 146. С. 4436–4440.

При этом, в данном разделе лично и под руководством автора или при его участии выполнены все описанные в разделе эксперименты, за исключением молекулярно-динамических исследований, выполненных А.В.Головиным.

9-(2-Аминоэтоксид)-1,3-диаза-2-оксофеноксазиновый (G-clamp) остаток (**Рисунок 2.3.1А**) в составе ОДН демонстрирует превосходную специфичность по отношению к комплементарному гуанину и значительно стабилизирует дуплексы за счет повышения эффективности стэкинг-взаимодействий оснований и образования дополнительной водородной связи между протонированной аминоэтоксид группой и оксогруппой гуанина [13]. ОДН, содержащие G-clamp, обладают повышенной устойчивостью к действию нуклеаз, демонстрируют более эффективное проникновение в клетку и более выраженную антисмысловую активность *in vitro* [9,10,18], а также могут образовывать стабильные дуплексы с параллельной ориентацией цепей [484]. Гуанидино-G-clamp модификация



(Рисунок 2.3.1Б), в которой аминоэтоксигруппа заменена на гуанидиноэтоксигруппу, обеспечивающую образование пяти водородных связей, показала аналогичный стабилизирующий эффект [16,17,438]. Ввиду перспективности подобных модификаций для создания молекулярных инструментов [18,485], мы решили разработать схему синтеза, получить и изучить физико-химические свойства аналога G-clamp-нуклеотида, содержащего аминоэтоксигруппу не в 9, а в 8 положении 1,3-диаза-2-оксофеноксазинового кольца и названного нами  $G^{8AE}$ -clamp (Рисунок 2.3.1В).



**Рисунок 2.3.1.** Описанные ранее G-clamp (А) и гуанидино-G-clamp (Б) и новая  $G^{8AE}$ -clamp (В) модификации нуклеиновых оснований.

Классический подход к синтезу G-clamp-нуклеотида начинается с активации 4-карбонильной группы в 3',5'-O-ацетил-5-бром-2'-дезоксисуридине с помощью  $PPh_3$  и  $CCl_4$  с последующим замещением атома хлора в 4 положении на 2,6-дигидроксианилин в присутствии основания [13]. Однако нам не удалось использовать этот подход для замещения C4-активированного нуклеозидного производного 2,5-дигидроксианилином [486] из-за быстрого окисления последнего в основных условиях. Для решения этой проблемы мы решили получить более стабильное замещенное производное. Мы начали с нитрования 4-(2-бромэтоксифенола) **1.1.80** [487] в мягких условиях (56%-ная азотная кислота в бензоле при 0°C) (Схема 2.3.1). Каталитическое гидрирование соединения **1.1.81** давало соответствующий анилин **1.1.82**. Данная схема позволила получить аминопроизводное **1.1.82**, значительно более стабильное в основных условиях, чем 2,5-дигидроксианилин, и одновременно ввести функциональную группу для последующего получения из нее маскированной аминоэтоксигруппы. Далее 3',5'-O-ацетил-5-бром-2'-дезоксисуридин **1.1.83** подвергали взаимодействию с 1,2,4-триазолом/ $POCl_3$  с образованием триазилил-модифицированного производного **1.1.84**. Замещение триазольной группы в **1.1.84** анилиновым производным **1.1.82** в присутствии ДИПЭА приводило к **1.1.85**. Производное **1.1.86** получали обработкой **1.1.85** азидом натрия в ДМФА с последующим удалением ацетильных защитных групп с гидроксидом аммиака в водном метаноле. Мы сравнили условия циклизации для получения феноксазинового производного **1.1.87** ( $KF/C_2H_5OH$  [14],  $CsF/Cs_2CO_3/C_2H_5OH$  [488] и ТЭА/ $C_2H_5OH$  [21]) и обнаружили, что

последний вариант дает наибольший выход. За стандартной методикой введения 5'-диметокситритильной защитной группы в пиридине с получением **1.1.88** следовало восстановление азидогруппы и введение трифторацетильной защиты. Фосфитилирование производного **1.1.89** позволило получить целевой фосфорамидит **1.1.90**, который был использован в автоматизированном твердофазном синтезе модифицированных ОДН. После стандартного удаления защитных групп и удаления с подложки аммиаком ОДН очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ (Таблица 2.3.1).

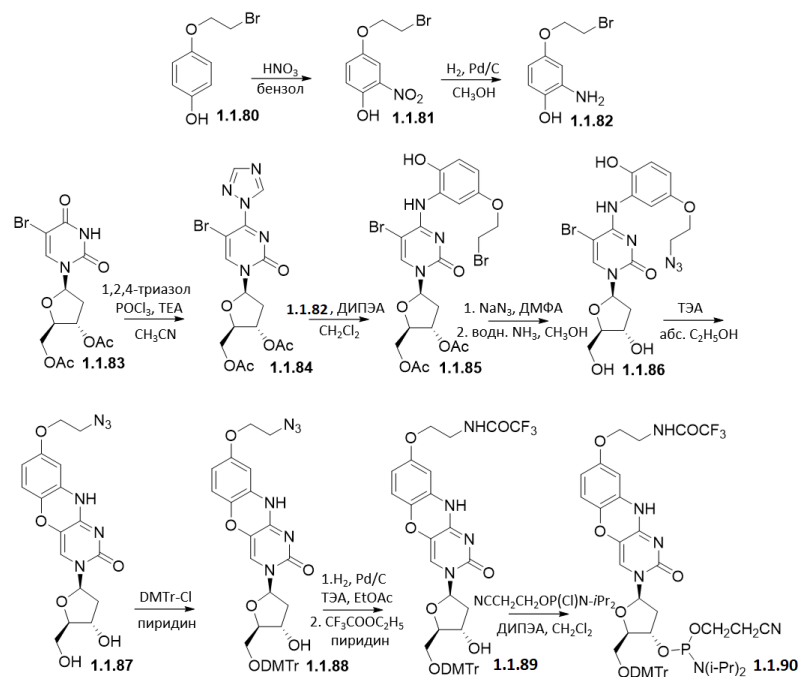


Схема 2.3.1. Синтез целевого фосфорамидита **1.1.90**.

Таблица 2.3.1. Последовательности модифицированных ОДН и влияние фланкирующих G<sup>8AE</sup>-clamp нуклеиновых оснований на термическую стабильность ДНК/ДНК дуплексов.<sup>б</sup>

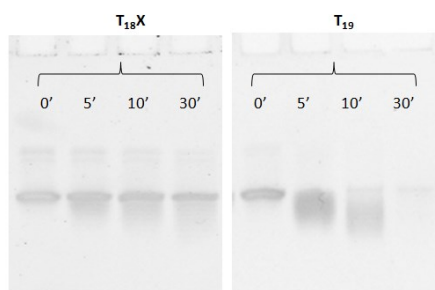
| шифр  | Последовательность 5'→3'         | $T_{пл}, \pm 0,5, (^{\circ}\text{C})$ | $\Delta T_{пл} (^{\circ}\text{C})^{\text{в}}$ |
|-------|----------------------------------|---------------------------------------|---|
| ОДН1  | TTTTTTTTTTTTTTTTT <sup>а</sup> X | -                                     | -   |
| ОДН2  | TCTCXCTCTC                       | -                                     | -   |
| ОДН3  | GCACXCTACG                       | 61,5                                  | 10,5  |
| ОДН4  | GCACYCTACG                       | -                                     | -   |
| ОДН5  | GCAAXATACG                       | 47,5                                  | 1,5   |
| ОДН6  | GCAAXCTACG                       | 50,5                                  | 3,0   |
| ОДН7  | GCACXATACG                       | 56,0                                  | 9,5   |
| ОДН8  | GCACXGTACG                       | 60,0                                  | 7,5   |
| ОДН9  | GCAGXCTACG                       | 55,0                                  | 2,5   |
| ОДН10 | GCAGXGTACG                       | 57,5                                  | 3,0   |
| ОДН11 | GCATXTTACG                       | 51,0                                  | 7,5   |

<sup>а</sup> X и Y представляют собой G<sup>8AE</sup>-clamp- и G-clamp-нуклеотид соответственно.

<sup>б</sup> Все эксперименты проводили при концентрации дуплекса 5 мкМ в 5 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,2), 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 140 мМ буфере KCl.

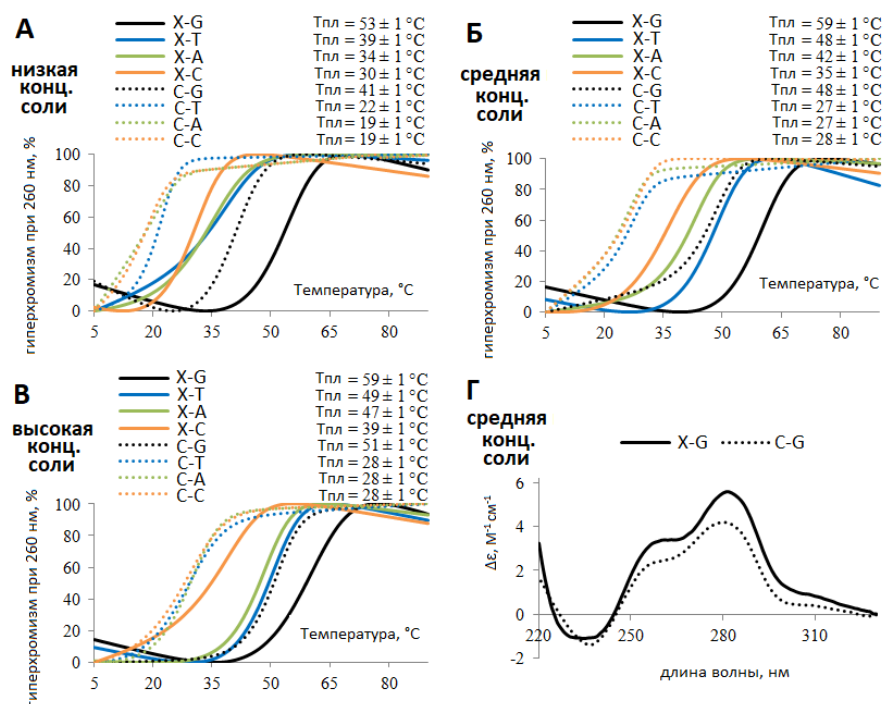
<sup>в</sup> Разница между значениями  $T_{пл}$  модифицированных G<sup>8AE</sup>-clamp и немодифицированных дуплексов. Значения  $T_{пл}$  немодифицированных дуплексов взяты из литературы [5].

Важным аспектом применения олигонуклеотидов *in vitro* и *in vivo* является их стабильность в биологических жидкостях. Ранее было показано, что введение единичной G-clamp модификации на 3'-конец полностью защищает ОДН от действия 3'-экзонуклеазы [10]. Последующие исследования показали, что G-clamp-содержащие ОДН дают умеренный нокдаун мРНК *in vivo* [19]. Однако устойчивость к действию 3'-экзонуклеаз необходима не только в терапии с использованием ОДН, но и для некоторых стратегий амплификации ДНК, таких как использование полимеразы phi29, обладающей нуклеазной активностью [489,490]. В связи с этим, мы исследовали влияние включения одиночной G<sup>8AE</sup>-clamp модификации на 3'-конец ОДН1 T18X на ферментативную стабильность ОДН в отношении фосфодиэстеразы змеиного яда (ФДЗЯ). Период полураспада ОДН1 превышал 30 минут, тогда как немодифицированный 19-мерный олиготимидилат T19 полностью расщеплялся в течение 5 минут (**Рисунок 2.3.2**).



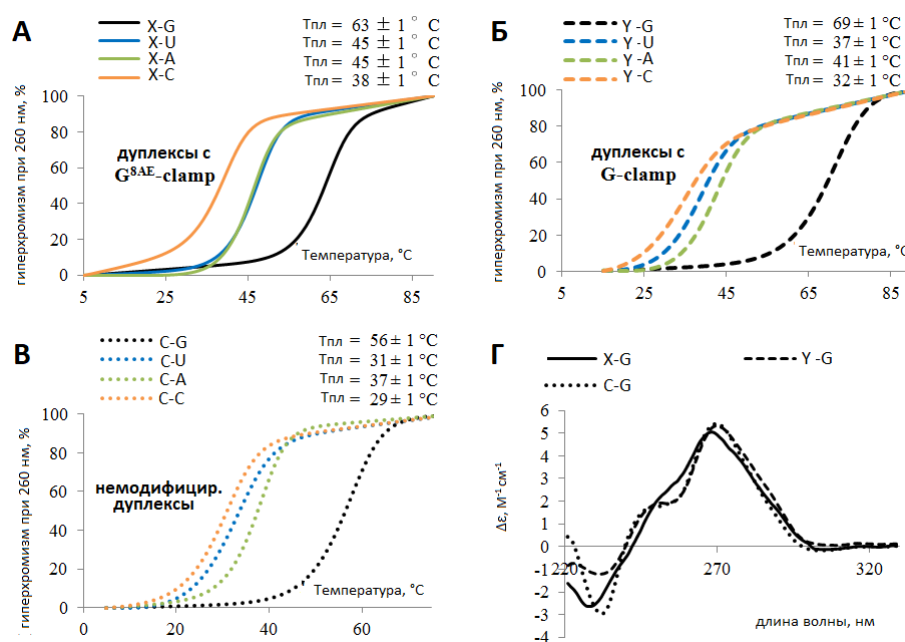
**Рисунок 2.3.2.** Гидролиз ОДН1 T18X (X = G<sup>8AE</sup>-clamp) и немодифицированного T19 фосфодиэстеразой змеиного яда (ФДЗЯ).

Затем, мы изучили гибридизационные свойства ОДН, модифицированного остатком G<sup>8AE</sup>-clamp, в составе дуплексов с комплементарными ДНК и РНК. Для серии ДНК/ДНК-дуплексов мы синтезировали ОДН2 (**Таблица 2.3.1**) и изучили влияние X на стабильность дуплексов, в которых напротив модификации расположен остаток G, T, A или C. Кривые плавления ДНК/ДНК-дуплексов представлены на **Рисунке 2.3.3А-В**.



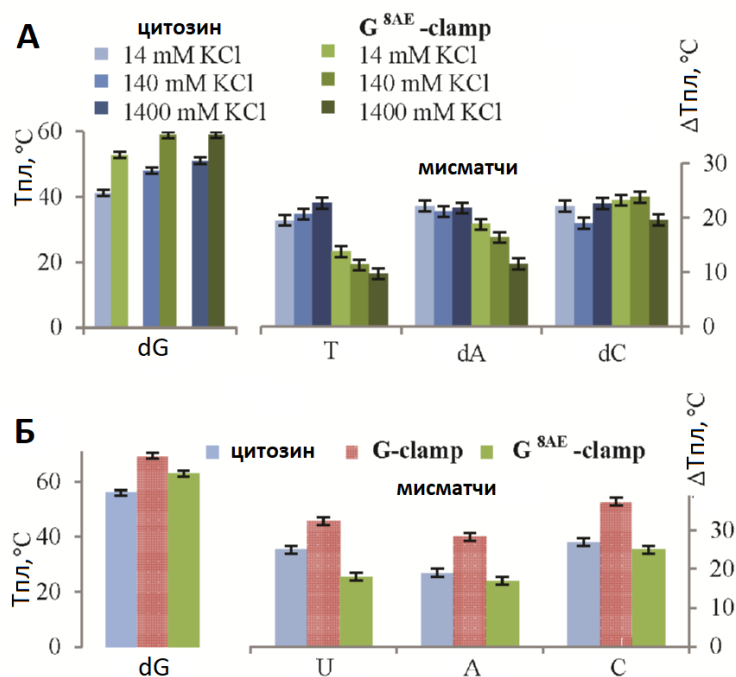
**Рисунок 2.3.3.** Кривые плавления (А-В) полностью комплементарных ДНК/ДНК-дуплексов и ДНК/ДНК-дуплексов с однонуклеотидными заменами и КД-спектры (Г) полностью комплементарных дуплексов. Условия: 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,2), 1 mM MgCl<sub>2</sub> и 14 (А), 140 (Б, Г) или 1400 (В) mM KCl. Концентрация дуплекса составляла 2,5 мкМ. КД-спектры регистрировали при 15 °C, молярная эллиптичность указана на моль нуклеотидов. Полностью комплементарный дуплекс, черный; однонуклеотидная замена на Т, синий; однонуклеотидная замена на А, зеленый; однонуклеотидная замена на С, оранжевый.

Для серии гибридных ДНК/РНК-дуплексов мы синтезировали ОДН, которые содержат остаток G<sup>8AE</sup>-clamp (ОДН3) или G-clamp (ОДН4); кривые плавления гибридных дуплексов представлены на **Рисунке 2.3.4А-В**.



**Рисунок 2.3.4.** Кривые плавления (А-В) полностью комплементарных гибридных ДНК/РНК-дуплексов и гибридных ДНК/РНК-дуплексов с однонуклеотидными заменами и КД-спектры (Г) полностью комплементарных гибридных (ДНК/РНК) дуплексов. Условия: 5 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,2), 1 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 14 мМ  $\text{KCl}$ . Концентрация дуплекса составляла 5 мкМ. КД спектры зарегистрированы при 15 °С, молярная эллиптичность указана на моль нуклеотидов. Полностью комплементарный дуплекс, черный; однонуклеотидная замена на Т, синий; однонуклеотидная замена на А, зеленый; однонуклеотидная замена на С, оранжевый.

Влияние  $\text{G}^{8\text{AE}}$ -clamp модификации на распознавание однонуклеотидных замен (как в ДНК/ДНК, так и в гибридных сериях); эффекты ионной силы (в сериях ДНК/ДНК) и сравнение с G-clamp (в сериях ДНК/РНК) представлены на **Рисунке 2.3.5**.



**Рисунок 2.3.5.** Гибридизация модифицированных ОДН с комплементарными цепями ДНК и РНК. Анализ эффектов ионной силы и чувствительности к однонуклеотидным заменам. (А) ДНК-дуплексы, содержащие остаток цитозина (синий) или  $G^{8AE}$ -clamp (зеленый). Условия: 5 мМ  $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$  (pH 7,2), 1 мМ  $MgCl_2$  и 14, 140 или 1400 мМ KCl. Концентрация дуплекса составляла 2,5 мкМ. (Б) Гибридные дуплексы, содержащие остаток цитозина (синий), G-clamp (красный) или  $G^{8AE}$ -clamp (зеленый). Условия: 5 мМ  $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$  (pH 7,2), 1 мМ  $MgCl_2$  и 14 мМ KCl. Концентрация дуплекса составляла 5 мкМ.

Введение одного  $G^{8AE}$ -clamp остатка повышало стабильность ДНК-дуплекса на  $12 \pm 1$ ,  $11 \pm 1$  и  $8 \pm 1^\circ C$  при низкой, средней и высокой ионной силе соответственно (**Рисунок 2.3.5А**, левая панель). Такая зависимость стабилизирующего эффекта от концентрации соли позволяет предположить, что этот эффект можно, по крайней мере частично, объяснить ионными взаимодействиями, например, взаимодействиями между протонированной аминоэтоксигруппой и отрицательно заряженными фосфатными группами в комплементарной цепи. Действительно, стабилизация, вызванная  $G^{8AE}$ -clamp, является наиболее значимой, когда концентрация KCl недостаточна для полной маскировки анион-анионного отталкивания между фосфатами. Стабилизация, вызванная G-clamp, напротив, не зависит от концентрации соли [13], поэтому считается, что его орто-аминоэтоксигруппа участвует только в образовании водородной связи с остатком гуанина, а не в ионных взаимодействиях с окружением.

Если бы решающую роль играли взаимодействия между мета-аминоэтоксигруппой  $G^{8AE}$ -clamp и отрицательно заряженными фосфатными группами, то можно было бы

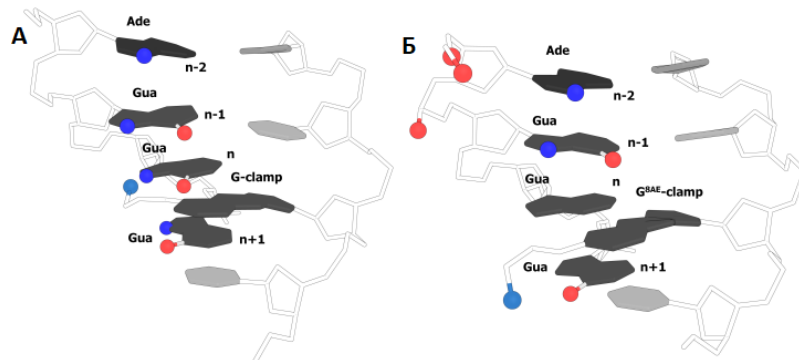
ожидать снижения способности  $G^{8AE}$ -clamp дискриминировать гуанин от других азотистых оснований. Детальный анализ дуплексов с однонуклеотидными заменами выявил более сложную картину (**Рисунке 2.3.5А**, правая панель).  $G^{8AE}$ -clamp модификация улучшила чувствительность к однонуклеотидной замене  $dG \rightarrow dC$  при низкой ( $\Delta T_{пл} dG \rightarrow dC = 22^\circ C$  и  $23^\circ C$  для немодифицированного и модифицированного дуплексов соответственно) и средней ( $\Delta T_{пл} dG \rightarrow dC = 19^\circ C$  и  $24^\circ C$  для немодифицированного и модифицированного дуплексов соответственно) ионной силе раствора. Однако модификация оказала негативное влияние на чувствительность к однонуклеотидным заменам  $dG \rightarrow T$  и  $dG \rightarrow dA$ . Следует отметить, что чувствительность  $G^{8AE}$ -clamp ко всем однонуклеотидным заменам снижалась с увеличением ионной силы.

В ДНК/РНК-гибридах, которые анализировали при низкой ионной силе раствора (**Рисунке 2.3.5Б**, левая панель),  $G^{8AE}$ -clamp увеличивал стабильность дуплекса на  $7^\circ C$ , тогда как эффект G-clamp был более выраженным ( $+13^\circ C$ ). По уровню дискриминации азотистых оснований (**Рисунке 2.3.5Б**, правая панель)  $G^{8AE}$ -clamp уступал G-clamp.

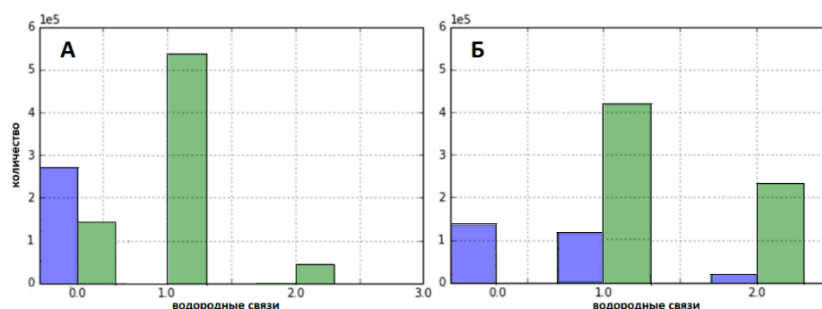
Для объяснения полученных результатов мы провели молекулярно-динамическое (МД) моделирование дуплексов, содержащих ОДН3 и ОДН4 с остатком  $G^{8AE}$ -clamp или G-clamp соответственно, и изучили возможность образования водородных связей между протонированной аминоэтоксигруппой, расположенной в мета- ( $G^{8AE}$ -clamp) или орто- (G-clamp) положении 1,3-диаза-2-оксофеноксазинового кольца, и окружающими акцепторами водородных связей. Следует отметить, что все траектории были стабильными, области выборки были близки к канонической В-форме, ожидаемый характер водородных связей сохранялся.

При исследовании термодинамических свойств  $G^{8AE}$ -clamp мы наблюдали некоторую зависимость стабилизирующего эффекта от концентрации соли. Действительно, МД моделирование показало, что протонированная аминоэтоксигруппа  $G^{8AE}$ -clamp обладает способностью участвовать в ионных взаимодействиях с отрицательно заряженными атомами кислорода фосфатных групп (Ade (n-2), Gua (n-1)) (**Рисунок 2.3.6**). Тогда так протонированная аминоэтоксигруппа как в орто- (G-clamp), так и в мета- ( $G^{8AE}$ -clamp) положении может образовывать водородные связи практически с одними и теми же акцепторами водородных связей в комплементарной цепи, данная группа в G-clamp преимущественно взаимодействует с  $O^6$  атомом комплементарного гуанина, но также может обеспечивать дополнительную стабилизацию за счет вторичных взаимодействий с доступными акцепторами водородных связей в соседних гуанинах (**Рисунок 2.3.7**). В свою очередь, данная группа в  $G^{8AE}$ -clamp никогда не образует водородных связей с комплементарным гуанином, но может взаимодействовать с  $O^6$  и  $N^7$  атомами соседних

гуанинов. В совокупности эти данные позволяют предположить, что дискриминирующие свойства  $G^{8AE}$ -clamp предположительно определяются взаимодействиями феноксазиновой системы. Наконец, склонность к образованию водородных связей с акцепторами водородных связей в комплементарной цепи заметно меньше у  $G^{8AE}$ -clamp, что отражает меньшую энергию взаимодействий для аминоэтоксигруппы в мета-положении феноксазиновой системы.



**Рисунок 2.3.6.** Снимки тракта 5'CXCT·3'GGGA, полученные методом молекулярной динамики, где X представляет собой G-clamp- (A) или  $G^{8AE}$ -clamp- (Б) нуклеотид (атомы кислорода красные, атомы азота синие и аммониевая группа голубая).

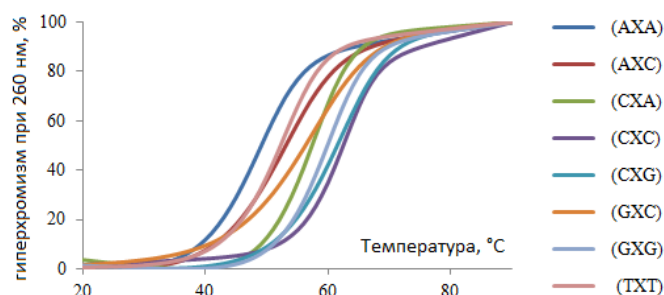


**Рисунок 2.3.7.** Гистограммы распределения водородных связей по траекториям МД-моделирования группы  $NH_3^+$  только с нуклеиновым основанием Gua в комплементарной цепи (A) и со всей комплементарной цепью (Б) (G-clamp (зеленый) и  $G^{8AE}$ -clamp (фиолетовый)).

КД-спектры модифицированных дуплексов аналогичны спектрам немодифицированных дуплексов (Рисунок 2.3.3Г и Рисунок 2.3.4Г). Положительные полосы при 280 нм и отрицательные полосы при 240 нм в спектрах ДНК-дуплексов типичны для канонической В-формы, тогда как незначительные положительные полосы при 260 нм могут быть результатом относительно большого содержания G/C-пар в ОДН [320]. Спектры гибридных ДНК/РНК-дуплексов сильно напоминают А-форму РНК [491]. КД-данные демонстрируют, что введение модификации в ОДН существенно не нарушает геометрию спирали.



Для выяснения влияния фланкирующих оснований на стабилизирующий эффект модификации мы синтезировали дополнительную серию ОДН с последовательностями, которые использовались ранее в исследованиях G-clamp [5]. G<sup>8AE</sup>-clamp вызывал меньшую стабилизацию, чем G-clamp (Таблица 2.3.1, Рисунок. 2.3.8), но эффекты классической и новой модификаций показали разные зависимости от соседних азотистых оснований. Например, относительный порядок термостабильностей дуплексов с G-clamp (CXC>CXG>GXC>GXG>CXA>TXT>AXC>AXA) [5] отличался от такового для G<sup>8AE</sup>-clamp модификации (CXC>CXG>GXG>CXA> GXC>TXT>AXC>AXA). 5'-фланкирующие нуклеиновые основания в целом оказывали большее влияние, чем 3'-фланкирующие, при этом 5'-С был наиболее выгодным вариантом как в серии G<sup>8AE</sup>-clamp (полученные нами данные), так и в G-clamp серии (по литературным данным [5]). Вероятно, это связано с эффективным стэкингом G-clamp остатков с 5'-цитозином.



**Рисунок. 2.3.8.** Кривые плавления ДНК-дуплексов с различными фланкирующими G<sup>8AE</sup>-clamp нуклеиновыми основаниями. Условия: 5 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 140 мМ KCl буфер, pH 7,2. Концентрации дуплекса составляли 5 мкМ.

Подводя итог этой части, можно сказать, что перемещение протонированной аминоэтоксигруппы из орто- в мета-положение в феноксазиновой системе привело к умеренным значениям  $\Delta T_{пл}$  для ДНК/РНК- и ДНК/ДНК-дуплексов, что, по-видимому, обусловлено меньшей вовлеченностью заряженной аминоэтоксигруппы G<sup>8AE</sup>-clamp в образование водородных связей с акцепторами в комплементарной цепи. С другой стороны, с помощью МД моделирования показано, что данная группа может участвовать во взаимодействиях с фосфатными группами в комплементарной цепи. Полученные данные были учтены при последующей разработке иМ-стабилизирующих нуклеотидных модификаций.

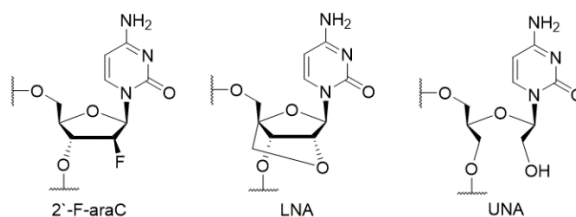
иМ представляют собой неканонические ДНК-структуры, богатые остатками цитозина, состоящие из интеркалированных параллельных дуплексов, которые удерживаются вместе гемипротонированными парами оснований цитозин-цитозин [492]. Хотя существование таких структур *in vivo* является спорным [47], области, потенциально

способные образовывать иМ, обнаружены в теломерных участках генома человека, центромерных участках и промоторах онкогенов. Эти данные указывают на возможные регуляторные функции таких областей и делают их привлекательными потенциальными мишенями для разработки лекарственных средств [47,114,115,493,494].

иМ имеют разнообразные применения в бионанотехнологии и медицинской химии, например, в наномоторах, приводимых в движение изменениями pH, гидрогелях и носителях лекарственных средств [495,496]. В аналитической химии иМ используются в качестве зондов для обнаружения низкомолекулярных лигандов, катионов и белков, а наиболее простым применением является разработка pH-сенсоров [497]. Сенсоры обычно разрабатывают для оптического обнаружения и включают флуоресцентно меченные по концам иМ [498], либо иМ с заменами остатков цитозина на его флуоресцентные миметики [499,500]) и конъюгаты иМ с наночастицами [501].

Немодифицированные иМ обычно стабильны в относительно узком диапазоне pH 3–6,5. За пределами этого диапазона цитозины либо все протонированы, либо все депротонированы, и гемипротонированные пары теоретически не образуются. Однако геномные исследования свидетельствуют о том, что часть иМ стабильна в физиологических условиях [44]. Это связано с тем, что  $pK_a$  цитозина в ядре иМ фактически отличается от  $pK_a$  свободного нуклеинового основания (4,5) и зависит от множества факторов, включая размер ядра [43], тип и количество оснований в петлях [502] и дополнительные структурные элементы, такие как шпильки или малобороздочные тетрады [503]. Все эти факторы могут влиять как на точку перехода  $pH_{1/2}$  (значения pH, при котором половина ОДН свернута в иМ), так и на кооперативность сворачивания иМ, что открывает возможности для настройки свойств молекулярных устройств на основе иМ [504].

Важным и широко используемым подходом к модуляции стабильности иМ является химическая модификация нуклеиновых кислот. На сегодняшний день предложено несколько модификаций для стабилизации иМ, таких как (i) модификации оснований (5-метилцитозин, урацил и 5-(1-пропинил)урацил в составе 2'-дезоксинуклеотидов [505]); (ii) модификации сахарных остатков (2'-деокси-2'-фторрибоцитидин [506], 2'-арабиноцитидин [507], 2'-деокси-2'-фторарабиноцитидин (2'-F-araC) [508], конформационно-запертые нуклеиновые кислоты (LNA) [509,510] и нуклеиновые кислоты, разомкнутые по сахарному остатку (UNA) [511]) и (iii) фосфатные модификации (фосфорамидат, метилфосфонат и фосфоротиоат [505,512]). Среди них наиболее перспективными выглядят LNA, 2'-F-araC и UNA (**Рисунок 2.3.9**).



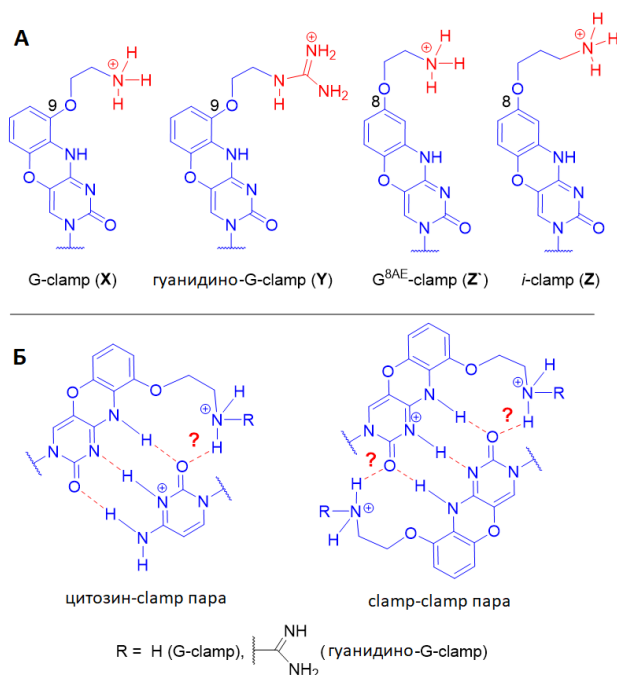
**Рисунок 2.3.9.** Структуры иМ-стабилизирующих химических модификаций.

Однако каждая известная модификация имеет свои ограничения. LNA стабилизирует иМ только при кислом pH и демонстрирует стабилизацию, зависящую от положения. Напротив, 2'-F-araC проявляет иМ-стабилизирующий эффект при кислых и, что наиболее важно, нейтральных значениях pH без выраженной позиционной зависимости, а также значительно смещает значения  $pH_{1/2}$  до 0,8. Однако стабилизирующий эффект обеих модификаций не превышает 4°C на модификацию, и для достижения значительной стабилизации требуется несколько вставок. Что касается UNA, то введение ее в петли приводит к увеличению  $T_{1/2}$  до 5°C, но модификации ядра иМ вызывает резкую дестабилизацию.

Таким образом, новые модификации иМ, способные обеспечивать значительную термическую стабилизацию иМ и позволяющие направленно смещать его  $pH_{1/2}$ , могла бы найти применение в разработке молекулярных инструментов, таких как, например, pH-сенсоры.

Мы решили проверить, будет ли G-clamp модификация стабилизировать иМ. Мы рассмотрели возможности образования гемипротонированных пар цитозин-clamp и clamp-clamp для остатков G-clamp и гуанидино-G-clamp (**Рисунок 2.3.10**).

Нуклеотид на основе 1,3-диаза-2-оксофеноксазина ( $tC^O$ ) без специфичной для G-clamp аминоэтоксигруппы вызывает незначительную дестабилизацию при введении в ядро иМ [8]. В случае G-clamp и гуанидино-G-clamp можно ожидать стабилизацию за счет образования дополнительной водородной связи между протонированной амино(гуанидино)этоксигруппой clamp и оксогруппой цитозина/clamp в противоположной цепи (**Рисунок 2.3.10Б**). Аналогичные взаимодействия данной группы с оксогруппой остатка гуанина в противоположной цепи наблюдались в дуплексах с G-clamp [5,13]. Альтернативно, заряженная (т.е. протонированная) группа может образовывать водородные связи с фосфодиэфирными фрагментами комплементарной цепи, как это продемонстрировано нами выше для  $G^{8AE}$ -clamp-модифицированного ДНК-дуплекса.



**Рисунок 2.3.10.** Структуры clamp-модификаций (А) и предполагаемые гемипротонированные пары цитозин-clamp (слева) и clamp-clamp (справа) в иМ (Б).

Мы синтезировали ряд немодифицированных и модифицированных ОДН, способных образовывать как внутримолекулярную ( $U_0$  и его производные), так и межмолекулярную ( $T_0$  и его производные) структуры (**Таблица 2.3.2**).  $U_0$  представляет собой фрагмент микросателлитов человека и часто встречается в межгенных областях и интронах.  $T_0$  представляет собой известный модельный ОДН; его вторичная структура была охарактеризована ранее [492] (схематическое изображение всех структур иМ показано на **Рисунке 2.3.11**). Кривые плавления и КД-спектры немодифицированных иМ показаны на **Рисунке 2.3.12** (левая и правая панели соответственно). Амплитуды характеристических КД-пиков (288 нм) использовались для определения значений  $pH_{1/2}$  (средняя панель на **Рисунке 2.3.12**). Незначительный гистерезис (**Рисунок 2.3.13А**) и незначительное влияние концентрации на термическую стабильность  $U_0$  (приведено на **Рисунке 2.3.13Б**) подтверждают мономолекулярное сворачивание. Тетрамолекулярная структура  $T_0$ , напротив, демонстрировала выраженный гистерезис и концентрационную зависимость температуры отжига (**Рисунок 2.3.13А**) в соответствии с уравнением (1) для тетрамолекулярных структур ( $n = 4$ , данные представлена на **Рисунке 2.3.13Б**):

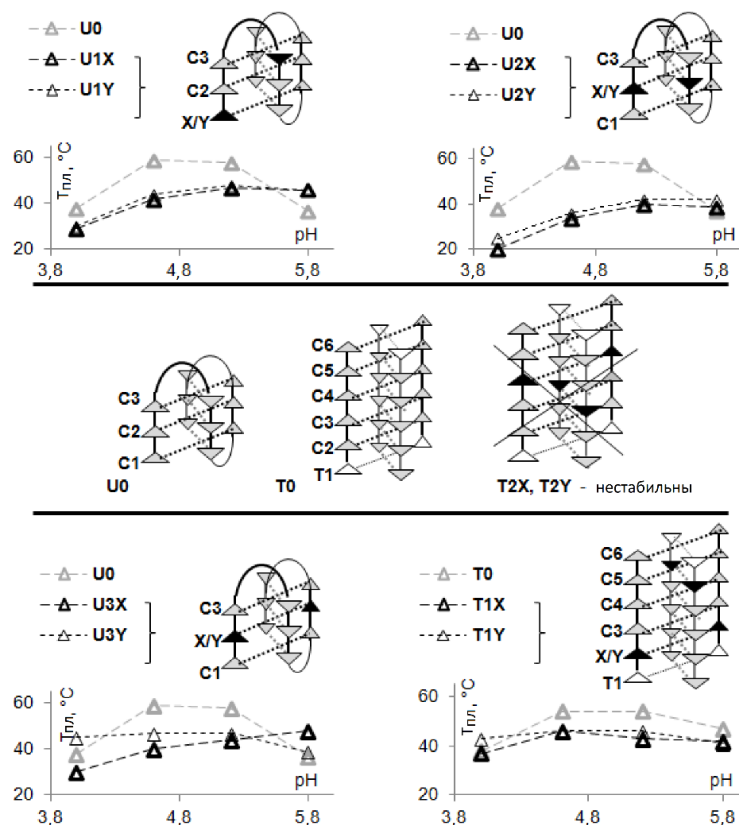
$$1/T_{1/2} = \ln(C/2n)^{n-1} \cdot R/\Delta H - \Delta S \cdot R/\Delta H \quad (1),$$

где  $T_{1/2}$  — среднее значение температур отжига и плавления;  $n$  – стехиометрический коэффициент,  $\Delta H$  и  $\Delta S$  – энтальпийный и энтропийный вклады в свободную энергию образования иМ.

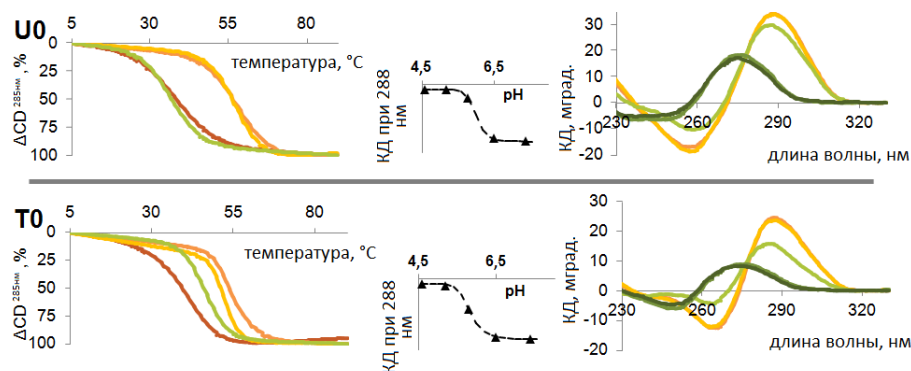
**Таблица 2.3.2.** Последовательности, температуры плавления ( $T_{пл}$ ) при pH 5,8 (10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  буфер) и значения  $\text{pH}_{1/2}$  немодифицированных иМ и иМ, модифицированных G-clamp/гуанидино-G-clamp или i-clamp.

| шифр             | Последовательность<br>(5'-3') | $T_{пл}$ ,<br>$\pm 1^\circ\text{C}$<br>( $\Delta T$ ) | $\text{pH}_{1/2}$<br>( $\pm 0,1$ ) | шифр             | Последовательность<br>(5'-3') | $T_{пл}$ ,<br>$\pm 1^\circ\text{C}$<br>( $\Delta T$ ) | $\text{pH}_{1/2}$<br>( $\pm 0,1$ ) |
|------------------|-------------------------------|---|------------------------------------|------------------|-------------------------------|---|------------------------------------|
| U <sub>0</sub>   | CCCATCCCATCCCATCCC            | 37  | 6,0                                | T <sub>0</sub>   | TCCCCC                        | 47  | 5,8                                |
| U <sub>1</sub> X | XCCATXCCATCCCATCCC            | 46 (+9)   | 6,3                                | T <sub>1</sub> X | TXCCCC                        | 42 (-5)   | 6,0                                |
| U <sub>2</sub> X | CXCATCXCATCCCATCCC            | 39 (+2)   | 5,7                                | T <sub>2</sub> X | TCCXCC                        | -   | -                                  |
| U <sub>3</sub> X | CXCATCCCATCXCATCCC            | 48 (+11)  | 5,9                                | T <sub>1</sub> Y | TYCCCC                        | 41 (-6)   | 6,2                                |
| U <sub>1</sub> Y | YCCATYCCATCCCATCCC            | 46 (+9)   | 6,0                                | T <sub>2</sub> Y | TCCYCC                        | -   | -                                  |
| U <sub>2</sub> Y | CYCATCYCATCCCATCCC            | 42 (+5)   | 6,2                                | T <sub>1</sub> Z | TZCCCC                        | 52 (+5)   | 6,6                                |
| U <sub>3</sub> Y | CYCATCCCATCYCATCCC            | 39 (+2)   | 6,1                                | T <sub>2</sub> Z | TCCZCC                        | 33 (-14)  | -                                  |
| U <sub>1</sub> Z | ZCCATZCCATCCCATCCC            | 48 (+11)  | 6,9                                |                  |                               |   |                                    |
| U <sub>2</sub> Z | CZCATCZCATCCCATCCC            | 47 (+10)  | 6,6                                |                  |                               |   |                                    |
| U <sub>3</sub> Z | CZCATCCCATCZCATCCC            | 47 (+10)  | 5,9                                |                  |                               |   |                                    |

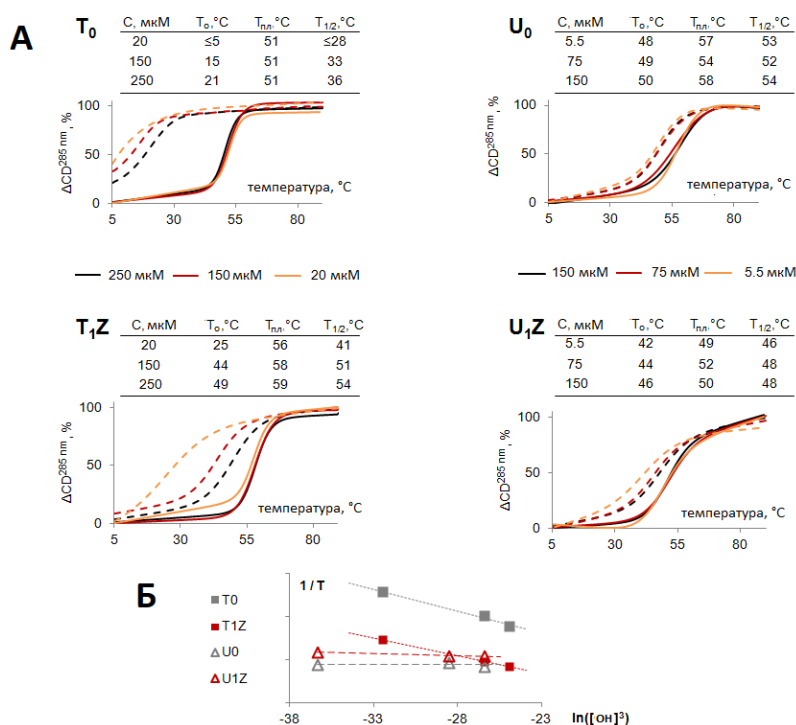
X = G-clamp-нуклеотид; Y = гуанидино-G-clamp-нуклеотид; Z = i-clamp-нуклеотид.



**Рисунок 2.3.11.** Схематические изображения предполагаемых структур иМ и зависимость их термической стабильности от pH.



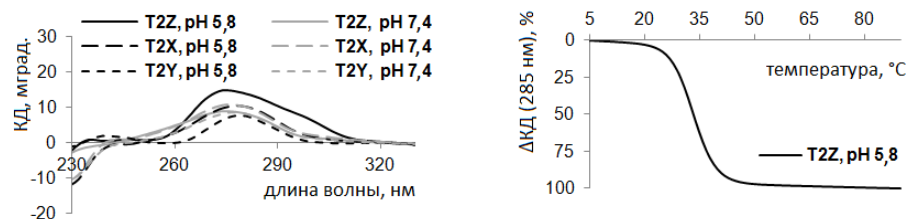
**Рисунок 2.3.12.** Кривые плавления и КД-спектры немодифицированных внутримолекулярных и тетрамолекулярных иМ. Условия: 10 мМ натрий-ацетатный (рН 4,0–5,2) или  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 5,8–7,4) буфер. Концентрации олигонуклеотидов: 5 мкМ ( $U_0$ ) или 10 мкМ ( $T_0$ ). КД-спектры регистрировали при 5°C.



**Рисунок 2.3.13.** Анализ меж- и внутримолекулярного сворачивания иМ. (А) Кривые плавления (сплошные линии) и отжига (пунктирные линии). Условия: 10 мМ натрий-ацетатный буфер (рН 5,2). (Б) сводная информация о концентрационной зависимости  $T_{1/2}$ ,  $T_{1/2} = (T_o + T_{пл})/2$ .

Положения G-clamp- (X) и гуанидино-G-clamp- (Y) модификаций предполагают образование пар цитозин-clamp (Рисунок 2.3.10Б; левые структуры) в  $U_{1-2}X/Y$  иМ и пар clamp-clamp (Рисунок 2.3.10Б; правые структуры) в  $U_3X/Y$ ,  $T_1X/Y$  и  $T_2X/Y$  иМ. Предполагаемые пары clamp-clamp в структурах  $T_2X$  и  $T_2Y$  (Рисунок 2.3.11) находятся в непосредственной близости, что может вызвать дестабилизацию за счет стерического отталкивания. Действительно, иМ  $T_2X$  и  $T_2Y$  были нестабильны в умеренно кислых

условиях (**Рисунок 2.3.14**). Температуры плавления ( $T_{пл}$ ) других модифицированных структур в тех же условиях представлены в **Таблице 2.3.2**.



**Рисунок 2.3.14.** Характеристика предполагаемых тетрамолекулярных иМ с соседними clamp-clamp парами.

Как видно из **Таблицы 2.3.2**, обе модификации вызывают существенную дестабилизацию иМ в тетрамолекулярном ряду и нулевую или заметную стабилизацию (среднее значение  $\Delta T_{пл}$  составляет приблизительно  $+3^\circ\text{C}$  на модификацию) в мономолекулярном ряду при pH 5,8. Детальный анализ зависимости от pH (**Рисунок 2.3.11**) выявил сильное негативное влияние X и Y на термическую стабильность иМ при более низком pH, хотя значения  $pH_{1/2}$  в нескольких случаях немного увеличивались (**Таблица 2.3.2**). Мы приписываем стабилизацию в умеренно кислых условиях неспецифическим стэкинг-взаимодействиям; хотя в целом геометрия G-clamp-остатка и его гуанидинового производного выглядит неоптимальной для эффективного спаривания в иМ.

По всей видимости, взаимодействия протонированной амино(гуанидино)этильной группы с сахарофосфатным остовом приводят к нарушению спаривания clamp-clamp и цитозин-clamp. Мы учли результаты МД-моделирования дуплекса, содержащего остаток  $G^{8AE}$ -clamp, который мог одновременно образовывать водородные связи с комплементарным гуанином и сахарофосфатным остовом комплементарной цепи, и пришли к выводу, что заряженную аминоалкильную группу следует сместить в другое положение феноксазинового фрагмента (т.е. в C8 положение) и удлинить, чтобы обеспечить ее эффективное взаимодействие с остовом при одновременном спаривании оснований. Как результат, мы решили получить новый аналог  $G^{8AE}$ -clamp-нуклеотида, i-clamp-нуклеотид, содержащий аминопропильную группу, и разработать схему синтеза фосфорамидита для его введения в ОДН (**Схема 2.3.2**).

4-(3-Бромпропокси)фенол **1.1.91** обрабатывали 56%-ным водным раствором азотной кислоты в бензоле при  $0^\circ\text{C}$  с получением пара-замещенного нитрофенола **1.1.92**. Соединение **1.1.92** подвергали каталитическому гидрированию и использовали в реакции с 3',5'-О-ацетил-4-N-(1,2,4-триазол-1-ил)-5-бром-2'-дезокситидином в присутствии ДИПЭА с образованием продукта **1.1.93**. Производное **1.1.94** получали обработкой **1.1.93**

азидом натрия в ДМФА с последующим удалением ацетильных защитных групп аммиаком в водном метаноле. Циклизацию проводили кипячением **1.1.94** в смеси ТЭА/абсолютный  $C_2H_5OH$ . После введения стандартной 5'-О-диметокситритильной защитной группы в феноксазиновое производное **1.1.95** с получением **1.1.96**, осуществляли восстановление азидогруппы и введение N-трифторацетильной защитной группы. Фосфитилирование **1.1.97** привело к получению целевого фосфорамидита **1.1.98**, который использовался в стандартном твердофазном синтезе модифицированных ОДН  $T_1Z$ ,  $T_2Z$  и  $U_{1-3}Z$  (Таблица 2.3.2).

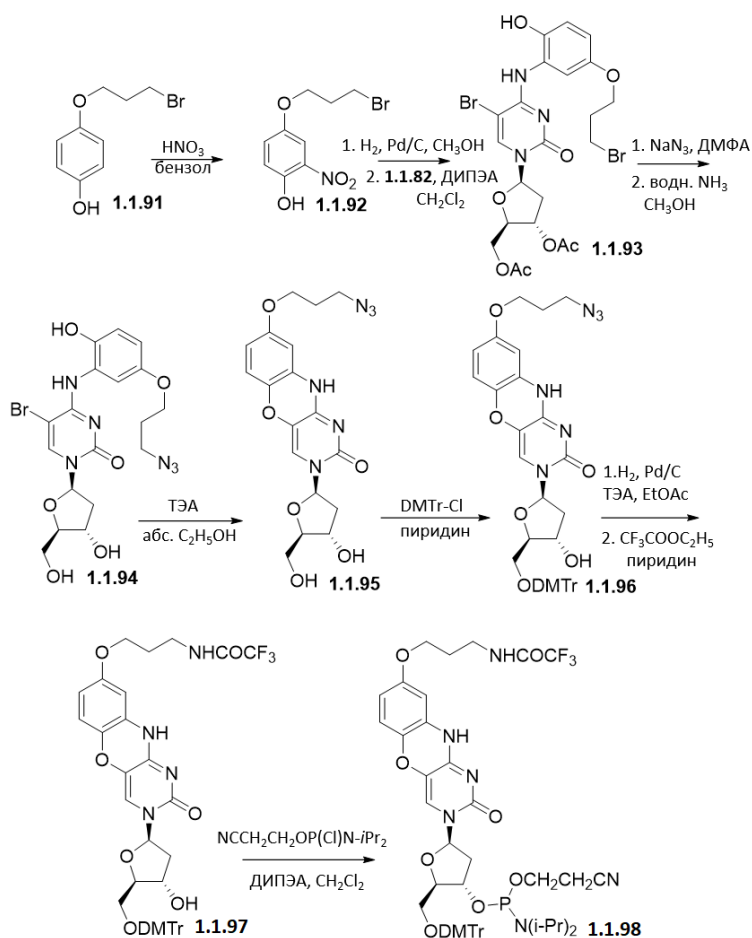
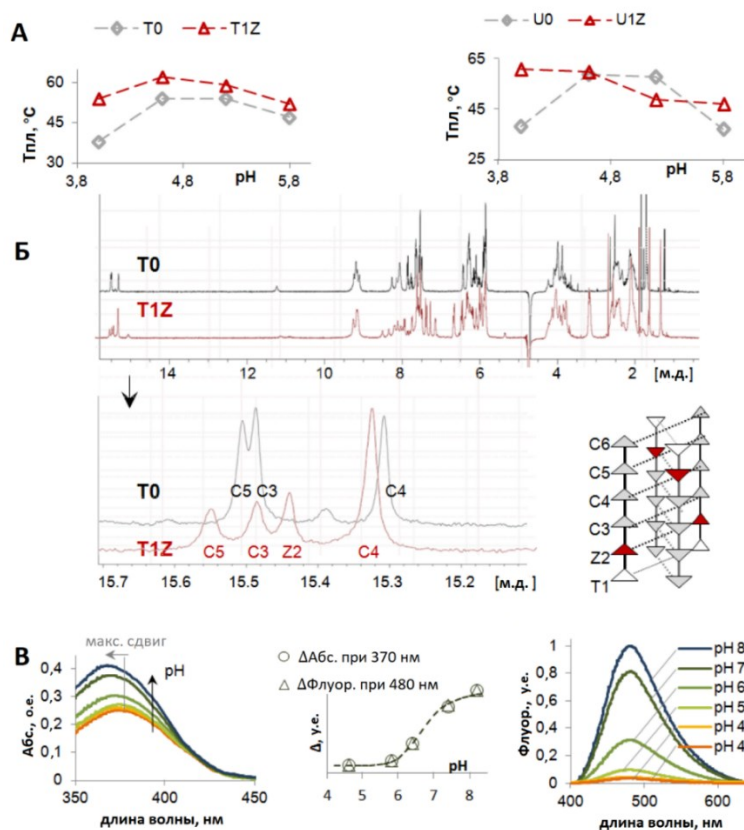


Схема 2.3.2. Синтез *i*-clamp фосфорамидита **1.1.98**.

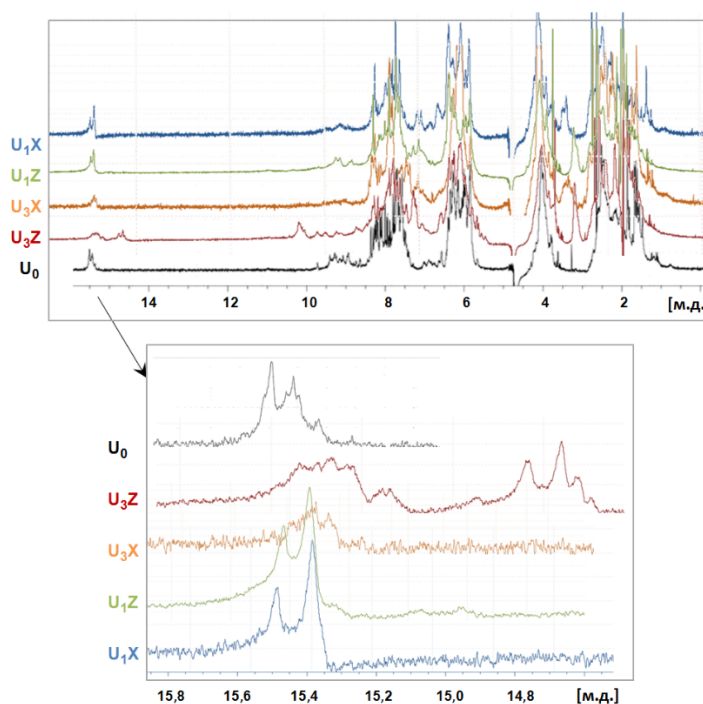
иМ с *i*-clamp-вставками были охарактеризованы аналогично иМ с G-clamp и гуанидино-G-clamp с помощью кривых плавления и КД-спектров (Рисунок 2.3.15А). Новая модификация повысила термостабильность структур при слабокислых значениях pH (Таблица 2.3.2) в мономолекулярном ряду (среднее значение  $\Delta T_{пл}$  составляет приблизительно +5°C на модификацию) и, в отличие от G-clamp и его гуанидинового производного, для тетрамолекулярного  $T_1Z$  ( $\Delta T_{пл} = +5^\circ C$ ). Как и в случаях  $T_2X$  и  $T_2Y$ , мы связываем отрицательный эффект *i*-clamp в  $T_2Z$  с создаваемой модификацией стерическими затруднениями. Образование иМ  $T_1Z$ ,  $U_1Z$  и  $U_3Z$  было подтверждено



данными ЯМР-спектроскопии (**Рисунок 2.3.15Б, Рисунок 2.3.16**). Две группы пиков около 15 м.д. в  $^1\text{H}$  ЯМР-спектре  $\text{U}_3\text{Z}$  могут указывать на сосуществование двух конформаций иМ (таких как 3'Е и 5'Е, которые могут иметь разные химические сдвиги [513]) (**Рисунок 2.3.16**).



**Рисунок 2.3.15.** Характеристика иМ с *i*-clamp-вставками. (А) зависимость термостабильности иМ от pH; (Б)  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры (pH 5,8); (В) Зависимость поглощения и флуоресценции *i*-clamp от pH в  $\text{T}_1\text{Z}$ .



**Рисунок 2.3.16.**  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры  $U_0$  и его производных.

Данные о зависимости температур плавления  $T_1Z$  и  $U_1Z$  от рН приведены на **Рисунке 2.3.15А**. Подтверждение меж- и внутримолекулярного сворачивания  $T_1Z$  и  $U_1Z$  соответственно в умеренно кислых условиях (рН 5,2) представлено на **Рисунке 2.3.13**. Чувствительность поглощения и флуоресценции *i*-clamp в  $T_1Z$  к рН представлена на **Рисунке 2.3.15В**.

Наблюдаемое тушение флуоресценции *i*-clamp и батохромный сдвиг его полосы поглощения в кислых условиях (**Рисунок 2.3.15В**) соответствуют имеющимся данным для родственных аналогов цитозина [8]. Значение рН перехода, рассчитанное на основе изменений поглощения и флуоресценции *i*-clamp ( $\text{pH}_{1/2} = 6,7 \pm 0,1$ , **Рисунок 2.3.15В**, средняя панель), согласуется с нашими оценками, основанными на КД-данных  $T_1Z$  (**Таблица 2.3.2**).

В целом, введение *i*-clamp вызывало значительную стабилизацию иМ как в сильнокислых (рН 4,0), так и в слабокислых (5,8) условиях (**Рисунок 2.3.15А**), а также существенно повышало значения рН перехода ( $\Delta\text{pH}_{1/2} T_1Z = +0,8$ ;  $\Delta\text{pH}_{1/2} U_1Z = +0,9$ ; **Таблица 2.3.2**). В связи с этим мы решили использовать *i*-clamp для получения иМ, стабильных в условиях, близких к физиологическим. Для этого, мы синтезировали дополнительный набор ОДН (**Таблица 2.3.3**), в который вошли известные немодифицированные иМ  $M_0$  и  $G_0$ , а также их производные с *i*-clamp-вставками.  $M_0$  и  $G_0$  представляют собой модельный и геномный иМ соответственно, стабильные при рН 7.4 [44]. Результаты характеристики иМ оптическими методами представлены на **Рисунке 2.3.17**.

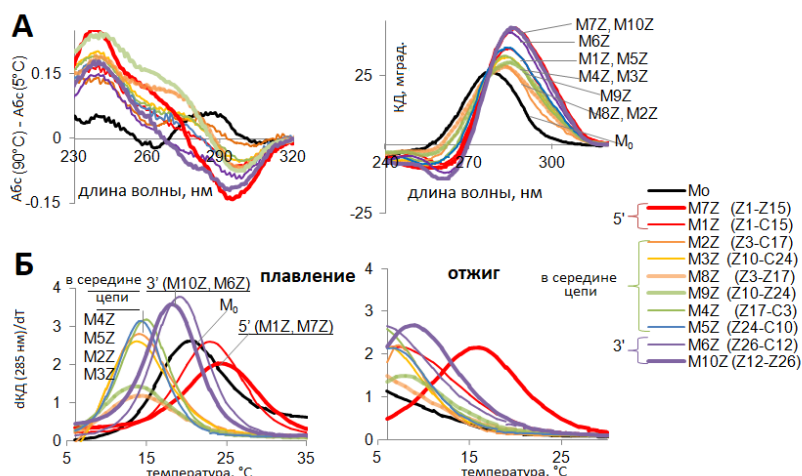
**Таблица 2.3.3.** Последовательности и термическая стабильность немодифицированных и модифицированных *i*-clamp иМ, стабильных в условиях, близких к физиологическим.

| шифр              | последовательность (5'-3') <sup>а</sup> | $T_{пл}, \pm 1^\circ\text{C} (\Delta T)^b$ | $T_o, \pm 1^\circ\text{C} (\Delta T)^b$ |
|-------------------|---|--|---|
| M <sub>0</sub>    | CCCCCTTCCCCCTTCCCCCTTCCCCC              | 20   | ≤7                                      |
| M <sub>1</sub> Z  | ZCCCCCTTCCCCCTTCCCCCTTCCCCC             | 23 (+3)                                    | 10 (+3)                                 |
| M <sub>2</sub> Z  | CCZCCTTCCCCCTTCCCCCTTCCCCC              | 14 (-6)                                    | ≤4 (-3)                                 |
| M <sub>3</sub> Z  | CCCCCTTCCZCCTTCCCCCTTCCCCC              | 13 (-7)                                    | ≤4 (-3)                                 |
| M <sub>4</sub> Z  | CCCCCTTCCCCCTTCCZCCTTCCCCC              | 15 (-5)                                    | ≤5 (-2)                                 |
| M <sub>5</sub> Z  | CCCCCTTCCCCCTTCCCCCTTCCZCC              | 14 (-6)                                    | ≤7 (0)                                  |
| M <sub>6</sub> Z  | CCCCCTTCCCCCTTCCCCCTTCCCCCZ             | 19 (-1)                                    | ≤4 (-3)                                 |
| M <sub>7</sub> Z  | ZCCCCCTTCCCCCTTCCCCCTTCCCCC             | 25 (+5)                                    | 16 (+9)                                 |
| M <sub>8</sub> Z  | CCZCCTTCCCCCTTCCZCCTTCCCCC              | 14 (-6)                                    | ≤5 (-2)                                 |
| M <sub>9</sub> Z  | CCCCCTTCCZCCTTCCCCCTTCCZCC              | 13 (-7)                                    | ≤7 (0)                                  |
| M <sub>10</sub> Z | CCCCCTTCCCCZTTCCCCCTTCCCCCZ             | 18 (-2)                                    | 9 (-1)                                  |
| G <sub>0</sub>    | CCCCCTCCCCCTTCCCCCTCCCCC                | 26   | 9                                       |
| G <sub>1</sub> Z  | ZCCCCCTCCCCCTTCCCCCTCCCCC               | 28 (+2)                                    | 13 (+4)                                 |
| G <sub>2</sub> Z  | CCCCCTCCCZCCTTCCCCCTCCCCC               | 24 (-2)                                    | 9 (0)                                   |
| G <sub>3</sub> Z  | CCCCCTCCCCCTTCCCCCTCCCCCZ               | 20 (-6)                                    | 10 (+1)                                 |

<sup>а</sup>Z = *i*-clamp-нуклеотид.

<sup>б</sup>Условия: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 100 mM NaCl.

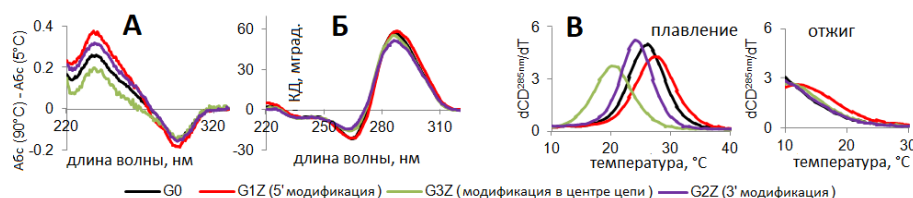
<sup>в</sup>T<sub>пл</sub> – температура плавления, T<sub>о</sub> – температура отжига.



**Рисунок 2.3.17.** Характеристика модельных иМ с *i*-clamp-вставками, которые стабильны в близких к физиологическим условиях. (А) Дифференциальные спектры поглощения (ДСП) и КД-спектры, pH 7,4. (Б) Кривые плавления и отжига (первые производные), pH 7,4. Модифицированные пары указаны в легендах; (А) и (Б) имеют совместные легенды.

Как видно из **Рисунка 2.3.17А**, все модифицированные иМ были свернуты при pH 7,4 в присутствии 100 mM NaCl (смотри характерные положительные КД-полосы при 288 нм и отрицательные полосы на ДСП при 295 нм), тогда как немодифицированный модельный ОДН М<sub>0</sub> был в основном развернут (отсутствие характеристичных сигнатур иМ на ДСП и КД-спектрах). Термическая стабильность модифицированных иМ при pH 7,4 (**Рисунок 2.3.17Б**) зависела от положения остатков *i*-clamp. Температуры плавления и

отжига ( $T_{пл}$  и  $T_o$ ) приведены в **Таблице 2.3.3** (гистерезис можно объяснить относительно медленной кинетикой сворачивания по сравнению со скоростью повышения температуры). Модификации в середине цепи в целом оказывали неблагоприятный эффект, 3'-концевые модификации имели незначительные негативные эффекты, а 5'-концевые модификации показывали стабилизирующий характер (особенно в случае 5'-концевой пары clamp-clamp). Аналогичные эффекты наблюдались в геномной серии иМ (**Рисунок 2.3.18**).



**Рисунок 2.3.18.** Геномный иМ  $G_0$  и его производные с *i*-clamp в условиях, близких к физиологическим. (А) ДСП; (Б) КД-спектры при 5°C; (В) кривые плавления и отжига. Условия: 10 mM  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$  (pH 7,4), 100 mM NaCl. Концентрация ОДН: 5 мкм.

Таким образом, мы показали, что G-clamp- и гуанидино-G-clamp-остатки, включенные в ядра иМ, могут участвовать в неканоническом спаривании оснований и/или образовывать дополнительные контакты положительно заряженными группами с фосфатными группами сахарофосфатного остова. Геометрия G-clamp и его гуанидинового производного неоптимальна для одновременного спаривания и взаимодействия между положительно заряженной группой и сахарофосфатным остовом, что объясняет в основном негативное влияние G-clamp вставок на термическую стабильность иМ. Мы разработали новый аналог *i*-clamp с оптимизированной геометрией. Его включение в модельные структуры привело к существенной стабилизации мономолекулярного ядра иМ (среднее значение  $\Delta T_{пл}$  составляет около +5°C на модификацию) в кислых условиях и, в ряде случаев, к увеличению значений pH перехода ( $\Delta pH_{1/2}$  до +0,9). Разработанный аналог является хорошим кандидатом для регуляции свойств иМ при слабокислом и близком к нейтральному pH, что может быть использовано при создании наноустройств на основе иМ для применений *in vitro* и *in vivo*.

Затем, по аналогии с G-clamp и гуанидино-G-clamp, мы решили изучить стабилизирующие свойства гуанидино-*i*-clamp модификации в составе иМ, которая образуется при обработке *i*-clamp-содержащих ОДН гуанидилирующим реагентом [17]. Дополнительно мы оценили кинетику сворачивания/разворачивания природных и модифицированных иМ при небольших изменениях pH вблизи физиологических значений с целью оценить их применимость для создания молекулярных инструментов с быстрым откликом на изменения pH.

Доступные сенсоры на основе иМ для измерения рН демонстрируют относительно медленную кинетику с типичным временем отклика от нескольких секунд до минут [514–516], что, вероятно, является следствием относительно сложной конструкции иМ и использования авторами межмолекулярных структур. Внутримолекулярные сенсоры на основе иМ могут обеспечивать более быстрый отклик на изменения рН [517]. Таким образом, для дальнейшего улучшения сенсоров требуется детальное изучение кинетики сворачивания/разворачивания иМ, в идеале при умеренных изменениях рН в физиологически значимом диапазоне. Недавний анализ генома человека показал, что существует множество последовательностей, способных образовывать иМ в условиях, близких к физиологическим [44,118,136]. Стабильные геномные структуры выглядят хорошими кандидатами для разработки биосовместимых внутримолекулярных рН-чувствительных инструментов на основе иМ. В свою очередь, химическую модификацию можно использовать для дополнительной оптимизации их свойств, т.е. для точной настройки  $pH_{1/2}$  и повышения термической стабильности в нейтральных условиях.

Мы синтезировали ОДН, содержащие гуанидино-*i*-clamp вставки (Таблица 2.3.4), и проанализировали их термическую стабильность при рН 5,8 для производных  $U_0$  и  $T_0$  и рН 7,4 для модельных ( $M_0$ ) и геномных ( $G_0$ ) иМ, которые стабильны в условиях, близких к физиологическим [44].

**Таблица 2.3.4.** Последовательности иМ с гуанидино-*i*-clamp, температуры их плавления и отжига

| шифр    | последовательность (5'-3') <sup>а</sup> | $T_{пл}^b (\pm 1)$<br>°C | $\Delta T_{пл}^b (\pm 2)$<br>°C | $T_o (\pm 1)$<br>°C | $\Delta T_o^b (\pm 2)$<br>°C |
|---------|---|--------------------------|---------------------------------|---------------------|------------------------------|
| $T_0$   | TCCCCC                                  | 47                       | -                               | н/о <sup>г</sup>    | -                            |
| $T_1Zg$ | T <b>Zg</b> CCCC                        | 53                       | +6                              | н/о <sup>г</sup>    | -                            |
| $U_0$   | CCCATCCCATCCCATCCC                      | 39                       | -                               | 37                  | -                            |
| $U_1Zg$ | <b>Zg</b> CCAT <b>Zg</b> CCATCCCATCCC   | 46                       | +7                              | н/о <sup>д</sup>    | -                            |
| $M_0$   | CCCCCTCCCCCTCCCCCTCCCCC                 | 20                       | -                               | $\leq 8$            | -                            |
| $M_1Zg$ | <b>Zg</b> CCCCCTCCCCCTCCCCCTCCCCC       | 22                       | +2                              | 11                  | +3                           |
| $M_6Zg$ | CCCCCTCCCCCTCCCCCTCCCC <b>Zg</b>        | 19                       | -1                              | 9                   | +1                           |
| $G_0$   | CCCCCTCCCCCTCCCCCTCCCCC                 | 26                       | -                               | 10                  | -                            |
| $G_1Zg$ | <b>Zg</b> CCCCCTCCCCCTCCCCCTCCCCC       | 28                       | +2                              | 13                  | +3                           |
| $G2Zg$  | CCCCCTCCCC <b>Zg</b> CCCTCCCCCTCCCCC    | 21                       | -5                              | 10                  | 0                            |

<sup>а</sup> Zg – гуанидино-*i*-clamp нуклеотид.

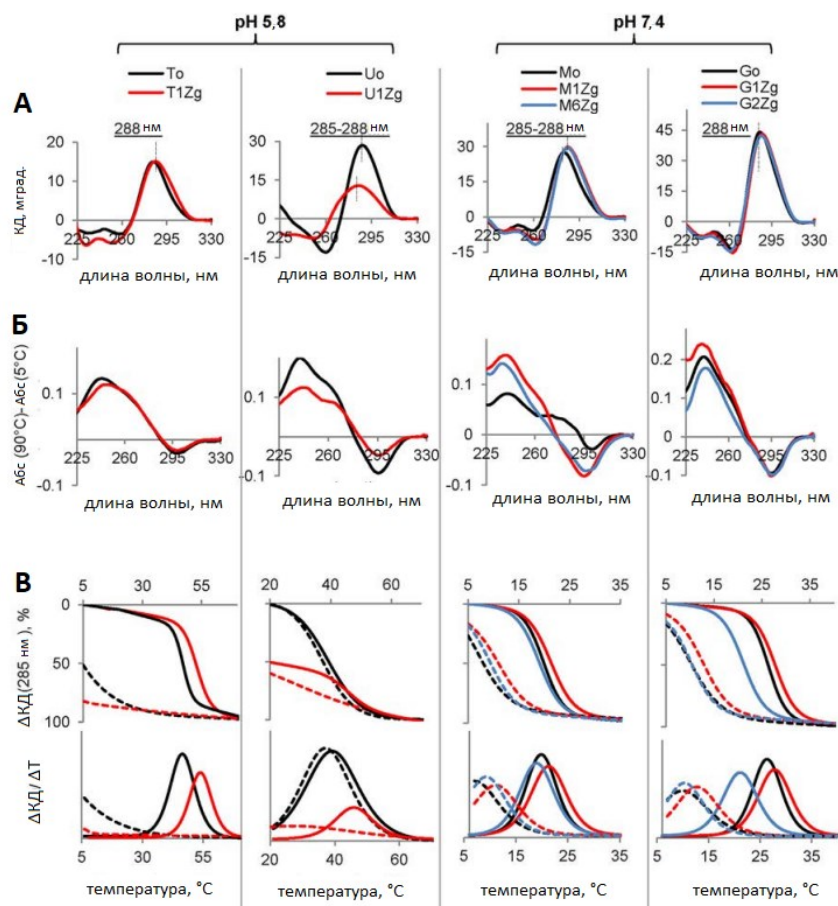
<sup>б</sup>Условия: 10 mM  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$  буфер (рН 7,4) и 100 mM NaCl ( $G_0$ ,  $M_0$  и их аналоги) или 10 mM  $Na_3PO_4$  (рН 5,8) ( $T_0$ ,  $U_0$  и их аналоги). Концентрации ОДН: 10 мкМ ( $T_0$  и  $T_1Zg$ ) или 5 мкМ (остальные).

<sup>в</sup>Изменения термостабильности ОДН, вызванные модификацией:  $\Delta T_{пл/o} = T_{пл/o}^{модифицированный}$  иМ –  $T_{пл/o}^{немодифицированный}$  иМ.

<sup>г</sup>Температуру отжига определить не удалось, поскольку гистерезис был слишком велик.

<sup>д</sup>Температуру отжига не удалось точно определить из-за неоднозначной кривой отжига, что предположительно связано с некооперативным сворачиванием и/или конформационным полиморфизмом.

КД-спектры, ДСП и кривые плавления/отжига гуанидино-*i*-clamp-модифицированных иМ показаны на **Рисунке 2.3.19**. Как КД-спектры (**Рисунок 2.3.19А**), так и ДСП (**Рисунок 2.3.19Б**) содержат характерные признаки иМ структур: положительные КД-полосы в районе 285–288 нм [494] и отрицательные полосы на ДСП в районе 295 нм [518]. Спектр модифицированного ОДН  $U_1Zg$  существенно отличался от спектра немодифицированного аналога  $U_0$ : положительная полоса была уширена и наблюдалось малое плечо вблизи 275 нм (которое можно отнести к развернутой фракции ОДН) наряду с основным пиком вблизи 285 нм. Увеличенный гистерезис (**Рисунок 2.3.19В**) позволяет предположить, что свернутая структура  $U_1Zg$  может отличаться от структуры  $U_0$  (например, возможно образование межмолекулярного иМ). Кроме того, форма кривой отжига была нечеткой. Это можно объяснить некооперативным сворачиванием и/или конформационным полиморфизмом  $U_1Zg$ .



**Рисунок 2.3.19.** иМ с гуанидино-*i*-clamp вставками по сравнению с немодифицированными иМ: характеристика оптическими методами. (А) КД-спектры при 5 °С, (Б) ДСП, (В) кривые плавления (сплошные линии), кривые отжига (штриховые линии) и их первые производные. Условия: 10 мМ  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$  (pH 7,4) и 100 мМ NaCl ( $G_0$ ,  $M_0$  и их аналоги) или 10 мМ  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$ , pH 5,8 ( $T_0$ ,  $U_0$  и их аналоги). Концентрации ОДН: 10 мкМ ( $T_0$  и  $T_1Zg$ ) или 5 мкМ (остальные).

Температуры плавления ( $T_{пл}$ ) и отжига ( $T_0$ ) всех иМ, определенные по первым производным кривых плавления/отжига (**Рисунок 2.3.19В**), приведены в **Таблице 2.3.4**, и их можно непосредственно сопоставить с данными для *i*-clamp-содержащих иМ (**Таблица 2.3.2** и **Таблица 2.3.3**). Замена amino на гуанидиновую группу не привела к дополнительной стабилизации. Эффекты *i*-clamp и гуанидино-*i*-clamp были близкими (например,  $\Delta T_{пл} T_1 Zg - T_0 = +6 \pm 2$  °C (**Таблица 2.3.4**);  $\Delta T_{пл} T_1 Z - T_0 = +5 \pm 2$  °C (**Таблица 2.3.2**)). Значения  $\Delta T_{пл}/T_0$  совпадали в пределах ошибки эксперимента для всех иМ, кроме  $U_0$ , который может иметь несколько иную структуру. Замены остатка цитозина на 5'-конце на гуанидино-*i*-clamp ( $T_1 Zg$ ,  $U_1 Zg$ ,  $M_1 Zg$  и  $G_1 Zg$ ) давали положительные эффекты, тогда как замены на 3'-конце ( $M_6 Zg$ ) и в середине цепи ( $G_2 Zg$ ) вызывали незначительную и выраженную дестабилизацию соответственно.

Чтобы прояснить основу эффектов гуанидино-*i*-clamp и более детально проанализировать чувствительность к pH немодифицированных и модифицированных иМ, мы провели эксперименты с остановленным потоком с отслеживанием сворачивания и разворачивания иМ по КД при 288 нм (специфичная для иМ КД-полоса).

Кинетика образования иМ ранее изучалась рядом методов, в том числе методами поверхностного плазмонного резонанса (ППР), FRET-методами и ЯМР-спектроскопией [432,519–523]. Все эти методы применимы только к относительно медленным процессам. Недавно сообщалось об анализе быстрого сворачивания/разворачивания иМ на основе остановленного потока (обычно при изменениях pH  $8 \rightarrow 5/5 \rightarrow 8$ ) [8,513]. В этих исследованиях условия pH подбирались так, чтобы обеспечить полное (псевдонеобратимое) формирование/разрушение структур, что упрощает интерпретацию кинетических кривых и наблюдаемых констант скорости. В первых экспериментах ОПКД (остановка потока с контролем по КД) [513] для осуществления скачка pH использовали добавление высококонцентрированных буферов, что приводило к значительному изменению ионной силы раствора.

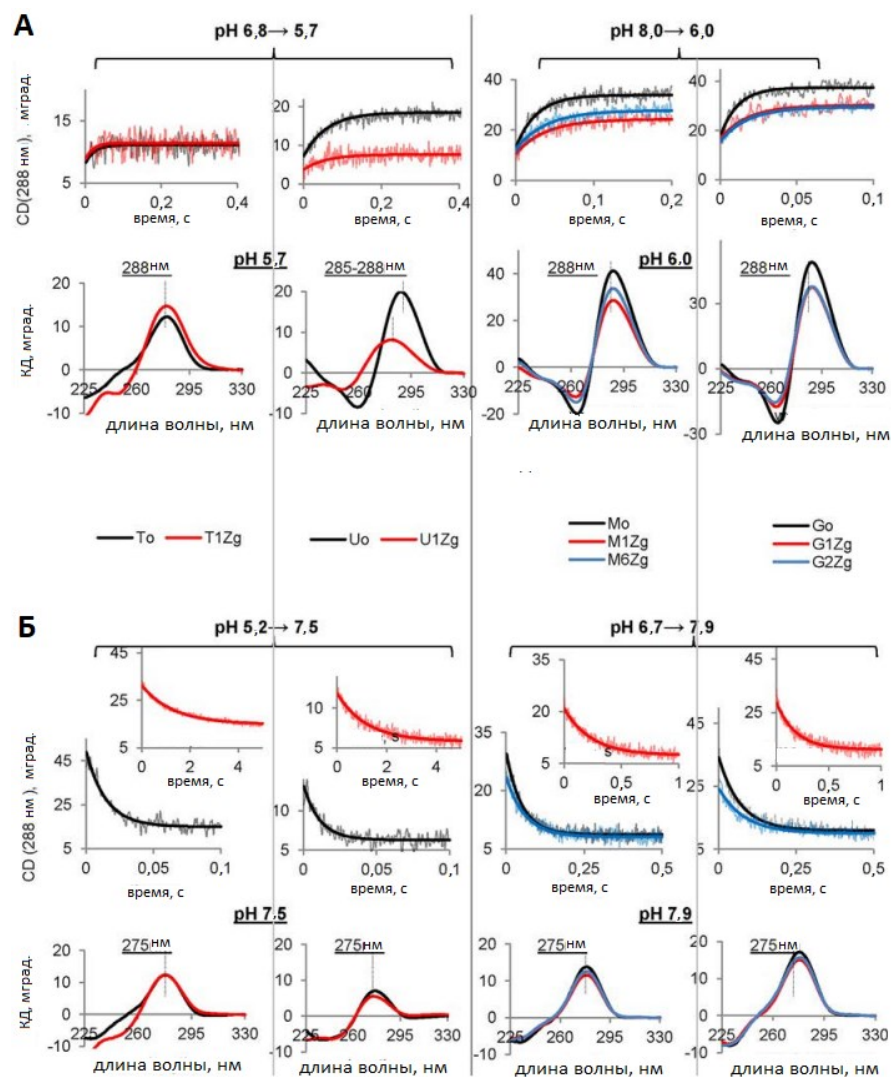
Мы не ставили перед собой задачу провести углубленное и количественное исследование. Вместо этого мы поставили принципиальный вопрос: являются ли перестройки иМ медленными или быстрыми после биологически значимых умеренных изменений pH. Мы использовали псевдофизиологические условия (относительно высокие концентрации солей) для геномных ( $G_0$ ) и модельных ( $M_0$ ) иМ и их производных. Важно отметить, что эксперименты с ОПКД были спланированы таким образом, чтобы избежать резких изменений ионной силы раствора, поскольку известно, что такие изменения сами по себе влияют на иМ [494]. Мы провели четыре серии экспериментов с ОПКД: изменения pH  $6,8 \rightarrow 5,7$  и  $5,2 \rightarrow 7,5$  для  $T_0$ ,  $U_0$  и их производных; изменения pH  $8,0 \rightarrow 6,0$  и  $6,7 \rightarrow 7,9$  для

$M_0$ ,  $G_0$  и их производных. Диапазоны рН (суженные по сравнению с рассмотренными ранее изменениями рН) были выбраны на основе ранее определенных точек перехода ( $pH_{1/2}$ ) немодифицированных ОДН:  $pH_{1/2} = 7,3 \pm 0,1$  для  $M_0$  (рассчитанная нами), или 7,1 для  $M_0$  и  $G_0$  [44],  $pH_{1/2}(T_0) = 5,8 \pm 0,1$  и  $pH_{1/2}(U_0) = 6,0 \pm 0,1$ .

Полученные кинетические кривые и КД-спектры в конечной точке показаны на **Рисунке 2.3.20**. Спектры  $T_0$ ,  $U_0$  и их производных после ОПКД при рН 5,7 (**Рисунок 2.3.20А**) по форме были аналогичны показанным на **Рисунке 2.3.19А** (рН 5,8), хотя увеличение ионной силы в экспериментах привело к некоторому уменьшению молярной эллиптичности  $T_0$  и  $T_1Zg$  вблизи 288 нм. Спектры  $M_0$ ,  $G_0$  и их производных после ОПКД при рН 6,0 (**Рисунок 2.3.20А**) были похожи на спектры, показанные на **Рисунке 2.3.19А** (рН 7,4). Структуры иМ (свернутые, по крайней мере, частично) присутствовали во всех случаях. Спектры после ОПКД при рН 7,5 ( $U_0$ ,  $T_0$  и их производные) и 7,9 ( $M_0$ ,  $G_0$  и их производные) со смещенными к 275 нм максимумами КД (**Рисунке 2.3.20Б**) указывают на развернутые (или преимущественно развернутые) ОДН.

Кинетические кривые  $6,8 \rightarrow 5,7$ , полученные для  $T_0$  и  $T_1Zg$  (**Рисунок 2.3.20А**), не удалось детально проанализировать из-за плохого соотношения сигнал/шум, даже несмотря на то, что мы увеличили начальные (предварительные) концентрации ОДН до 70 мкМ, что соответствует конечной концентрации ОДН 15 мкМ после смешивания с буфером в соотношении 1:4 (для других ОДН конечная концентрация составляла 3 мкМ). Остальные кинетические кривые хорошо аппроксимируются моноэкспонентой (во всех случаях приведенное значение параметра хи-квадрат  $\approx 1$ ).





**Рисунок 2.3.20.** иМ с гуанидино-*i*-clamp-вставками по сравнению с немодифицированными иМ: результаты ОПКД и КД-спектры в конечной точке. (А) кинетические кривые, полученные при способствующих сворачиванию изменениях pH 6,8 → 5,7 ( $U_0$ ,  $U_1Zg$ ,  $T_0$  и  $T_1Zg$ ) и 8,0 → 6,0 ( $G_0$ ,  $G_1Zg$ ,  $G_2Zg$ ,  $M_0$ ,  $M_1Zg$  и  $M_6Zg$ ) и соответствующие КД-спектры в конечной точке (условия: 74 мМ  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$ , pH 5,7/6,0, 90 мМ NaCl для  $G_0$ ,  $M_0$  и их производных, концентрации ОДН: 15 мкМ для  $T_0$  и  $T_1Zg$ , 3 мкМ для остальных). (Б) кинетические кривые, полученные при способствующих разворачиванию скачках pH 5,2 → 7,5 ( $U_0$ ,  $U_1Zg$ ,  $T_0$  и  $T_1Zg$ ) и 6,7 → 7,9 ( $G_0$ ,  $G_1Zg$ ,  $G_2Zg$ ,  $M_0$ ,  $M_1Zg$  и  $M_6Zg$ ) и соответствующие КД-спектры в конечной точке (условия: 74 мМ  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$ , pH 7,5/7,9; 90 мМ NaCl для  $G_0$ ,  $M_0$  и их производных; концентрации ОДН: 15 мкМ для  $T_0$  и  $T_1Zg$ ; 3 мкМ для остальных). Температура: 25 °С. (А) и (Б) имеют совместные легенды.

Предыдущие исследования кинетики иМ (описанные для мутанта С20Т фрагмента промотора NHEШ *c-Мус*) выявили двухстадийное сворачивание: быстрое образование промежуточных структур и их последующую медленную перегруппировку [8]. Для наших

меж- и внутримолекулярных иМ явных признаков промежуточных структур не наблюдалось, но мы не исключаем многостадийных процессов. Однако даже если промежуточные варианты существуют, по-видимому, существует ключевая лимитирующая стадия, которая объясняет основные изменения КД. Кажущиеся константы скорости, определенные путем моноэкспоненциальной аппроксимации кинетических кривых на **Рисунке 2.3.20**, приведены в **Таблице 2.3.5**.

**Таблица 2.3.5.** Наблюдаемые значения констант скорости сворачивания/расплетения немодифицированных иМ и иМ с вставкой гуанидино-*i*-clamp, полученные в результате моноэкспоненциальной аппроксимации кинетических кривых.

| ОДН               | K <sub>набл</sub> , с <sup>-1</sup> |              |
|-------------------|-------------------------------------|--------------|
|                   | pH 6,8 → 5,7                        | pH 5,2 → 7,5 |
| T <sub>0</sub>    | н/о <sup>a</sup>                    | 68±2         |
| T <sub>1</sub> Zg | н/о                                 | 0,76±0,02    |
| U <sub>0</sub>    | 17±2                                | 90±5         |
| U <sub>1</sub> Zg | 17±3                                | 0,85±0,03    |
|                   | pH 8,0 → 6,0                        | pH 6,7 → 7,9 |
| M <sub>0</sub>    | 38±1                                | 20,1±0,5     |
| M <sub>1</sub> Zg | 26±1                                | 4,6±0,1      |
| M <sub>6</sub> Zg | 26±1                                | 12,7±0,5     |
| G <sub>0</sub>    | 88±4                                | 14,5±0,4     |
| G <sub>1</sub> Zg | 55±4                                | 5,4±0,2      |
| G <sub>2</sub> Zg | 55±4                                | 12,1±0,6     |

<sup>a</sup>н/о – кинетическую кривую невозможно проанализировать (низкое соотношение сигнал/шум).

Как видно из кривых, представленных на **Рисунке 2.3.20**, и данных, представленных в **Таблице 2.3.5**, кинетика перехода 6,8 → 5,7/8,0 → 6,0 аналогична для немодифицированных и модифицированных иМ. Процессы были быстрыми ( $\tau_{1/2} < 100$  мс). M<sub>1</sub>Zg/M<sub>6</sub>Zg и G<sub>1</sub>Zg/G<sub>2</sub>Zg имели несколько сниженные константы скорости отклика на изменение pH 8,0 → 6,0 по сравнению с G<sub>0</sub> и M<sub>0</sub> соответственно. Мы не можем постулировать необратимое образование иМ при конечном pH, поэтому эти скорости отклика, вероятно, следует интерпретировать как наблюдаемые, а не как фактические скорости сворачивания:  $K_{набл} = k_{сворач} * [ОДН]^{n-1} + k_{разворач}$ , где n — количество цепей в иМ. Таким образом, снижение K<sub>набл</sub> (8,0 → 6,0) модифицированных иМ может фактически указывать на медленное разворачивание. При изменениях pH 5,2 → 7,5/6,7 → 7,9 резкое снижение скорости отклика наблюдалось для всех 5'-модифицированных иМ. Интересно, что эффекты модификаций на 3'-конце (M<sub>6</sub>Zg) и в середине цепи (G<sub>2</sub>Zg) были гораздо менее выражены. Опять же, скорость отклика, вероятно, следует интерпретировать как

наблюдаемую, а не фактическую скорость разворачивания, поскольку мы не можем постулировать полное необратимое разрушение иМ при рН, близком к физиологическому.

Сравнение значений  $K_{\text{набл}}$  для скачков рН  $6,8 \rightarrow 5,7/8,0 \rightarrow 6,0$  (сворачивание – доминирующий процесс, влияние гуанидино-*i*-clamp варьируется от умеренного до незначительного) и  $5,2 \rightarrow 7,5/6,7 \rightarrow 7,9$  (разворачивание – доминирующий процесс, влияние 5'-концевого гуанидино-*i*-clamp является значительным) привели нас к следующим выводам:

- 5'-концевые модификации, по-видимому, резко снижают скорость разворачивания иМ, в то время как модификации в других положениях вызывают умеренное снижение скорости;
- Эффекты, препятствующие разворачиванию, могут быть частично (5'-модификация) или полностью/почти полностью (3'-модификация) компенсированы умеренными эффектами, препятствующими сворачиванию;
- В случае модификаций в середине цепи замедление сворачивания, по-видимому, доминирует над замедлением разворачивания.

Важно отметить, что эти кинетические данные согласуются с термодинамическими данными, которые указывали на стабилизацию иМ 5'-концевыми вставками гуанидино-*i*-clamp, незначительный эффект 3'-гуанидино-*i*-clamp и дестабилизацию гуанидино-*i*-clamp в середине цепи (**Таблица 2.3.4**). Эффекты 5'-модификации – двоякие (положительное влияние на стабильность и отрицательное влияние на кинетику).

Что касается потенциального применения предложенных модификаций в составе иМ в качестве основных элементов рН-сенсоров, замедленная кинетика является очевидным недостатком для отслеживания быстрых процессов, таких как изменения рН в нейронах. Однако модифицированные иМ по-прежнему применимы для обнаружения относительно медленных изменений, таких как закисление опухолевого окружения или изменения рН при созревании эндосом. Для немодифицированных иМ мы продемонстрировали быстрый отклик на умеренные изменения рН. Быстрое сворачивание и разворачивание геномных и модельных ( $G_0$  и  $M_0$ ) иМ при рН и ионной силе, близких к физиологическим, наблюдается впервые и может иметь физиологические значения. Эти результаты проливают свет на возможные перестройки фрагментов ДНК, склонных к образованию иМ, *in vivo* и могут быть полезны для будущего дизайна рН-сенсоров на основе геномных иМ.

Таким образом, мы описали новую модификацию иМ, гуанидино-*i*-clamp, и показали, что она повышает стабильность иМ при введении ее на 5'-конец ОДН. На основании кинетического анализа мы связываем стабилизирующий эффект 5'-концевых

модификаций гуанидино-*i*-clamp со снижением скорости разворачивания иМ. Это наблюдение имеет важное значение для разработки рН-сенсоров на основе иМ. Модифицированные иМ предпочтительны только в том случае, если скоростью отклика сенсора можно пожертвовать ради его термической устойчивости.

При последующем поиске нуклеотидных модификаций, способных увеличить скорость отклика рН-сенсоров на основе модифицированных иМ, мы изучили 1',2'-дидезоксирибозную замену (**X**), которая имитирует сайты апуринизации/эксцизии азотистых оснований (**Рисунок 2.3.21А**). Модифицированные остатки вводили в петли С-богатой последовательности SHA из промотора гена *SHANK1* (**Рисунок 2.3.21Б**). Отсутствие гетероциклического основания в модификации может увеличить гибкость петель и уменьшить количество возможных контактов с терминальными гемипротонированными парами и соседними гетероциклическими основаниями в петлях, оказывая благоприятный эффект на кинетику сворачивания и разворачивания вторичной структуры.

Исследование чувствительности к рН немодифицированного иМ (SHA) и его аналогов (SHA1-3), содержащих одну, две или три нуклеотидные замены соответственно, проводили методом флуориметрии (последовательности ОДН представлены в **Таблице 2.3.6**). Для этого по 3'- и 5'-концам ОДН вводили флуоресцентные метки –TAMRA и FAM остатки соответственно. В свернутом иМ наблюдали FRET-эффект/контактное тушение за счет сближения FAM и TAMRA. При этом флуоресценция обеих меток частично тушилась за счет стэкинг-взаимодействий флуорофоров с терминальными гемипротонированными цитозиновыми парами, и данный эффект тушения доминировал. Собственная рН-зависимость флуоресценции меток была незначительна на фоне тушения в иМ. Расплетение иМ при переходе рН 6→8 сопровождалось увеличением ИФ, и по полученным кривым методом регрессионного анализа определяли рН<sub>1/2</sub> (**Рисунок 2.3.21В**). Замены в одной, двух или трех петлях практически не оказывали влияния на рН<sub>1/2</sub> (**Таблица 2.3.6**). Таким образом, удаление гетероциклических оснований в петлях не препятствует формированию иМ при физиологических значениях рН.

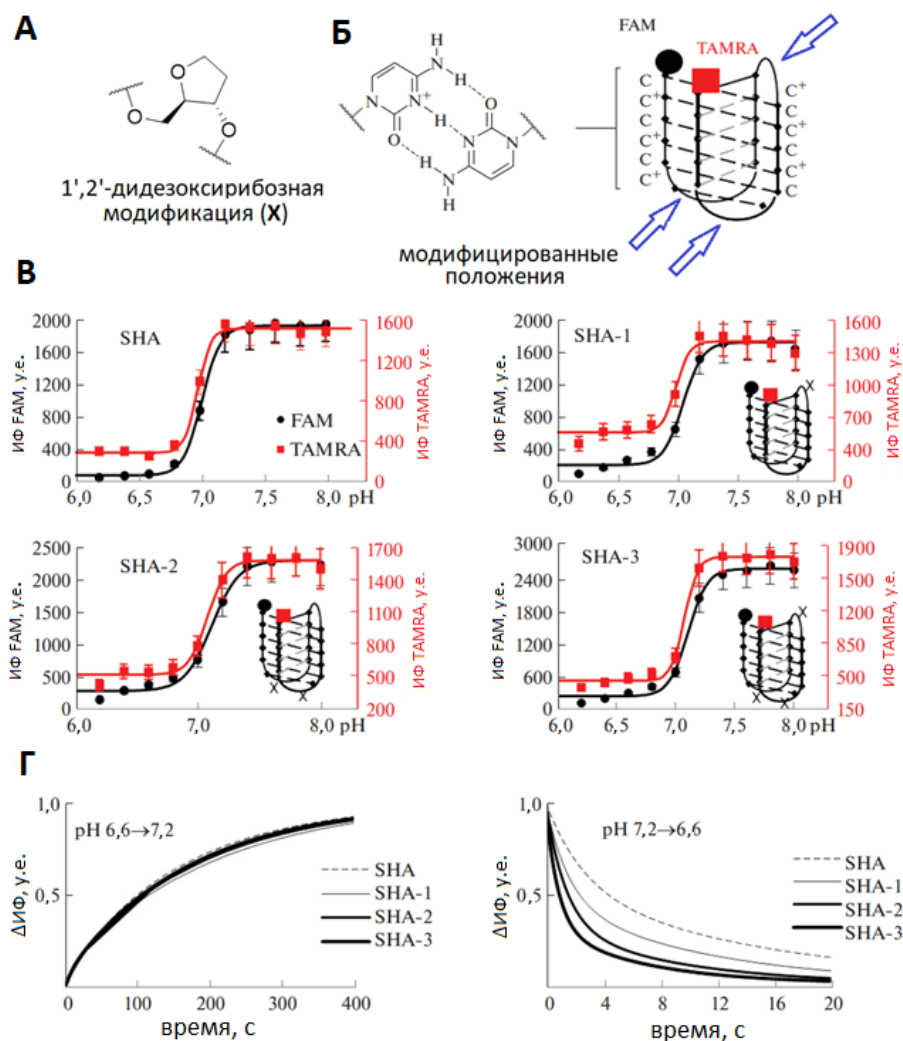
**Таблица 2.3.6.** Последовательности,  $pH_{1/2}$  и кинетические характеристики иМ-образующих ОДН с концевыми флуоресцентными метками.

| шифр  | последовательность,<br>5'→3' <sup>а</sup> | $pH_{1/2} \pm 0,1$ | $K_{набл\_pH\ 7,2 \rightarrow 6,6}, 1/c^b$                   | $T_{1/2\_pH\ 7,2 \rightarrow 6,6}, c$ |
|-------|---|--------------------|--|---------------------------------------|
| SHA   | d(CCCCCCTCCCCCA<br>CCCCCACCCCC)           | 7,0                | 0,065±0,001 (эксп. 1: 54±3%)<br>0,38±0,02 (эксп. 2: 46±3%)   | 4,2±0,2                               |
| SHA-1 | d(CCCCCCTCCCCCX<br>CCCCCACCCCC)           | 7,1                | 0,65±0,02 (эксп. 1: 53±3%)<br>0,093±0,002 (эксп. 2: 47±3%)   | 2,3±0,1                               |
| SHA-2 | d(CCCCCCXCCCCCA<br>CCCCCXCCCCC)           | 7,1                | 0,065±0,001 (эксп. 1: 66±10%)<br>0,12±0,01 (эксп. 2: 54±10%) | 1,5±0,1                               |
| SHA-3 | d(CCCCCCXCCCCCX<br>CCCCCXCCCCC)           | 7,1                | 1,16±0,001 (эксп. 1: 68±3%)<br>0,153±0,004 (эксп. 2: 32±3%)  | 1,0±0,1                               |

<sup>а</sup>X – 1',2'-дидезоксирибозный остаток.

<sup>б</sup> Поскольку кинетические кривые являются биэкспонентами, для каждого иМ даны два значения K, соответствующие двум экспонентам (эксп. 1 и эксп. 2). Относительные вклады этих экспонент (в процентах) указаны в скобках. Средние значения и стандартное отклонение рассчитывались для трех повторов.

Для оценки влияния нуклеотидной замены на кинетику конформационных переходов оцОДН–иМ при изменении pH применяли метод остановленного потока. Кинетические кривые изменения флуоресценции FAM в ответ на скачки pH 6,6↔7,2 (**Рисунок 2.3.21Г**) имели вид биэкспонент, что можно объяснить наличием двух изоформ иМ: 5'Е (5'-концевой цитозин участвует в образовании наружной гемипротонированной пары) и 3'Е (наружная гемипротонированная пара содержит 3'-концевой цитозин). Модификация иМ не влияла на кинетику отклика на скачок pH 6,6→7,2, но заметно увеличивала наблюдаемые константы скорости обратных процессов (соответственно, сокращалось время сворачивания иМ –  $T_{1/2\_pH\ 7,2 \rightarrow 6,6}$ ). Мы предполагаем, что данный эффект обусловлен стерическим фактором. Эффект нарастал при переходе от единичной модификации к модификации всех петель. Сходного результата можно ожидать при эксцизии гетероциклических оснований в возможных сайтах образования иМ геномной ДНК.

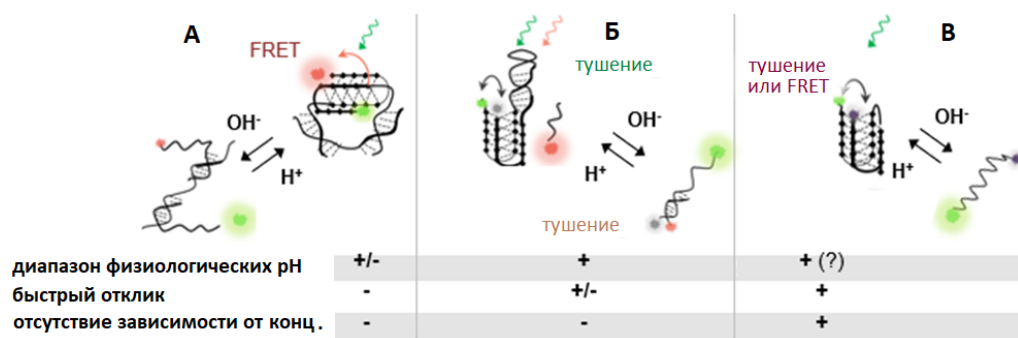


**Рисунок 2.3.21.** Чувствительность к pH и кинетика сворачивания/разворачивания SHA иМ из промотора гена *SHANK1* и его аналогов (SHA1-3). (А) Структура 1',2'-дидезоксирибозной замены (X); (Б) Схематическое изображение иМ и модифицированных положений; (В) Кривые зависимости сигнала иМ от pH, полученные при регистрации флуоресценции FAM (черные) и TAMRA (красные); (Г) Кинетические кривые разворачивания (pH 6,6 → 7,2) и сворачивания (pH 7,2 → 6,6) иМ, полученные путем регистрации изменений FAM-флуоресценции при скачках pH.

Таким образом, мы разработали несколько нуклеотидных модификаций, позволяющих регулировать стабильность и кинетические параметры содержащих их иМ. Кроме того, мы обнаружили ряд геномных последовательностей, образующих иМ, с быстрым откликом на малые изменения pH вблизи физиологически релевантных значений. Полученные результаты вдохновили нас на последующую разработку мономолекулярных pH-сенсоров.

Обычно иМ, используемые в ДНК-наноустройствах и биосенсорах, термодинамически нестабильны в нейтральных средах и имеют  $pH_{1/2}$  в диапазоне 5–6 [524–526]. Например, первый биосовместимый pH-сенсор [514,516], основанный на модельной межмолекулярной структуре иМ (**Рисунок 2.3.22А**), демонстрировал  $pH_{1/2}$  в диапазоне 5,5–6,8. Внутримолекулярная структура, которая претерпевает сворачивание/разворачивание при pH, близком к физиологическому (6,5–7,4) [527], была получена путем соединения иМ и шпилечного модулей (**Рисунок 2.3.22Б**). Оба сенсора основывались на сложных перестройках иМ-дуплекс. Такие системы имеют концентрационную зависимость и довольно медленно реагируют на незначительные изменения pH, которые можно ожидать в живых системах [514].

Мы попытались преодолеть эти ограничения и упростить конструкцию сенсора, выбрав подходящий внутримолекулярный иМ и удалив лишние цепи и модули (**Рисунок 2.3.22В**). Поскольку свернутые геномные иМ, по-видимому, образуются в живых клетках [268], мы рассмотрели их в качестве основы сенсоров. Интересно, что промоторы генов, связанных с нейронной активностью, обогащены сайтами, склонными к образованию иМ [44,267]. Внутриклеточные изменения pH, например, вызванные процессами, связанными с нейровоспалением или нейродегенерацией [528,529], могут вызывать конформационные перестройки участков, склонных к образованию иМ, и в результате приводить к изменениям в экспрессии генов. Пограничная термическая стабильность (свернутая фракция  $<1$  при 37 °C) геномных иМ и сенсоров на основе иМ, таких как последовательности «C<sub>5</sub>+(N<sub>1–19</sub>C<sub>5</sub>+)» [44], при физиологическом pH согласуется с гипотезой об адаптивном изменении транскрипционного профиля при нарушении гомеостаза pH за счет сворачивания/расплетения промоторных иМ как встроенных в геном pH-сенсоров.



**Рисунок 2.3.22.** Схематическое изображение межмолекулярных (А и Б) и внутримолекулярных (В) pH-сенсоров на основе искусственных и геномных иМ-образующих последовательностей соответственно.

Для получения кандидатов в сенсоры на основе геномных последовательностей (**Рисунок 2.3.22В**) мы рассмотрели известные последовательности из средней области

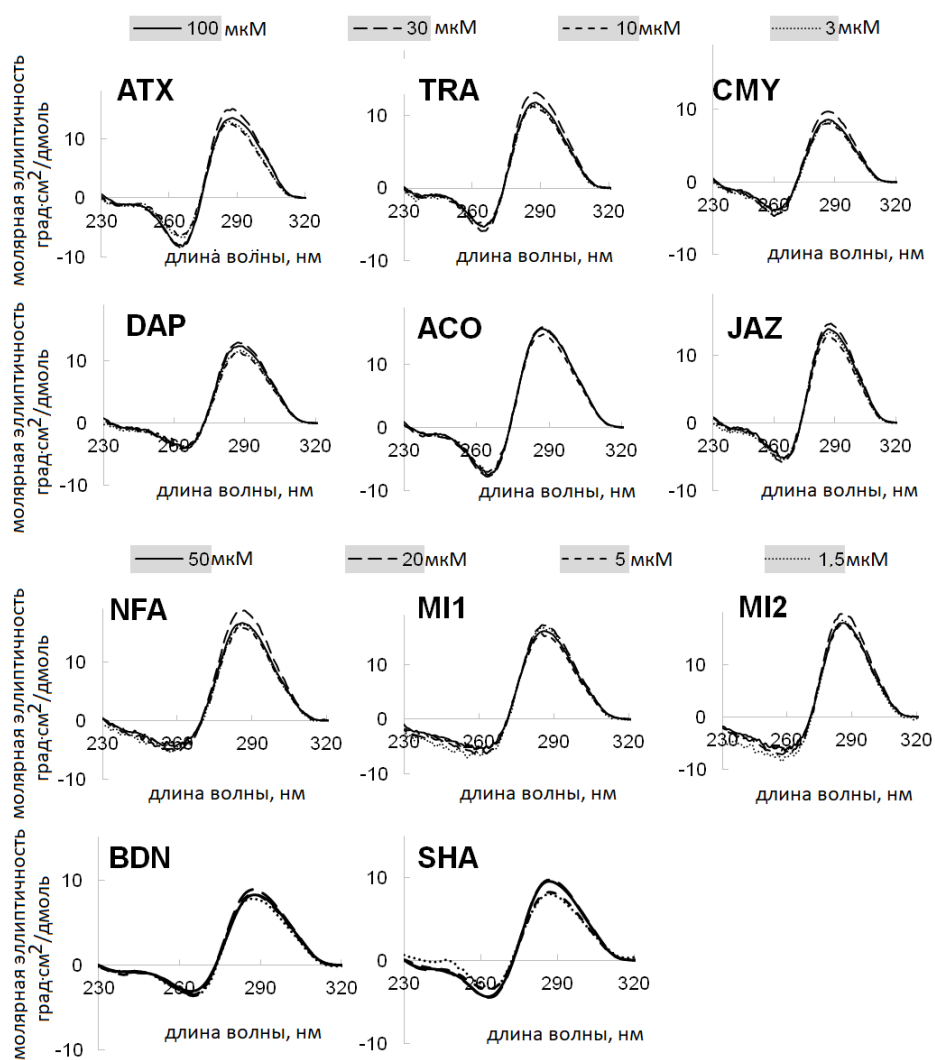
промотора протоонкогена *KRAS* (MI1 и MI2) [118], из промотора протоонкогена *MYC* (CMY) [431] и ранее охарактеризованные последовательности «C<sub>5</sub>+(N<sub>1-19</sub>C<sub>5+</sub>)<sub>3</sub>» [44]. С учетом критерия пограничной термостабильности мы выбрали иМ с рН<sub>1/2</sub> близким к 7, T<sub>1/2</sub> > 17°C при рН 7 и минимальным гистерезисом: ATX, NFA, TRA, ACO, DAP и JAZ (Таблица 2.3.7). Трехбуквенные коды представляют собой сокращения названий соответствующих генов. Например, последовательность ATX (24-мерный олиго-dC) была выбрана из гена *ATXN2L*, связанного с реакцией на стресс, который кодирует атаксин-2-подобный белок, тогда как последовательность DAP получена из гена *DAP*, кодирующего регулятор апоптоза. Мы также дополнили набор известных последовательностей иМ двумя последовательностями «C<sub>5</sub>+(N<sub>1-19</sub>C<sub>5+</sub>)<sub>3</sub>», BDN и SHA, выделенными из генов *BDNF* и *SHANK1* соответственно. Ген *BDNF* кодирует нейротрофический фактор головного мозга, который участвует в росте, выживании и пластичности нейронов [530], тогда как ген *SHANK1* кодирует белок с анкириновыми повторами, важный участник синаптической передачи [531].

**Таблица 2.3.7.** Последовательности геномных иМ.

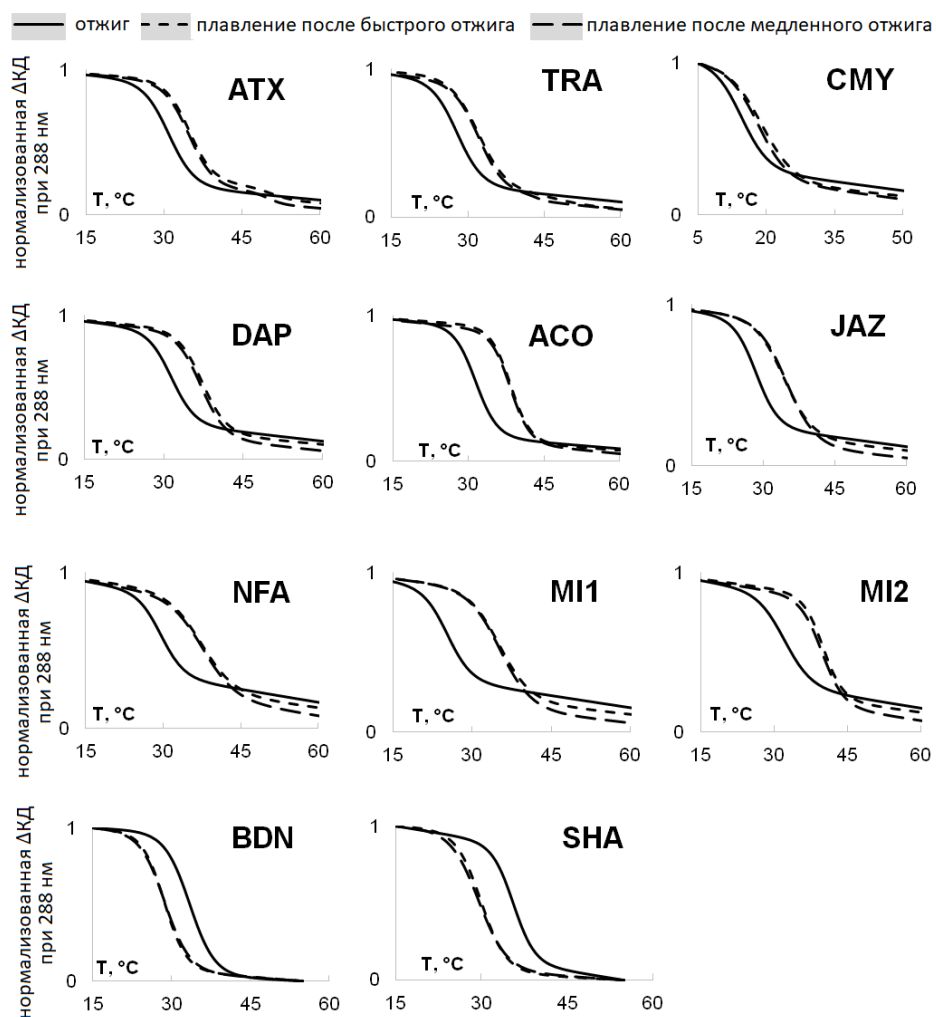
| шифр | ген               | Последовательность (3'→5')                     |
|------|-------------------|--|
| ATX  | <i>ATXN2L</i>     | CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC                       |
| NFA  | <i>NFATC1</i>     | CCCCGTTTCCCCCGCCAGCCCCAGCGCCCCCTGCCCGGCCCC     |
| TRA  | <i>TRABD</i>      | CCCCGCCCCCCCCCCCCCCCC                          |
| ACO  | <i>AC017019.1</i> | CCCCCTCCCCCTCCCCCTCCCC                         |
| DAP  | <i>DAP</i>        | CCCCGCCCCCGCCCCCGCCCCGCCCC                     |
| JAZ  | <i>JAZF1</i>      | CCCCCCCCGCCCCCGCCCCCGCCCTCCCC                  |
| MI1  | <i>KRAS</i>       | CCCCGCTCCTCCCCCGCCGCCCCGCCCCGCCCCCTCCTTCTCCCC  |
| MI2  | <i>KRAS</i>       | CCCCGCTCCTCCCCCGCCGCCCCGCCCCGCCCCCTCCTTCTCCCCG |
| CMY  | <i>c-Myc</i>      | CCCCACCTCCCCACCTCCC                            |
| BDN  | <i>BDNF</i>       | CCCCCCCCCCCCGCCCCCGCCCC                        |
| SHA  | <i>SHANK1</i>     | CCCCCTCCCCCACCCCCACCCC                         |

Используя КД-спектроскопию, мы проверили сворачивание ОДН в псевдофизиологическом Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфере. Все иМ были свернуты, по крайней мере частично, при рН 6,7 (Рисунок 2.3.23). Используя метод КД-плавления/отжига (Рисунок 2.3.24), мы оценили термическую стабильность (T<sub>1/2</sub>) и гистерезис (T<sub>пл</sub>-T<sub>о</sub>) иМ в различных концентрациях. Стабильность CMY, единственного иМ, не соответствующего формуле «C<sub>5</sub>+(N<sub>1-19</sub>C<sub>5+</sub>)<sub>3</sub>» [44], была относительно низкой и зависела от концентрации. При высоких микромолярных концентрациях для CMY нельзя исключить межмолекулярные структуры. Другие иМ показали значения T<sub>1/2</sub> в диапазоне 30–37°C, с незначительной зависимостью T<sub>1/2</sub> от концентрации и гистерезисом, не превышающим 10°C, что указывает на внутримолекулярные структуры [44] (Рисунок 2.3.25). Таким образом, мы пришли к выводу, что эти иМ можно использовать для разработки рН-сенсоров.

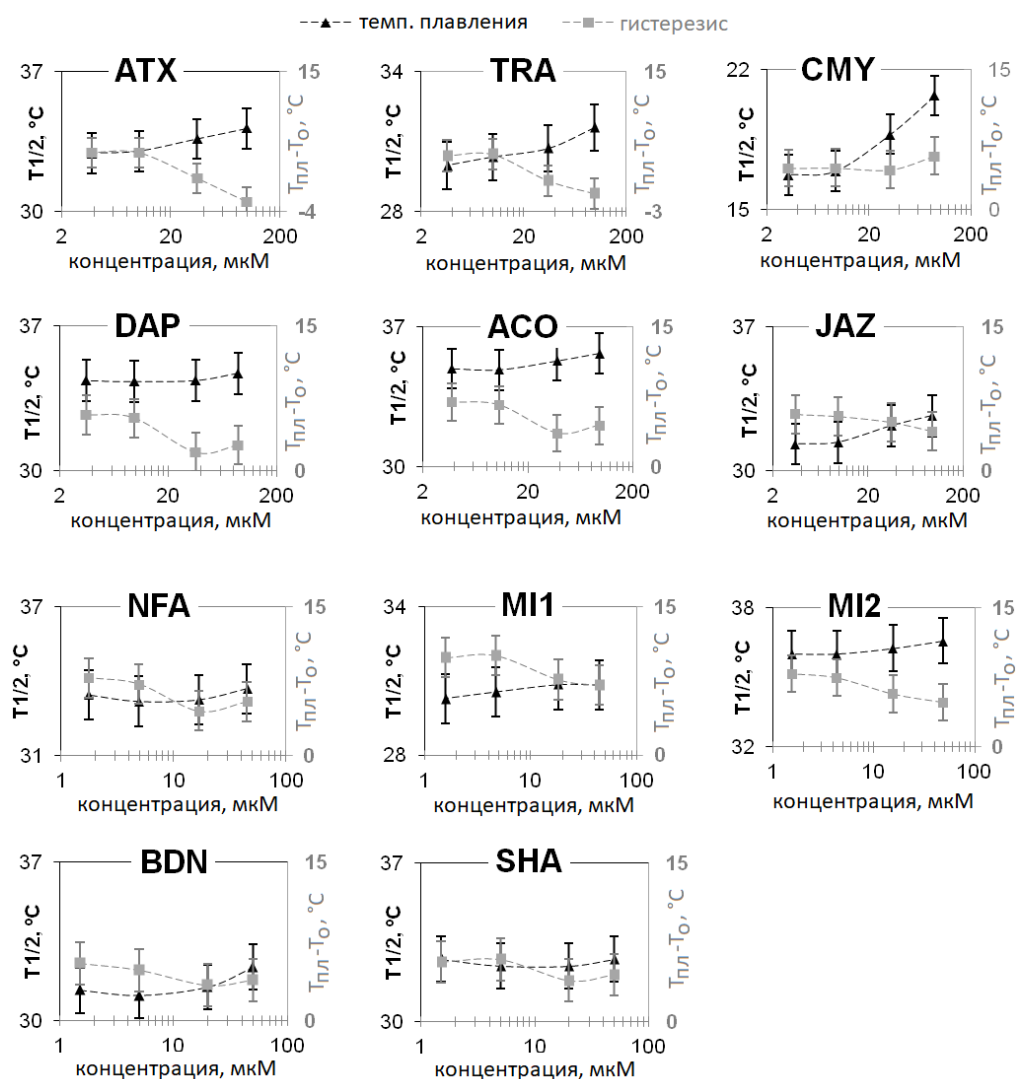




**Рисунок 2.3.23.** КД-спектры геномных иМ. Условия: 140 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфер, pH 6,7, 5 мМ KCl. Температура: 15°C.

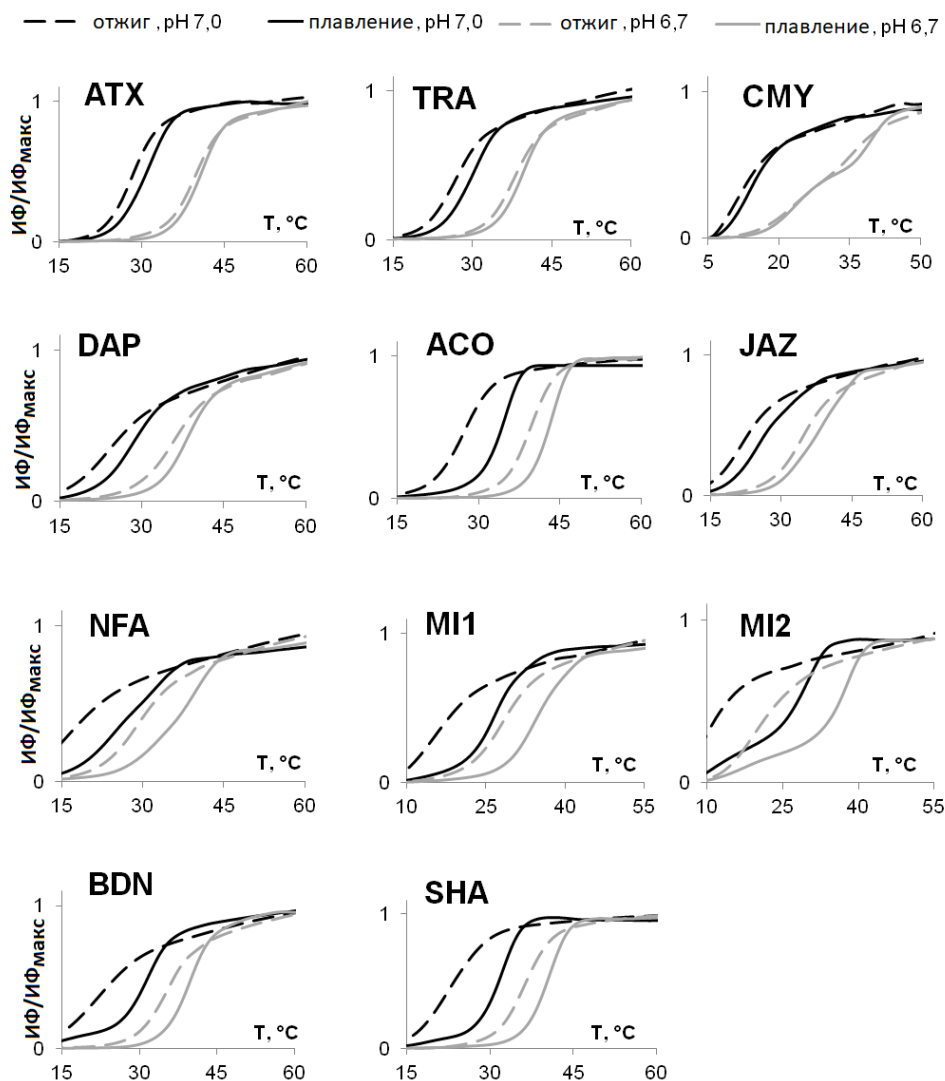


**Рисунок 2.3.24.** Кривые плавления и отжига геномных иМ. Условия: 140 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  буфер, pH 6,7, 5 мМ KCl. Концентрация ОДН: 3 мкМ. Скорость нагрева/охлаждения в экспериментах по плавлению/медленному отжигу:  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ .

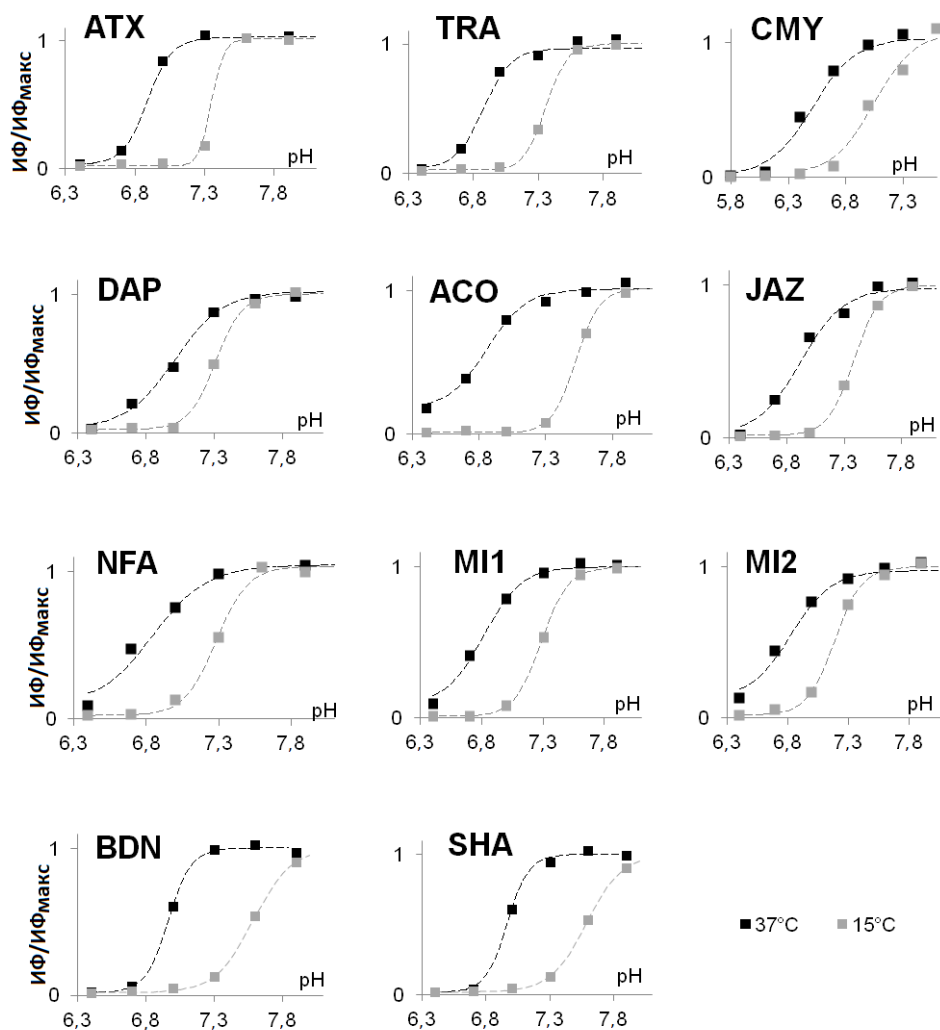


**Рисунок 2.3.25.** Концентрационная зависимость термостабильности ( $T_{1/2}$ ) и гистерезиса иМ. Условия: 140 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  буфер, pH 6,7, 5 мМ KCl. Скорость нагрева/охлаждения: 1°C/мин.  $T_{1/2} = (T_{\text{пл}} + T_0)/2$ , Гистерезис =  $T_{\text{пл}} - T_0$ .

Чтобы получить прототипы pH-сенсоров, мы ввели FAM и BNQ1 по 5' и 3' концам иМ соответственно. Чтобы охарактеризовать термическую и pH-стабильность меченых иМ, мы отслеживали изменения ИФ FAM в ответ на изменения температуры (**Рисунок 2.3.26**) и pH (**Рисунок 2.3.27**).



**Рисунок 2.3.26.** Кривые плавления и отжига FAM-BHQ1-меченных иМ. ИФ/ИФ<sub>макс</sub> — нормированные изменения ИФ FAM. Скорость нагрева/охлаждения: 1°C/мин. Концентрация ОДН: 3 мкМ. Условия: 140 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфер, pH 7,0 или 6,7 с добавлением 10 мМ NaCl.



**Рисунок 2.3.27.** pH-зависимость меченых иМ. ИФ/ИФ<sub>макс</sub> – нормированные изменения флуоресценции FAM (среднее трех измерений,  $\text{CO} \leq 5\%$ ). Условия: 140 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  буфер с добавлением 10 мМ NaCl. Концентрация ОДН: 3 мкМ.

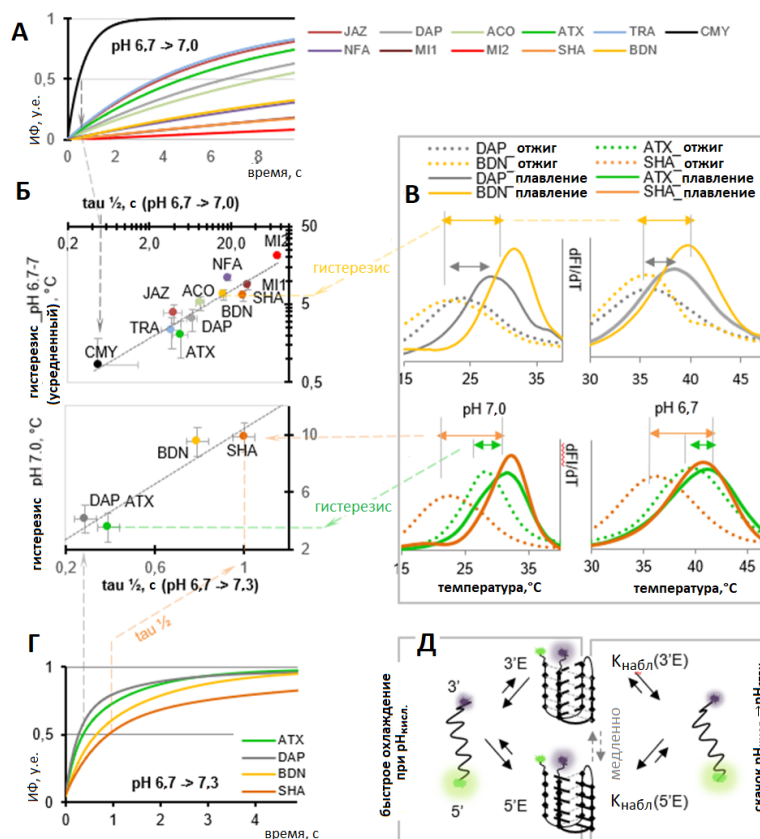
Значения  $T_{1/2}$ , гистерезиса и  $\text{pH}_{1/2}$ , а также относительная яркость и контрастность (отношение сигналов при pH 7,9 и 6,4) всех кандидатов в сенсоры приведены в **Таблице 2.3.8**. При 37°C все меченые иМ, за исключением СМУ, показали довольно резкие переходы с контрастом от умеренного до высокого и псевдолинейными графиками зависимости сигнала от pH в диапазоне pH 6,7–7,3, что указывает на возможность их применимости для визуализации внутриклеточного pH.

**Таблица 2.3.8.** Меченые иМ: чувствительность к рН, термическая стабильность и гистерезис.

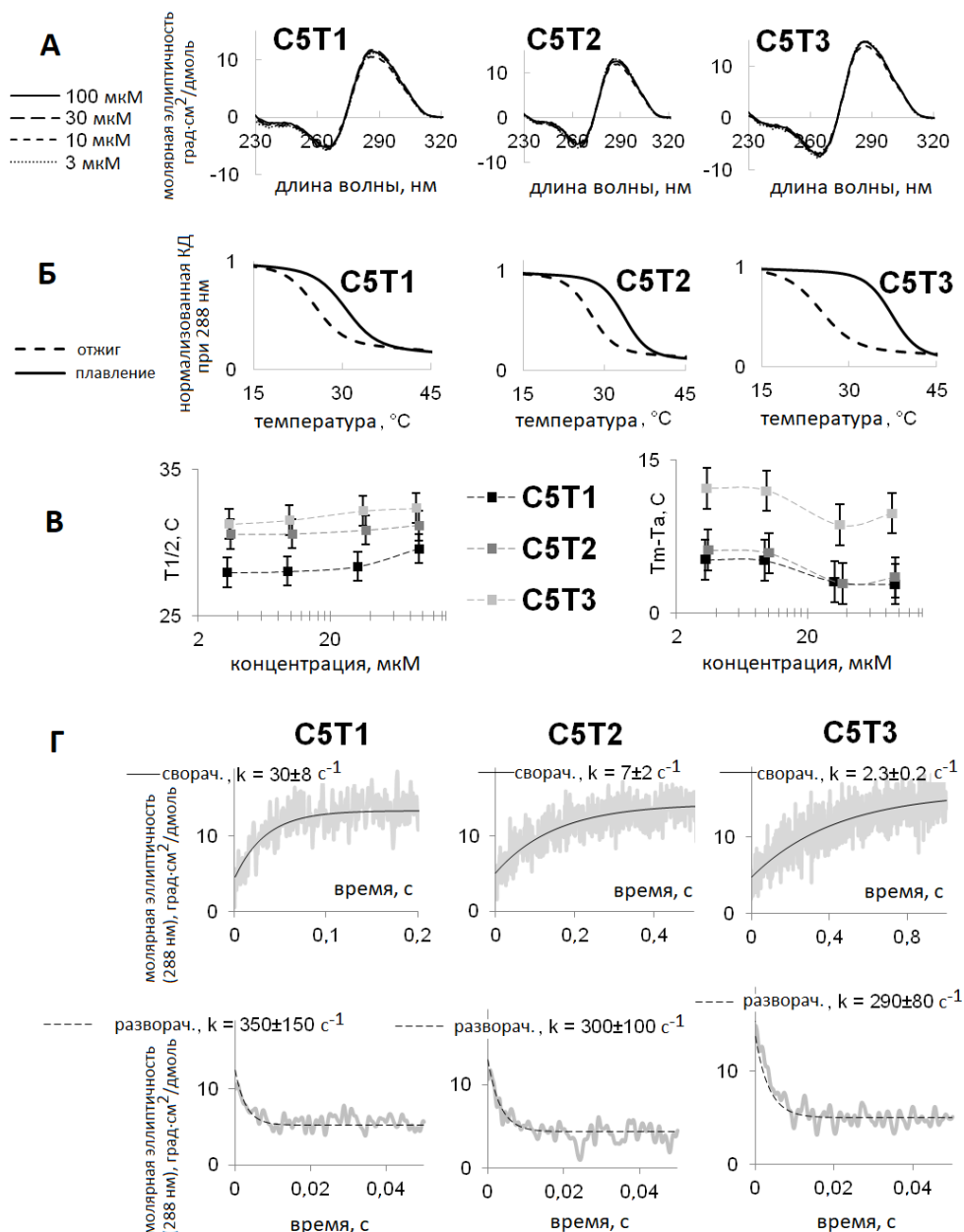
| шифр иМ | ИФ <sub>макс</sub> , %<br>37°C (15°C) | ИФ <sub>рН7,9</sub> /ИФ <sub>рН6,4</sub> ,<br>37°C (15°C) | рН <sub>1/2</sub> ±0,1,<br>37°C (15°C) | T <sub>1/2</sub> ±1°C,<br>рН 7 (6,7) | T <sub>пл</sub> -T <sub>о</sub> ±2°C,<br>рН 7 (6,7) |
|---------|---------------------------------------|---|--|--------------------------------------|---|
| DAP     | 71 (51)                               | 29 (45)   | 7,0 (7,3)                              | 26 (37)                              | 4 (3)   |
| SHA     | 72 (72)                               | 58 (99)   | 7,0 (7,7)                              | 27 (39)                              | 10 (5)  |
| BDN     | 66 (49)                               | 42 (61)   | 7,0 (7,6)                              | 27 (38)                              | 10 (4)  |
| ATX     | 99 (89)                               | 30 (52)   | 6,9 (7,4)                              | 30 (41)                              | 4 (1)   |
| TRA     | 80 (67)                               | 26 (38)   | 6,9 (7,4)                              | 29 (39)                              | 3 (1)   |
| ACO     | 98 (92)                               | 6 (107)   | 6,8 (7,5)                              | 31 (42)                              | 7 (3)   |
| JAZ     | 100(82)                               | 45 (68)   | 6,8 (7,4)                              | 23 (37)                              | 4 (4)   |
| MI1     | 55 (49)                               | 10 (77)   | 6,8 (7,3)                              | 21 (31)                              | 12 (6)  |
| MI2     | 64 (59)                               | 8 (55)  | 6,7 (7,2)                              | 19 (28)                              | 23(19)  |
| NFA     | 66 (52)                               | 11 (42)   | 6,7 (7,3)                              | 20 (35)                              | 9 (11)  |
| CMY     | 70 (62)                               | 2 (41)  | 6,5 (7,0)                              | 13 (23)                              | 3 (0)   |

Выбор оптимального сенсора зависит от конкретной задачи, и важным аспектом, который следует учитывать в этом отношении, является кинетика отклика. С помощью ОПФ мы изучили изотермическую кинетику отклика сенсора на скачки рН 6,7→7,0 (**Рисунок 2.3.28А**). Такой скачок рН предполагает переход от свернутого/частично свернутого к частично развернутому иМ при 37°C (**Рисунок 2.3.26**). Во всех случаях, кроме СМУ, конечная точка (рН 7,0) была близка к середине диапазона перехода (**Рисунок 2.3.26**), поэтому скорости как сворачивания, так и разворачивания вносили вклад в наблюдаемую кинетику перехода рН 6,7→7,0. СМУ был в основном развернутым как при рН 6,7, так и при 7,0 (**Рисунок 2.3.26**), поэтому вклад скорости сворачивания иМ в общую кинетику рН 6,7 → 7,0 был небольшим, и это приводило к быстрому отклику СМУ. Интересно, что время отклика ( $\tau_{1/2}$ ) варьировалось в соответствии со значениями гистерезиса ( $T_{пл}-T_o$ ) (**Рисунок 2.3.28Б**). Обычно разница между кривыми отжига и плавления (**Рисунок 2.3.28В**) указывает на скорость отклика на температуру, тогда как скорость отклика на рН связана с изотермическим гистерезисом ( $рН_{1/2}^{сворачивание}-рН_{1/2}^{разворачивание}$ ). Мы обнаружили интересную корреляцию между характеристиками, связанными с рН и температурой: уменьшение гистерезиса ( $T_{пл}-T_o$ ) приводит к более быстрой реакции на изменения рН (**Рисунок 2.3.28А-В**). Чтобы дополнительно проверить этот тезис, мы проанализировали дополнительный набор иМ (С5Т1, С5Т2 и С5Т3) с помощью КД-спектроскопии, КД-плавления и метода остановленного потока с контролем по КД (ОПКД) (**Рисунок 2.3.29**). Немеченые последовательности С5Т1, С5Т2 и С5Т3 состояли из С5-трактов, разделенных петлями из 1, 2 или 3 остатков тимидина (Т) соответственно. В соответствии с предыдущими наблюдениями [44], гистерезис и время отклика этих трех иМ на скачки рН увеличивались с увеличением длины петель (**Рисунок 2.3.29**). Полученные результаты

иллюстрируют сходство между разворачиванием/повторным сворачиванием иМ, обусловленными рН и температурой.



**Рисунок 2.3.28.** Кинетика и термодинамика меченых геномных иМ. (А) Кинетические кривые, полученные при скачках рН 6,7→7,0 (имитация стационарного внутриклеточного восстановления рН после подкисления). Условия: 140 мМ К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>/КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> буфер, концентрация ОДН: 3 мкМ, 37 °С. (Б) Связь между откликом иМ на скачки рН 6,7→7,0 (вверху) или 6,7→7,3 (внизу) и гистерезисом (Т<sub>пл</sub>-Т<sub>о</sub>). (В) Оценка гистерезиса иМ (Т<sub>пл</sub>-Т<sub>о</sub>) на основе первых производных кривых FRET-плавления (сплошные линии) и отжига (пунктирные линии). Условия: 140 мМ К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>/КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> буфер, рН 7,0 (слева) или 6,7 (справа), концентрация ОДН: 3 мкМ. (Г) Кинетические кривые выбранных меченых иМ (кандидатов в сенсоры), полученные при скачках рН 6,7→7,3 (имитация восстановления стационарного внутриклеточного рН после подкисления). Условия: 140 мМ К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>/КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> буфер, концентрация ОДН: 3 мкМ, 37 °С. (Д) Схематическое изображение предполагаемого кинетического распределения сворачивания иМ, т.е. образования двух конформеров с 3'-концевым или 5'-концевым цитозином во внешней С-С<sup>+</sup> паре (3'Е и 5'Е соответственно) при быстром подкислении или резком охлаждении в кислой среде (рН<sub>кисл.</sub>) после отжига и их последующее разворачивание. Оба конформера вносят вклад в кинетические кривые, полученные при скачках рН, имитирующих нейтральное (стационарное) восстановление рН после подкисления (рН<sub>кисл.</sub>→рН<sub>стац.</sub>).

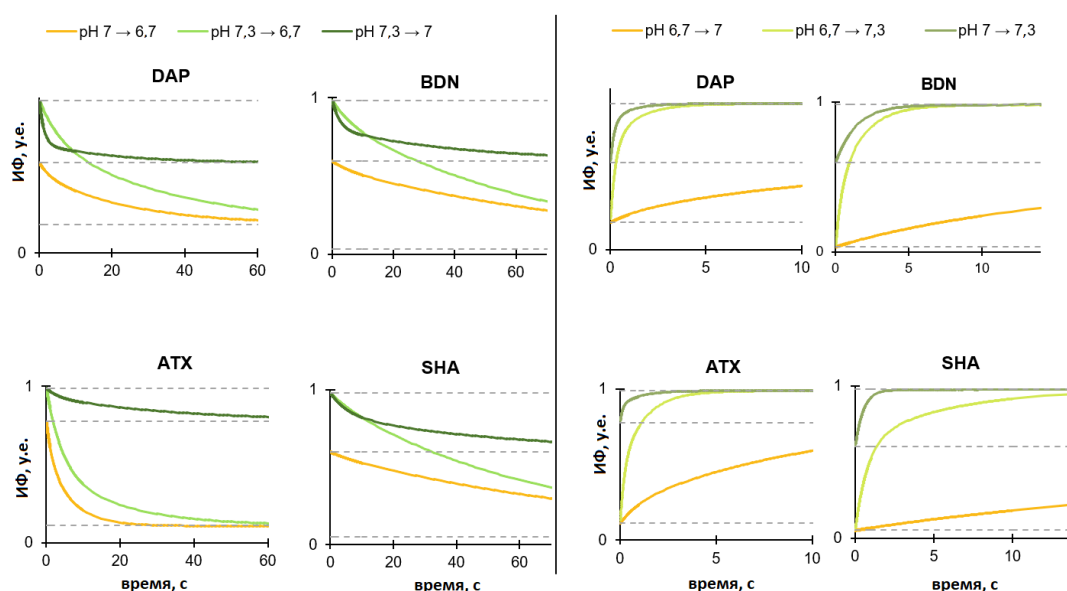


**Рисунок 2.3.29.** Связь между переходами в модельных иМ, вызванными изменениями рН и температуры. (А) КД-спектры, полученные при 15 °C. Условия: 140 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфер, рН 6,7, 5 мМ KCl. (Б) Кривые плавления и отжига, полученные при концентрации ОДН 3 мкМ. Скорость нагрева/охлаждения: 1 °C/мин. (В) Концентрационная зависимость термостабильности ( $T_{1/2}$ ) и гистерезиса ( $T_{пл} - T_o$ ) модельных иМ. (Г) Кинетические кривые, полученные при скачках рН 8 → 6 (верхняя панель) и 6 → 8 (нижняя панель) с регистрацией КД при 288 нм.

Для проведения детальных исследований кинетики мы выбрали четыре меченых иМ (DAP, ATX, BDN и SHA) с высокой и умеренной скоростью отклика при рН 6,7→7,0 (Рисунок 2.3.28А),  $T_{1/2} \geq 37^\circ\text{C}$  при рН 6,7 и  $pH_{1/2} \geq 6,9$  при 37 °C (Таблица 2.3.8). До



настоящего времени кинетика иМ изучалась преимущественно при резких скачках рН [8,514]. Мы исследовали отклик сенсоров на незначительные изменения рН в районе  $pH_{1/2}$ , поскольку внутриклеточные изменения рН, за исключением изменений в лизосомах, умерены [514]. Сворачивание/разворачивание иМ в таких условиях было обратимым; следовательно, как  $k^{\text{сворачивание}}$ , так и  $k^{\text{разворачивание}}$  вносят вклад в наблюдаемые константы скорости ( $K_{\text{набл.}}$ ). Основные кинетические параметры иМ-переходов приведены в **Таблице 2.3.9**. Кинетические кривые (**Рисунок 2.3.28Г** и **Рисунок 2.3.30**) были биэкспоненциальными, что могло указывать на двухэтапный процесс с частично развернутыми иМ, дуплексами или триплексами в качестве возможных промежуточных форм [532]. Альтернативно, биэкспоненциальная кинетика может возникнуть в результате явления кинетического распределения [523] (**Рисунок 2.3.28Д**).



**Рисунок 2.3.30.** Кинетические кривые кандидатов в сенсоры при скачках рН  $6,7 \leftrightarrow 7,3$ . Кривые регистрировали при  $37^\circ\text{C}$  с регистрацией флуоресценции при максимуме эмиссии FAM (520 нм). Концентрация ОДН: 3 мкМ. Буфер: 140 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

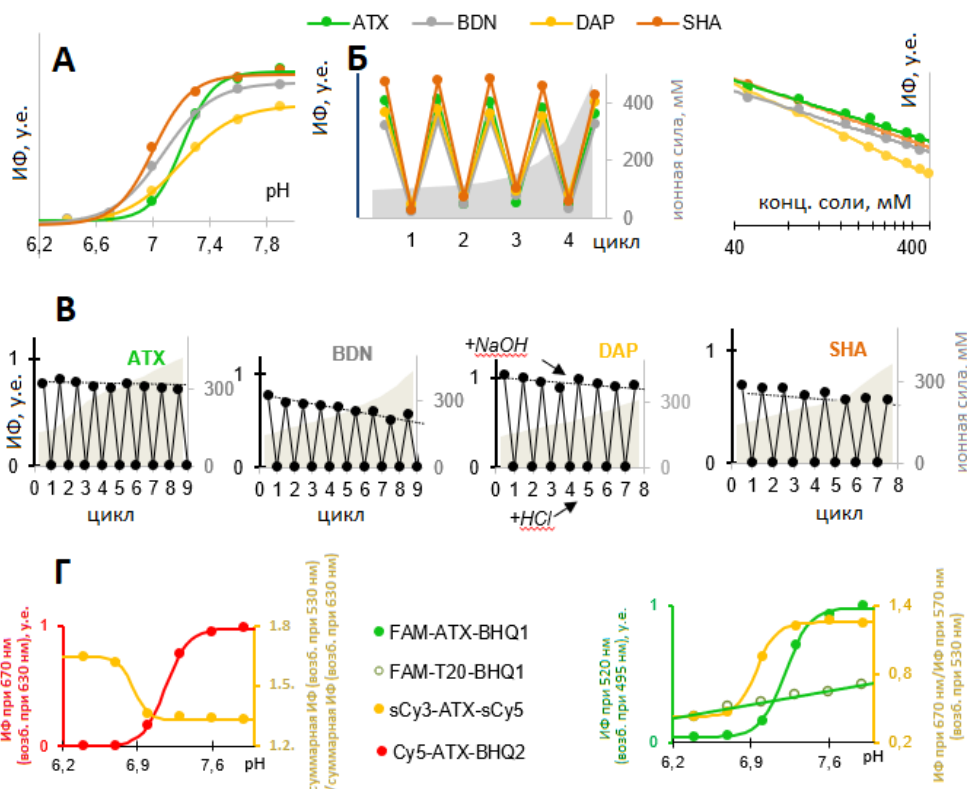
**Таблица 2.3.9.** Кинетика отклика выбранных меченых иМ (кандидатов в сенсоры) на незначительные изменения рН в пределах физиологического диапазона.

| рН скачок 6,7↔7,0 |  |                                       |   |                                    |
|-------------------|--|---------------------------------------|---|------------------------------------|
| Шифр иМ           | $K_{\text{набл}} 6,7 \rightarrow 7,0, \text{ c}^{-1}$  | $\tau_{1/2}, \text{ c}$<br>рН 6,7→7,0 | $K_{\text{набл}} 7,0 \rightarrow 6,7, \text{ c}^{-1}$   | $\tau_{1/2}, \text{ c}$<br>7,0→6,7 |
| <b>ATX</b>        | 1,2±0,1 (эксп. 1, 14%);<br>0,11±0,01 (эксп. 2, 86%)    | 4,8                                   | 0,65±0,08 (эксп. 1, 30%);<br>0,16±0,01 (эксп. 1, 70%)   | 2,8                                |
| <b>DAP</b>        | 0,68±0,08 (эксп. 1, 14%);<br>0,08±0,01 (эксп. 2, 86%)  | 6,8                                   | 0,33±0,03 (эксп. 1, 19%);<br>0,04±0,01 (эксп. 2, 81%)   | 12                                 |
| <b>BDN</b>        | 0,14±0,02 (эксп. 1, 20%);<br>0,03±0,01 (эксп. 2, 80%)  | 16,2                                  | 0,17±0,01 (эксп. 1, 8%);<br>0,01±0,003 (эксп. 2, 92%)   | 57,8                               |
| <b>SHA</b>        | 0,14±0,02 (эксп. 1, 7%);<br>0,022±0,002 (эксп. 2, 93%) | 28,1                                  | 0,19±0,03 (эксп. 1, 4%);<br>0,011±0,002 (эксп. 2, 96%)  | 60,8                               |
| рН скачок 7,0↔7,3 |  |                                       |   |                                    |
| Шифр иМ           | $K_{\text{набл}} 7,0 \rightarrow 7,3, \text{ c}^{-1}$  | $\tau_{1/2}, \text{ c}$<br>рН 7,0→7,3 | $K_{\text{набл}} 7,3 \rightarrow 7,0, \text{ c}^{-1}$   | $\tau_{1/2}, \text{ c}$<br>7,3→7,0 |
| <b>ATX</b>        | 8±2 (эксп. 1, 53%);<br>0,96±0,06 (эксп. 2, 47%)        | 0,2                                   | 0,32±0,08 (эксп. 1, 25%);<br>0,03±0,01 (эксп. 2, 75%)   | 14,1                               |
| <b>DAP</b>        | 5±1 (эксп. 1, 68%);<br>1,0±0,3 (эксп. 2, 32%)          | 0,2                                   | 0,8±0,2 (эксп. 1, 70%);<br>0,04±0,01 (эксп. 2, 30%)     | 1,4                                |
| <b>BDN</b>        | 0,70±0,02 (эксп. 1, 100%)                              | 0,5                                   | 0,42±0,06 (эксп. 1, 46%);<br>0,021±0,002 (эксп. 2, 54%) | 6,1                                |
| <b>SHA</b>        | 2,0±0,2 (эксп. 1, 100%)                                | 0,3                                   | 0,18±0,05 (эксп. 1, 37%);<br>0,018±0,002 (эксп. 2, 63%) | 15,6                               |
| рН скачок 6,7↔7,3 |  |                                       |   |                                    |
| Шифр иМ           | $K_{\text{набл}} 6,7 \rightarrow 7,3, \text{ c}^{-1}$  | $\tau_{1/2}, \text{ c}$<br>рН 6,7→7,3 | $K_{\text{набл}} 7,3 \rightarrow 6,7, \text{ c}^{-1}$   | $\tau_{1/2}, \text{ c}$<br>7,3→6,7 |
| <b>ATX</b>        | 4,5±0,7 (эксп. 1, 42%);<br>0,79±0,04 (эксп. 2, 58%)    | 0,4                                   | 0,23±0,01 (эксп. 1, 59%);<br>0,05±0,01 (эксп. 2, 41%)   | 5,0                                |
| <b>DAP</b>        | 3,8±0,2 (эксп. 1, 64%);<br>0,74±0,07 (эксп. 2, 36%)    | 0,3                                   | 0,18±0,01 (эксп. 1, 29%);<br>0,03±0,01 (эксп. 2, 71%)   | 13,5                               |
| <b>BDN</b>        | 2,8±0,1 (эксп. 1, 33%);<br>0,58±0,01 (эксп. 2, 67%)    | 0,7                                   | 0,17±0,01 (эксп. 1, 12%);<br>0,014±0,001 (эксп. 2, 88%) | 39,2                               |
| <b>SHA</b>        | 1,32±0,04 (эксп. 1, 60%);<br>0,18±0,05 (эксп. 2, 40%)  | 1,0                                   | 0,14±0,03 (эксп. 1, 5%);<br>0,015±0,002 (эксп. 2, 95%)  | 43,8                               |

Кинетическое распределение, то есть образование двух иМ-конформеров при быстром подкислении или охлаждении, и последующая медленная перегруппировка кинетически предпочтительного («быстрого») конформера в термодинамически выгодный («стабильный») (Рисунок 2.3.28Д) объясняет чувствительность некоторых иМ-структур к условиям предварительного отжига и длительному хранению [135,533]. Предыдущие исследования модельных иМ показали, что «быстрым» и «стабильным» конформерами были 3'Е и 5'Е соответственно [523]. Эти результаты были дополнительно подтверждены нашими данными о модифицированных иМ с 5'-концевыми остатками *i*-clamp и гуанидино-*i*-clamp. Модификация фиксировала структуры в конформации 5'Е, повышала их термическую и рН-стабильность и снижала скорость отклика. Таким образом, «быстрые» и «медленные» переходы (эксп. 1 и эксп. 2 в Таблице 2.3.9), которые вносили вклад в

наблюдаемые кинетические параметры меченых иМ, можно отнести к «быстрому» и «стабильному» (предположительно 3'Е и 5'Е) иМ-конформерам.

Скорости как «быстрого», так и «медленного» переходов, индуцированных скачками рН  $6,7 \leftrightarrow 7,0$  и  $6,7 \leftrightarrow 7,3$ , варьировались среди иМ в следующем порядке:  $ATX > DAP > BDN > SHA$ ; это объясняет в целом более быструю кинетику последовательностей  $ATX$  и  $DAP$  по сравнению с кинетикой  $BDN$  и  $SHA$  (**Рисунок 2.3.28Г**). Переходы рН  $6,7/7,0 \rightarrow 7,3$  представляют интерес с точки зрения отслеживания восстановления стационарного состояния клеток после подкисления. Замедленное восстановление рН может лежать в основе нейродегенерации или других патологий, и дальнейшие исследования в этой области требуют быстрых биосовместимых рН-сенсоров [534]. Кандидаты в сенсоры  $DAP$  и  $ATX$  показали многообещающие результаты:  $\tau_{1/2} < 1$  с для перехода рН  $6,7 \rightarrow 7,3$  при  $37^\circ\text{C}$ .  $ATX$  превосходил  $DAP$  по контрастности как при  $37^\circ$  (**Таблица 2.3.8**), так и при комнатной температуре (**Рисунок 2.3.31А**), с изменением ИФ в 8,9 раза в диапазоне рН  $6,7-7,3$ . Важно отметить, что этот параметр сохранялся после нескольких циклов изменения рН (**Рисунок 2.3.31Б и В**). Другие кандидаты в сенсоры также обеспечивали воспроизводимость на протяжении нескольких рабочих циклов. Незначительное снижение  $ИФ_{\text{макс}}$  с увеличением количества циклов можно объяснить зависимостью иМ от ионной силы раствора (**Рисунок 2.3.31Б**). В совокупности полученные результаты показывают, что все иМ потенциально пригодны для внутриклеточного отслеживания рН, причем наиболее многообещающим является  $ATX$ , учитывая его быструю кинетику, обратимость и высокую контрастность.

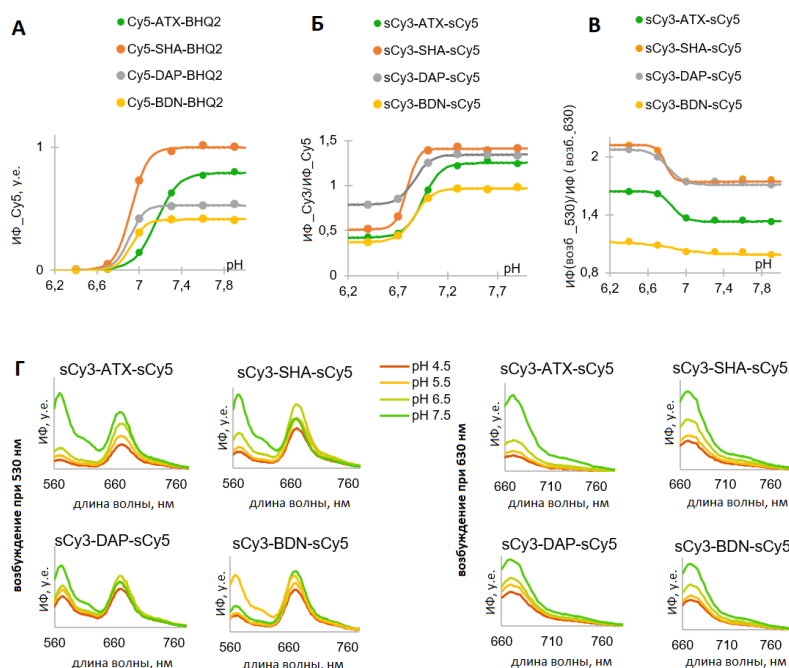


**Рисунок 2.3.31.** Предварительная калибровка кандидатов в сенсоры, проверка воспроизводимости сигнала в течение нескольких рабочих циклов и оптимизация схемы мечения. (А) Зависимость от рН выбранных FAM-BHQ1-меченных иМ. Условия: 140 мМ  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  буфер, комнатная температура. Стандартное отклонение трех измерений не превышало 5%. (Б) Эксперименты по рН-титрованию (незначительные изменения рН). Левый график: изменения ИФ (первичная вертикальная ось, ИФ) FAM-BHQ1-меченных кандидатов в сенсоры при последовательных скачках рН 6,7  $\leftrightarrow$  7,3 в  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  буфере. Ионная сила раствора увеличивалась со 100 до 470 мМ (вторичная вертикальная ось) к 4-му циклу, и ИФ нормализовали до ионной силы 100 мМ раствора для каждого цикла. Правая панель: зависимость ИФ от ионной силы раствора при рН 7,3. (В) Эксперименты по рН-титрованию (резкие изменения рН). Изменение ИФ (первичная вертикальная ось, ИФ) FAM-BHQ1-меченных кандидатов в сенсоры при титровании NaOH/HCl. (Г) Сравнение калибровочных кривых, полученных для кандидатов в сенсоры, меченных FAM/BHQ1, sCy3-sCy5 и Cy5-BHQ2.

Перед внутриклеточной калибровкой кандидатов в сенсоры мы пересмотрели схему мечения. Флуоресценция FAM чувствительна к рН [535]. Таким образом, рН влияет как на собственную ИФ, так и на иМ-зависимую эффективность тушения метки. Чтобы оценить относительный вклад этих двух факторов в зависимость сигнала от рН, мы получили контрольный ОДН FAM-T20-BHQ, неспособный образовывать иМ, и ОДН, способный

сворачиваться в иМ и меченный нечувствительным к рН цианиновым красителем Cy5 [535] и тушителем BHQ2. Кроме того, мы получили серию иМ, меченных FRET-парой флуорофоров: сульфоцианином 3 (sCy3) и сульфоцианином 5 (sCy5). Для всех трех серий кандидатов в сенсоры (иМ, меченные FAM-BHQ1, Cy5-BHQ2 и sCy5-sCy3), была проведена предварительная калибровка (**Рисунок 2.3.31Г** и **Рисунок 2.3.32**).

В физиологическом диапазоне зависимость ИФ FAM от рН в ОДН FAM-T20-BHQ1, не образующем иМ, была, в общих чертах, линейной и незначительной по сравнению с иМ-зависимым тушением FAM в FAM-ATX-BHQ1 (**Рисунок 2.3.31Г**). Кривые рН-зависимости Cy5-ATX-BHQ2 и FAM-ATX-BHQ1 практически накладывались друг на друга, тогда как варианты SHA, DAP и BDN, меченные Cy5-BHQ2, демонстрировали пониженный  $pH_{1/2}$  по сравнению с аналогами, меченными FAM-BHQ1 (**Рисунок 2.3.32**), что указывает на влияние данной пары меток на сворачивание иМ.



**Рисунок 2.3.32.** Предварительная калибровка кандидатов в сенсоры, меченных Cy5-BHQ2 и sCy3-sCy5. Концентрация ОДН: 3 мкм. Буфер: 140 мМ  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ . (А) Зависимость ИФ Cy5 (ИФ при 670 нм) от рН в иМ, меченных Cy5-BHQ2, при возбуждении при 650 нм. (В) Зависимость от рН соотношения ИФ сульфо-Cy3/сульфо-Cy5 (ИФ при 570 нм/ИФ при 670 нм) иМ, меченных sCy3-sCy5, при возбуждении в 530 нм. Каждая точка представляет собой среднее значение трех измерений ( $CO \leq 5\%$ ). (С) Зависимость от рН отношения интегральных ИФ, полученных при возбуждении sCy3-sCy5-меченных иМ в 530 и 630 нм ( $I_{F_{возб\_530}}/I_{F_{возб\_630}}$  нм). Каждая точка представляет собой среднее значение трех измерений ( $CO \leq 5\%$ ). (D) Зависимость эмиссии флуоресценции от рН при возбуждении в 530 нм (слева) или 630 нм (справа).

FRET-меченные иМ оказались функциональными ратиометрическими сенсорами, но уступали FAM-BHQ-меченым аналогам с точки зрения диапазона перехода pH (например,  $pH_{1/2\_sCu3-ATX-sCY5} = 6,9 \pm 0,1$ ;  $pH_{1/2\_FAM-ATX-BHQ1} = 7,2 \pm 0,1$ ) при комнатной температуре (**Рисунок 2.3.31Г** и **Таблица 2.3.10**). Более того, FRET-эффект был частично уравновешен тушением цианина в свернутых иМ (**Рисунок 2.3.32**), предположительно из-за взаимодействий цианина с гемипротонированными С-С парами [536]. Следовательно, соотношение суммарных флуоресценций (при возбуждении sCu3 и sCu5; **Рисунок 2.3.31Г**, левый график) и отношение эмиссии sCu5:sCu3 (при возбуждении sCu3; **Рисунок 2.3.31Г**, правый график) показали противоположную зависимость от pH. Результаты показывают, что метки и ядро иМ влияют друг на друга.

Взаимодействия цианин-цитозин также могут объяснять пониженную положительную кооперативность переходов, обусловленных pH, в sCu3-ATX-sCu5 и Cy5-ATX-BHQ2 по сравнению с FAM-ATX-BHQ1 (значения коэффициента Хилла представлены в **Таблице 2.3.10**). Положительная кооперативность предполагает быстрые переходы. Действительно, среди FAM/BHQ1-меченных кандидатов в сенсоры значения коэффициента Хилла (**Таблица 2.3.10**) варьировались в соответствии со скоростями перехода  $6,7 \leftrightarrow 7,0$  и  $6,7 \leftrightarrow 7,3$  (**Таблица 2.3.9**):  $ATX > DAP > BDN > SHA$ .

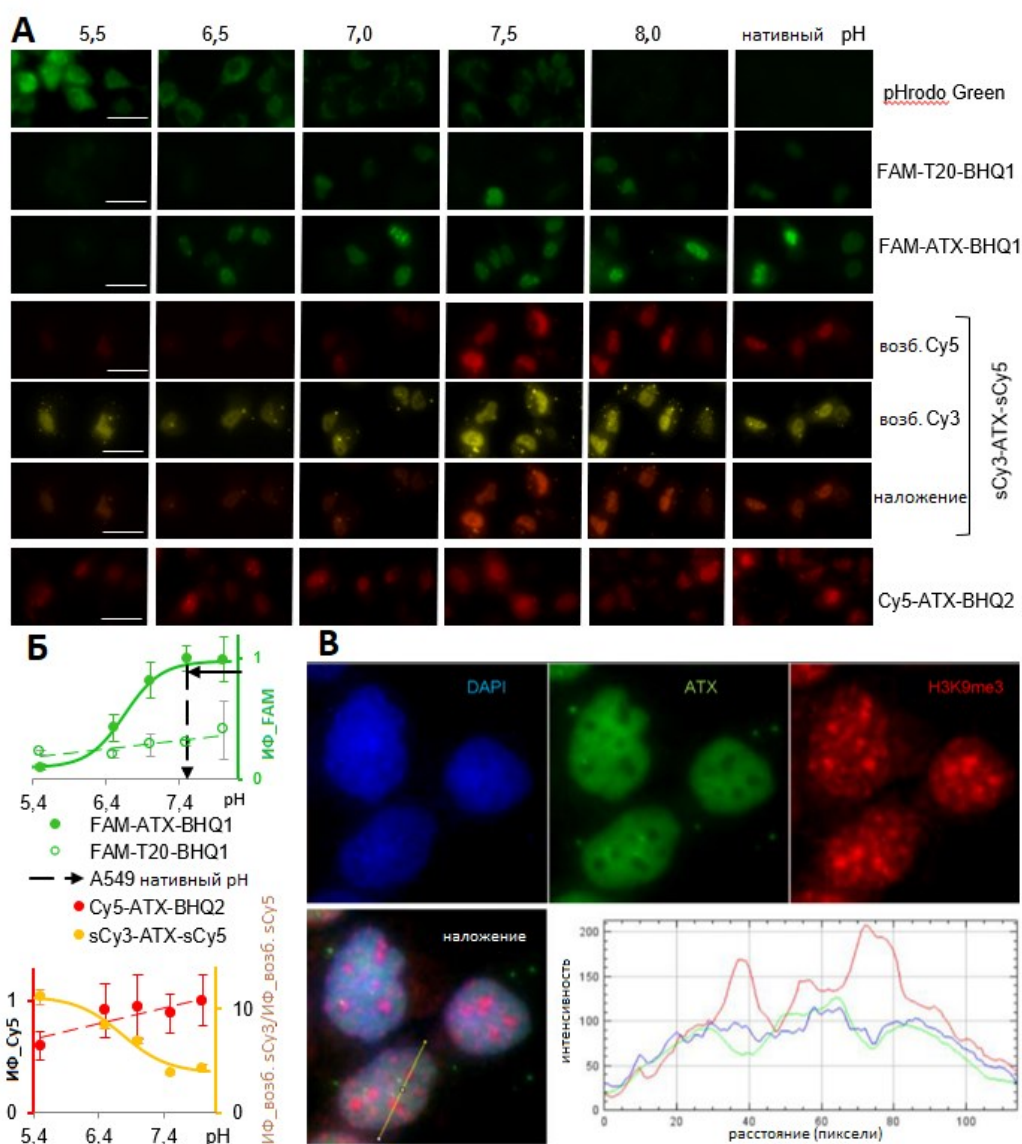
**Таблица 2.3.10.** Предварительная калибровка кандидатов в сенсоры: кооперативность и точки перехода.

| Кандидат в сенсоры | $pH_{1/2}$    | коэффициент Хилла (n) |
|--------------------|---------------|-----------------------|
| FAM-ATX-BHQ1       | $7,2 \pm 0,1$ | $9 \pm 2$             |
| FAM-DAP-BHQ1       | $7,2 \pm 0,1$ | $8 \pm 1$             |
| FAM-BDN-BHQ1       | $7,2 \pm 0,1$ | $5,2 \pm 0,4$         |
| FAM-SHA-BHQ1       | $7,2 \pm 0,1$ | $4,5 \pm 0,1$         |
| sCu3-ATX-sCu5      | $6,9 \pm 0,1$ | $6,5 \pm 0,5$         |
| Cy5-ATX-BHQ2       | $7,2 \pm 0,1$ | $6,9 \pm 0,6$         |

\*Данные получены путем аппроксимации экспериментальных калибровочных кривых *in vitro* (**Рисунок 2.3.31**) к стандартному уравнению доза-эффект  $\text{Сигнал (pHx)} = \text{сигнал}_{\text{мин}} + (\text{сигнал}_{\text{макс}} - \text{сигнал}_{\text{мин}}) / (1 + 10^{(pH_{1/2} - pHx) * n})$ .

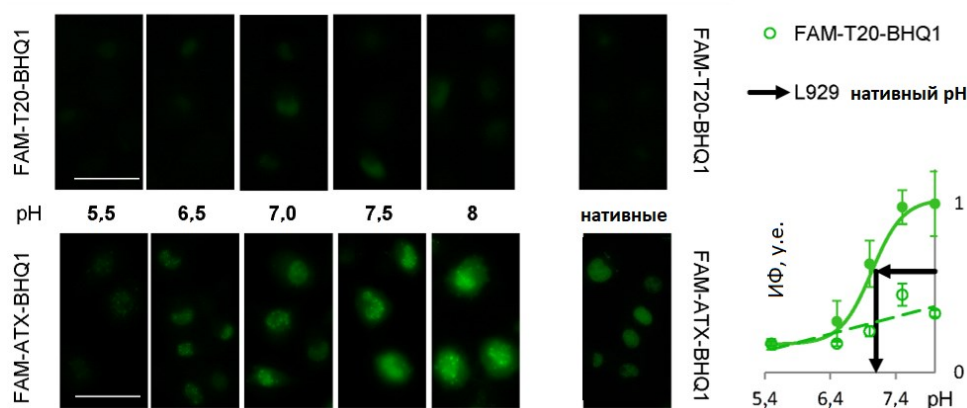
Мы откалибровали сенсоры на клетках карциномы легких человека A549 (**Рисунок 2.3.33А**) и клетках фибробластов мыши L929 (**Рисунок 2.3.34**). Низкомолекулярные соединения pHrodo Green и pHrodo Red использовали в качестве контрольных pH-сенсоров (**Рисунок 2.3.35**). FAM-T20-BHQ (отрицательный контроль) показал незначительную зависимость от pH. Кандидат в сенсоры Cy5-ATX-BHQ2 продемонстрировал плохое соотношение сигнал/шум. Кандидат на ратиометрический сенсор sCu5-ATX-sCu3 был функциональным, но неоптимальным с точки зрения контрастности. Контрастность FAM-ATX-BHQ1 была сопоставима с контрастностью контрольных сенсоров pHrodo Red/Green.

Кроме того, зависимость FAM-ATX-BHQ1 от pH внутри клетки была квазилинейной при  $\text{pH} \sim 7$  и сравнима с зависимостью, наблюдаемой в пробирке (**Рисунок 2.3.32Г**), за исключением слегка уширенного диапазона перехода (**Рисунок 2.3.33Б**).

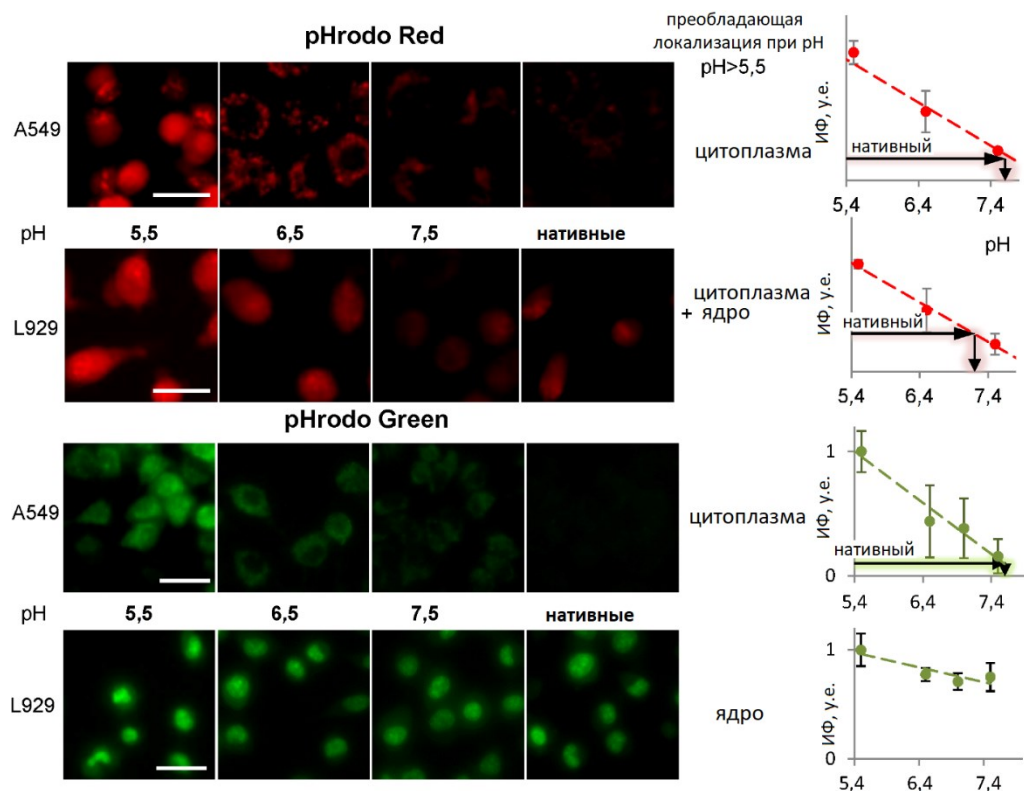


**Рисунок 2.3.33.** Внутриклеточная калибровка сенсоров и анализ их внутриядерного распределения. (А) Изображения, полученные с помощью флуоресцентной микроскопии, клеток A549, трансфицированных сенсорами, после обработки буферами с заданным pH (5,5-8) в присутствии ионофоров или без дополнительной обработки (нативные). (Б) Калибровочные кривые в клетках. (В) Распределение FAM-ATX-BHQ1 в клетках HaCaT; синий, ДАФИ; зеленый, АТХ; красный, метка гетерохроматина H3K9me3.





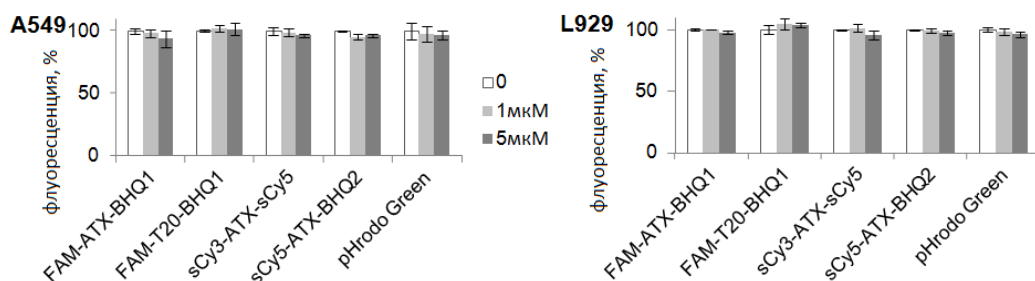
**Рисунок 2.3.34.** Калибровка FAM-ATX-BHQ1 в клетках L929 и определение нативного pH. Флуоресцентная микроскопия клеток L929, трансфицированных FAM-ATX-BHQ1 (сенсор) или FAM-T20-BHQ1 (отрицательный контроль), после обработки клеток буферами с pH 5,5–8 в присутствии ионофоров. Панель «нативные» содержит изображения клеток, не подвергавшихся дополнительной обработке после трансфекции. Масштаб: 50 мкм.



**Рисунок 2.3.35.** Калибровка контрольных сенсоров pHrodo Red/Green и определение нативного pH. Изображения клеток A549 и L929 после добавления pHrodo Red или pHrodo Green (pH 5,5–7,5), получали с использованием флуоресцентного микроскопа после обработки клеток соответствующими буферами в присутствии ионофоров. Панель «нативные» содержит изображения клеток, не подвергавшихся дополнительной обработке после трансфекции. Планки масштаба: 50 мкм.

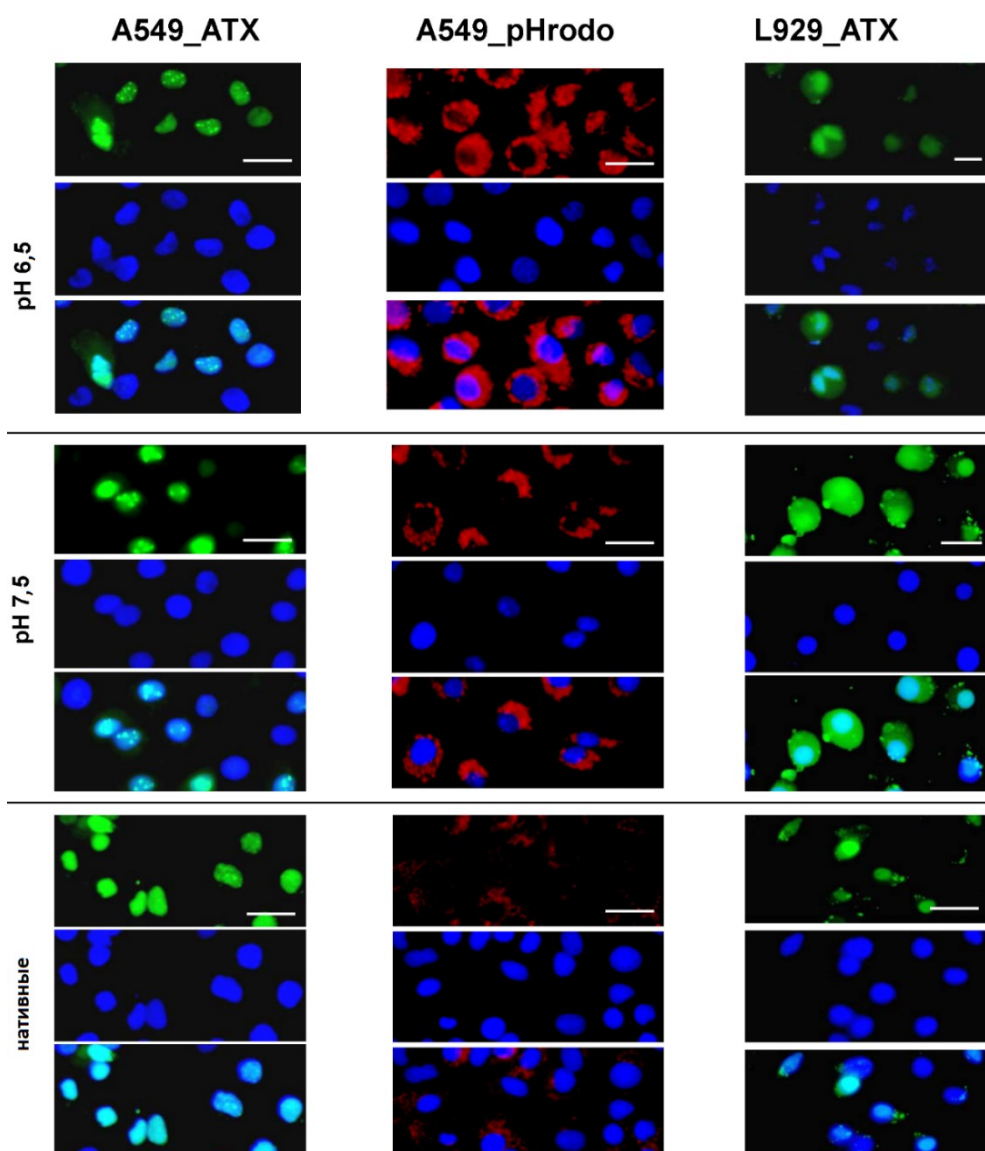


Поскольку цитотоксичность кандидатов в сенсоры может повлиять на внутриклеточные измерения pH, мы провели анализы жизнеспособности клеток с помощью реагента PrestoBlue (**Рисунок 2.3.36**). Меченые ОДН не вызывали существенного снижения жизнеспособности клеток в концентрациях до 5 мкМ, что в 33 раза превышает концентрацию, используемую для внутриклеточной калибровки сенсора.

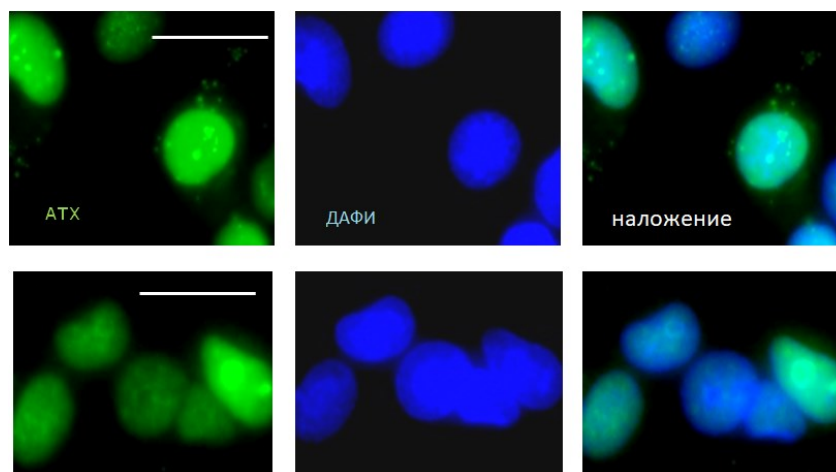


**Рисунок 2.3.36.** Тест на жизнеспособность клеток с использованием реагента PrestoBlue. Жизнеспособность клеток A549 и L929 через 3 часа после трансфекции кандидатами в сенсоры оценивали на основании относительной ИФ PrestoBlue, измеренной в максимуме эмиссии (590 нм) при возбуждении в 560 нм при комнатной температуре.

Затем мы определили нативные значения pH внутри клеток на основе калибровочных кривых, показанных на **Рисунке 2.3.33Б** и **Рисунке 2.3.34**. Внутриклеточный pH клеток A549 и L929 составлял  $7,6 \pm 0,1$  и  $7,2 \pm 0,1$  соответственно. Хотя FAM-ATX-BHQ1 и pHrodo Red/Green показали схожие результаты в клетках A549 (**Рисунок 2.3.33**), калибровка pHrodo Green не удалась в клетках L929, вероятно, из-за различного внутриклеточного распределения (**Рисунок 2.3.35**). FAM-ATX-BHQ1 и pHrodo Red продемонстрировали разное внутриклеточное распределение. Контрольный индикатор в большинстве случаев локализовался в цитоплазме, тогда как меченный ATX концентрировался в ядре (**Рисунок 2.3.37**), независимо от протокола трансфекции (**Рисунок 2.3.38**). Интересно, что распределение ATX внутри ядра также было неравномерным. Мы проверили колокализацию сенсора ATX с гетерохроматином, используя антитела к маркеру гетерохроматина H3K9m3 в клетках HaCaT. Локализация вблизи плотно упакованного хроматина была бы неблагоприятной для измерений pH из-за ограниченной диффузии. Характер окрашивания свидетельствует против совместной локализации ATX и гетерохроматина (**Рисунок 2.3.33В**).



**Рисунок 2.3.37.** Внутриклеточная локализация сенсора FAM-AXT-BHQ1 и контрольного сенсора pHrodo Red (детальный анализ при различных pH). Изображения клеток A549 и L929, трансфицированных FAM-ATX-BHQ1 или pHrodo (pH 6,5 и 7,5), получены с использованием флуоресцентного микроскопа после обработки клеток соответствующими буферами в присутствии ионофоров. Панель «нативные» содержит изображения клеток, не подвергавшихся дополнительной обработке после трансфекции. Каждая панель включает 3 изображения: флуоресцентные изображения ATX/pHrodo (зеленый/красный), Хехст (синий) и их наложение. Масштаб: 50 мкм



**Рисунок 2.3.38.** Внутрядерная локализация сенсора FAM-ATX-BHQ1 в клетках A549 после трансфекции фосфатом кальция (вверху) и трансфекции реагентом Turbofect (внизу). Синий, ДАФИ; зеленый, АТХ. Масштаб: 50 мкм.

Таким образом, мы предложили новый принцип дизайна эффективных рН-сенсоров на основе иМ, а именно использование геномных последовательностей и отбор структур, чувствительных к быстрым и небольшим изменениям рН. Для скрининга кинетических параметров сенсоров мы разработали более простой подход по сравнению с вариантом с остановленным потоком; он основан на корреляции изотермической кинетики с величиной гистерезиса, рассчитываемой по кривым плавления и отжига при фиксированном рН. С использованием указанных подходов/принципов была разработана серия кандидатов в сенсоры и отобран лидер, полученный на основе геномной последовательности АТХ из гена *ATXN2L*. Было показано, что сенсор АТХ, меченный парой FAM-BHQ1, быстро реагирует на небольшие изменения рН в пределах физиологического диапазона.

Предложенный сенсор применим для одноканальной флуоресцентной визуализации рН в раковых клетках и демонстрирует подходящий рабочий диапазон. Однако дальнейшая разработка оптимизированных мономолекулярных сенсоров на его основе, в том числе за счет введения точечных химических модификаций, ограничивается возможностью проскальзывания С-тракта и, как следствие, одновременному сосуществованию нескольких конформеров. Кроме того, еще одним недостатком данного нератиометрического сенсора является зависимость сигнала от эффективности трансфекции.

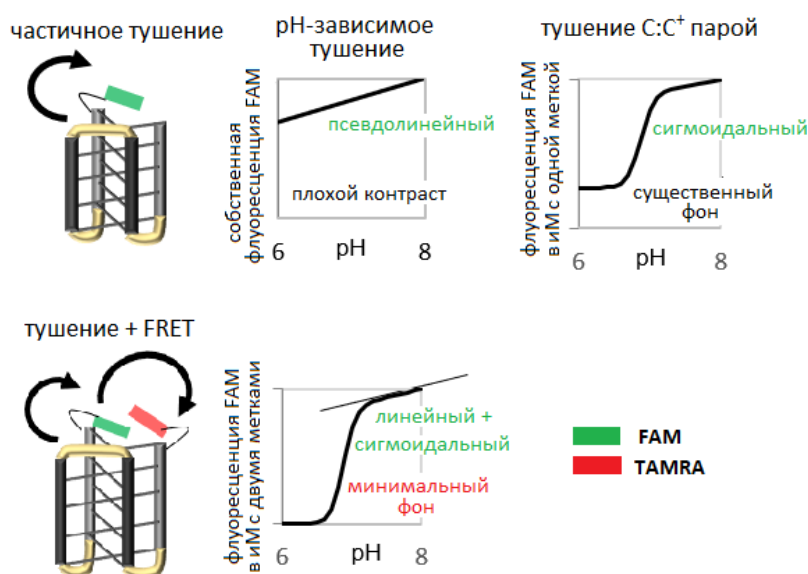
Далее мы попытались разработать ратиометрический сенсор и оригинальный подход к точной настройке его свойств, основанный на исключении избыточных элементов в петлях. Чтобы упростить интерпретацию данных, мы выбрали модельную последовательность, далее называемую С5Т, с четко определенными петлями (С5-тракты,

перемежающиеся одиночными петлевыми остатками Т) [44] в качестве исходного (немодифицированного) сенсорного каркаса.

Данный иМ-образующий ОДН C5T метили FAM и TAMRA на 5'- и 3'-концах соответственно, получая минимальный оптический сенсор на основе иМ - FAM-C5T-TAMRA. Несмотря на простоту конструкции, он показал довольно сложную картину отклика на pH согласно уравнению (2):

$$\text{ИФ}_{pH_i} = \frac{C_1 \cdot (pH_i + C_2)}{1 + 10^{(pH_{1/2} - pH_i) \cdot \text{коэффициент Хилла}}} + C_3 \cdot pH_i + C_4 \quad (2),$$

где  $pH_{1/2}$  — точка pH перехода и  $C_1$ – $C_4$  — параметры, определяющие относительный вклад псевдолинейной и сигмоидальной функций (**Рисунок 2.3.39**).



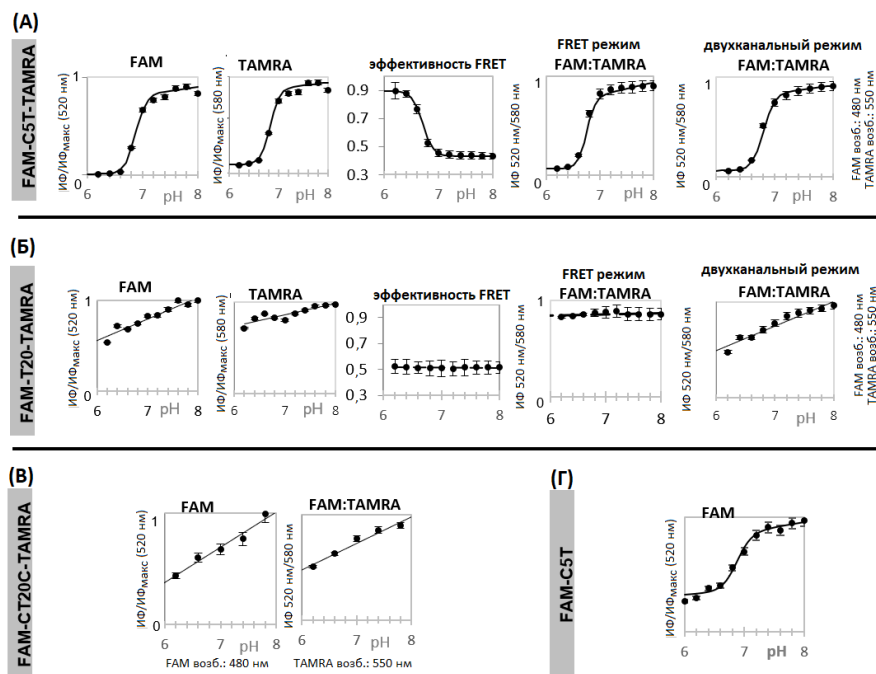
**Рисунок 2.3.39.** Факторы, влияющие на сигнал флуоресценции красителей.

Сложная картина отклика определяется следующими тремя факторами:

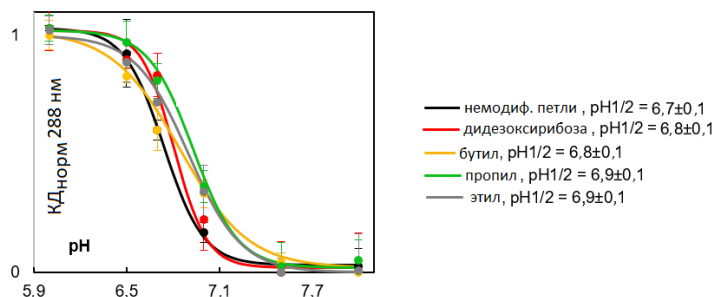
- зависимость квантовых выходов флуоресценции FAM/TAMRA от pH;
- иМ-индуцированное тушение FAM/TAMRA терминальной гемипротонированной парой цитозин-цитозин (предположительно, за счет механизма переноса электрона [537]);
- сближение флуорофоров при образовании иМ, приводящее к FRET между FAM и TAMRA.

Первый фактор объясняет псевдолинейный вклад в отклик сенсоров в зеленом (FAM) и красном (TAMRA) каналах. Мы подтвердили это, используя контрольные ОДН, неспособные образовывать иМ, FAM-T20-TAMRA и FAM-CT20C-TAMRA (**Рисунок 2.3.40**). Два других фактора объясняли сигмоидальный вклад в отклик сенсора и отражали переход C5T из «открытого» (одноцепочечного) состояния при  $pH \geq 8$  в «закрытое» (свернутый иМ) состояние при  $pH \leq 6$ . Мы подтвердили это с помощью КД-спектроскопии

(Рисунок 2.3.41). Этот переход возникает при кооперативном спаривании остатков цитозина при их гемипротонировании [538]. Таким образом, его можно аппроксимировать стандартной логарифмической кривой доза-эффект, где  $\log EC_{50}$  равен точке перехода pH ( $pH_{1/2}^{FAM-CST-TAMRA} = 6,73 \pm 0,05$ ), тогда как коэффициент Хилла ( $n^{FAM-CST-TAMRA} = 4,3 \pm 0,2$ ) указывает на положительную кооперативность спаривания цитозин-цитозин.



**Рисунок 2.3.40.** Подробное описание pH-зависимости ИФ меток в сенсоре (А) и контрольных ОДН (Б-Г). Все спектры ОДН регистрировали в трех повторах при концентрации ОДН 2 мкМ в 140 мМ  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  буферах (pH 6-8) при комнатной температуре при возбуждении в максимуме поглощения FAM (480 нм) или TAMRA (550 нм). Планки погрешности обозначают стандартное отклонение 3 измерений.



**Рисунок 2.3.41.** Кривая зависимости нормированного КД-сигнала от pH немодифицированного сенсора и его аналогов. Спектры 2 мкМ растворов ОДН в 140 мМ  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  буфере (pH 6-8) регистрировали при комнатной температуре, и нормализованную КД-амплитуду при 288 нм аппроксимировали стандартной логарифмической функцией доза-эффект для оценки  $pH_{1/2}$ . Планки погрешности обозначают стандартное отклонение 3 измерений.

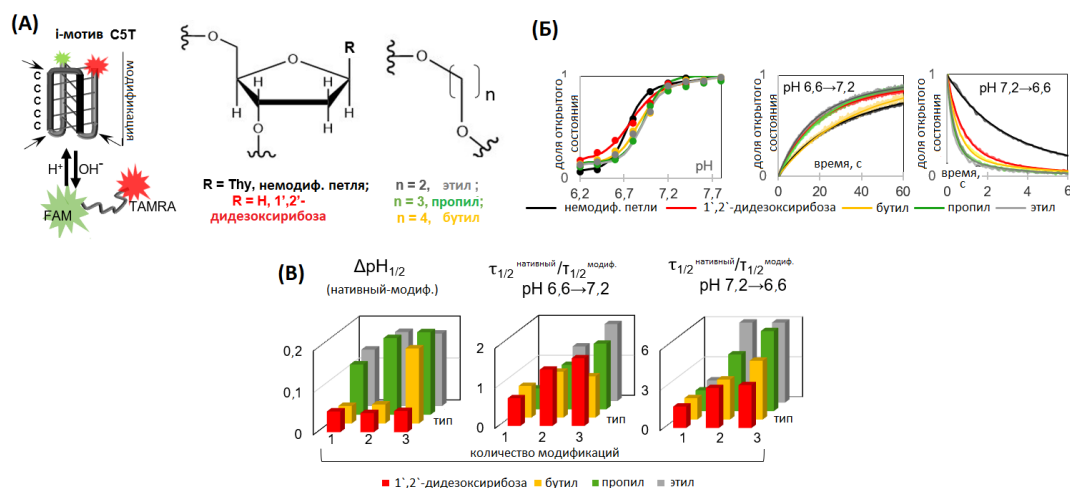
Эффект FRET, определяемый сборкой иМ, предполагает снижение ИФ FAM и увеличение ИФ TAMRA при возбуждении FAM в кислой среде и наоборот в щелочной среде. Однако тушение при сборке иМ снизило эмиссию обеих меток в кислой среде. Как было видно из зависимости сигнала TAMRA от pH (**Рисунок 2.3.40**), тушение доминировало при низком pH и сводило на нет FRET-эффект.

Мы пришли к выводу, что FAM-C5T-TAMRA, минимальный ратиометрический сенсор на основе иМ, продемонстрировал многокомпонентную зависимость от pH, указывающую главным образом на развернутую фракцию иМ в биологически значимом диапазоне pH (6-8). Его ключевым преимуществом перед более простыми прототипами сенсоров (контрольными ОДН FAM-T20-TAMRA, FAM-CT20C-TAMRA и FAM-C5T) была высокая контрастность как в одноканальном (FAM), так и в двухканальном (FAM/TAMRA) режимах за счет комбинации тушения флуоресценции и FRET в свернутом состоянии (**Рисунок 2.3.40**). В диапазоне с высокой чувствительностью (центральная часть сигмоидальной кривой) сенсор показал в 2 раза большую чувствительность ( $\Delta\text{ИФ}/\text{ИФ}_{\text{макс}}^{\text{FAM-C5T-TAMRA}} \approx 15\%$  на 0,1 pH), чем более простые прототипы ( $\Delta\text{ИФ}/\text{ИФ}_{\text{макс}}^{\text{FAM-CT20C-TAMRA}}$ ;  $\text{FAM-C5T} \approx 8\%$  на 0,1 pH). Диапазон с высокой чувствительностью FAM-C5T-TAMRA находится в пределах pH 6,4 – 7,0. Для визуализации внутриклеточного pH этот диапазон следует немного сдвинуть в сторону более высоких значений, что требует дополнительной стабилизации ядра иМ.

Чтобы увеличить стабильность иМ и сохранить общую простую структуру, мы решили удалить единственные структурные элементы, которые казались избыточными для измерения pH – нуклеиновые основания в петлях. Хотя в некоторых случаях стэкинг-взаимодействия между парами цитозина и нуклеиновыми основаниями в петлях способствуют стабильности иМ [267,539], большинство гетероциклов в петлях направлены в водную среду, что увеличивает связанный с сольватацией энтропийный вклад в энергию Гиббса и, таким образом, должно быть термодинамически неблагоприятным. Предположение о негативном влиянии гетероциклических оснований в петлях на термодинамическую стабильность иМ согласуется с описанным выше эффектом замены нуклеозидов петель на остатки 1',2'-дидезоксирибозы в прототипах сенсоров на основе иМ из гена *SHANK1* (SHA1-3). Было показано, что такая замена сдвигает  $\text{pH}_{1/2}$  в щелочную область и увеличивает скорость сворачивания геномных иМ (**Рисунок 2.3.21**).

Поскольку подобная замена в FAM-C5T-TAMRA давала аналогичную тенденцию (**Рисунок 2.3.42**, **Таблица 2.3.11** и **Таблица 2.3.12**), мы решили оценить влияние дальнейшего увеличения гибкости петель на параметры сенсоров, и заменили петлевые нуклеозиды алкильными линкерами различной длины (**Рисунок 2.3.42А**). Все аналоги

FAM-C5T-TAMRA с полностью модифицированными алкильными петлями показали снижение коэффициента Хилла и контрастности (Таблица 2.3.11), но улучшили кинетику отклика на скачки pH 6,6↔7,2 при комнатной температуре (Таблица 2.3.12). В соответствии с предполагаемым сосуществованием 3'Е и 5'Е конформеров, все кинетические кривые (Рисунок 2.3.42Б) были биэкспоненциальными. Модификации увеличили долю «быстрого» (предположительно, 3'Е [537]) конформера и увеличили общую скорость отклика (Таблица 2.3.12).



**Рисунок 2.3.42.** Дизайн сенсора на основе иМ и влияние модификаций в петлях на отклик на pH. (А) Схематическое изображение сенсора на основе иМ (левый график) с природными нуклеотидами и модифицированными остатками в петлях (средняя и правая панели). (Б) Влияние типа модификации на кривые отклика pH-сенсора (левый график) и кинетику (средний и правый графики, коэффициент достоверности аппроксимации для биэкспоненциальной аппроксимации составил >0,99). (В) Сводная информация о вызванных модификациями улучшениях диапазона и кинетики отклика сенсора, включая изменения точки перехода (pH<sub>1/2</sub>, левая диаграмма) и времени отклика (tau<sub>1/2</sub>, средняя и правая диаграммы). Кривые зависимости pH получали путем сравнения ИФ в максимумах эмиссии FAM и TAMRA (520 и 580 нм соответственно) при возбуждении в соответствующих максимумах поглощения (480 нм и 550 нм соответственно) в натрий-фосфатном буфере, pH 6-8 и использовали для расчета pH<sub>1/2</sub>. Отношение ИФ нормализовали на ИФ<sub>макс</sub> FAM/TAMRA = 1. Кинетические кривые получали путем отслеживания изменений флуоресценции FAM (нормализованных на ИФ<sub>макс</sub> = 1) при изменениях pH 6,6↔7,2 и использовали для расчета tau<sub>1/2</sub>.

**Таблица 2.3.11.** Сводная информация параметров зависимости рН немодифицированного и модифицированных сенсоров.

| Х                     | Положение Х   | рН <sub>½</sub> | n         | Рабочий диапазон | контрастность* |
|-----------------------|---------------|-----------------|-----------|------------------|----------------|
| Т                     | -             | 6,73 ± 0,06     | 4,3 ± 0,2 | 6,4 - 7,0        | 12             |
| 1',2'-дидезоксирибоза | петля 2       | 6,78 ± 0,03     | 4,8 ± 0,3 | 6,5 - 7,1        | 9              |
|                       | петли 1 и 3   | 6,78 ± 0,03     | 3,0 ± 0,3 | 6,4 - 7,2        | 5              |
|                       | все три петли | 6,78 ± 0,03     | 2,8 ± 0,3 | 6,4 - 7,2        | 4              |
| Бутильный линкер      | петля 2       | 6,77 ± 0,03     | 3,7 ± 0,4 | 6,4 - 7,1        | 6              |
|                       | петли 1 и 3   | 6,78 ± 0,03     | 3,0 ± 0,3 | 6,5 - 7,2        | 6              |
|                       | все три петли | 6,90 ± 0,05     | 2,8 ± 0,3 | 6,5 - 7,3        | 6              |
| Пропильный линкер     | петля 2       | 6,85 ± 0,05     | 3,7 ± 0,4 | 6,5 - 7,2        | 7              |
|                       | петли 1 и 3   | 6,91 ± 0,03     | 2,9 ± 0,3 | 6,5 - 7,3        | 6              |
|                       | все три петли | 6,93 ± 0,05     | 3,6 ± 0,5 | 6,5 - 7,4        | 7              |
| Этильный линкер       | петля 2       | 6,87 ± 0,07     | 3,7 ± 0,4 | 6,5 - 7,2        | 7              |
|                       | петли 1 и 3   | 6,91 ± 0,04     | 4,0 ± 0,5 | 6,5 - 7,3        | 7              |
|                       | все три петли | 6,90 ± 0,04     | 4,1 ± 0,4 | 6,5 - 7,3        | 6              |

\*отношение ИФ FAM/TAMRA при рН 8, разделенное на отношение ИФ FAM/TAMRA при рН 6.

**Таблица 2.3.12.** Сводная информация кинетических параметров немодифицированного и модифицированных сенсоров

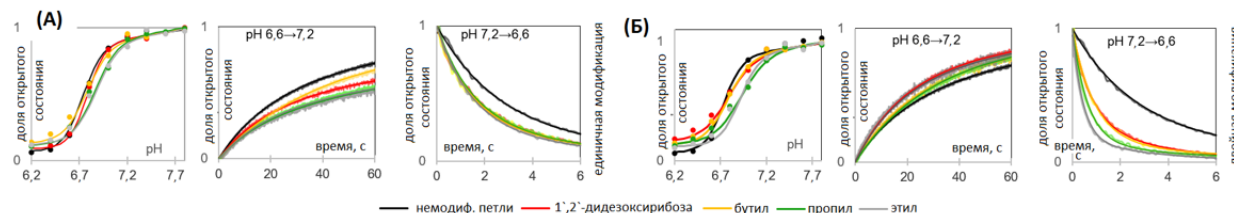
| Х                     | Положение Х   | tau <sub>½</sub> (рН 6,6→7,2), с | K <sub>набл</sub> (6,6→7,2), с <sup>-1</sup><br>(вклад, %) | tau <sub>½</sub> (рН 7,2→6,6), с | K <sub>набл</sub> (7,2→6,6), с <sup>-1</sup><br>(вклад, %) |
|-----------------------|---------------|----------------------------------|--|----------------------------------|--|
| Т                     | -             | 28 ± 1                           | 0,061±0,002 (34±3%)<br>0,015±0,002 (66±3%)                 | 2,3 ± 0,1                        | 0,41±0,08 (69±9%)<br>0,13±0,02 (31±9%)                     |
| 1',2'-дидезоксирибоза | петля 2       | 40 ± 2                           | 0,053±0,002 (40±3%)<br>0,007±0,001 (60±3%)                 | 1,4 ± 0,1                        | 0,82±0,08 (57±8%)<br>0,20±0,01 (43±8%)                     |
|                       | петли 1 и 3   | 19,6 ± 0,8                       | 0,065±0,005 (45±4%)<br>0,014±0,001 (55±4%)                 | 0,75 ± 0,02                      | 1,3±0,2 (70±10%)<br>0,27±0,03 (30±10%)                     |
|                       | все три петли | 16,3 ± 0,6                       | 0,062±0,001 (68±2%)<br>0,009±0,001 (32±2%)                 | 0,70 ± 0,05                      | 1,34±0,08 (75±3%)<br>0,27±0,01 (25±2%)                     |
| Бутильный линкер      | петля 2       | 35 ± 1                           | 0,029±0,001 (64±3%)<br>0,007±0,001 (36±3%)                 | 1,4 ± 0,1                        | 0,71±0,03 (70±3%)<br>0,15±0,01 (30±3%)                     |
|                       | петли 1 и 3   | 24 ± 1                           | 0,053±0,006 (41±9%)<br>0,017±0,002 (59±9%)                 | 0,75 ± 0,02                      | 1,1±0,5 (85±9%)<br>0,16±0,09 (15±9%)                       |
|                       | все три петли | 27 ± 1                           | 0,042±0,007 (32±9%)<br>0,020±0,001 (68±9%)                 | 0,51 ± 0,05                      | 1,3±0,3 (75±6%)<br>0,27±0,03 (25±6%)                       |
| Пропильный линкер     | петля 2       | 53 ± 3                           | 0,061±0,013 (28±1%)<br>0,007±0,001 (72±1%)                 | 1,45 ± 0,05                      | 0,68±0,03 (69±1%)<br>0,16±0,01 (31±1%)                     |
|                       | петли 1 и 3   | 24,8 ± 0,8                       | 0,042±0,003 (48±8%)<br>0,017±0,009 (52±8%)                 | 0,53 ± 0,05                      | 1,6±0,2 (85±9%)<br>0,18±0,04 (15±9%)                       |
|                       | все три петли | 16,8 ± 0,6                       | 0,049±0,001 (81±2%)<br>0,014±0,001 (19±2%)                 | 0,34 ± 0,02                      | 2,7±0,1 (79±1%)<br>0,35±0,01 (21±1%)                       |
| Этильный линкер       | петля 2       | 51 ± 1                           | 0,060±0,002 (32±9%)<br>0,007±0,001 (68±9%)                 | 1,4 ± 0,1                        | 0,70±0,01 (73±2%)<br>0,16±0,01 (27±2%)                     |
|                       | петли 1 и 3   | 20,2 ± 0,8                       | 0,065±0,003 (45±7%)<br>0,019±0,001 (55±7%)                 | 0,37 ± 0,02                      | 2,34±0,04 (82±8%)<br>0,31±0,01 (18±8%)                     |
|                       | все три петли | 14,3 ± 0,5                       | 0,078±0,003 (56±9%)<br>0,022±0,001 (44±9%)                 | 0,27 ± 0,05                      | 1,34±0,01 (75±3%)<br>0,27±0,001 (25±3%)                    |

Общее улучшение кинетики отклика сенсора, вызванное модификацией, было умеренным для перехода 6,6→7,2 (tau<sub>1/2</sub><sup>пропил</sup> = 16,8±0,6 с и tau<sub>1/2</sub><sup>этил</sup> = 14,3±0,5 с по



сравнению с  $\tau_{1/2}^{\text{немодифицированный}} = 28 \pm 1$  с), что дало в основном развернутый иМ, и большим для перехода  $7,2 \rightarrow 6,6$  ( $\tau_{1/2}^{\text{модифицированный}} < 1$  с по сравнению с  $\tau_{1/2}^{\text{немодифицированный}} = 2,3 \pm 0,1$  с), что дало преимущественно свернутый иМ. Таким образом, модификации сместили равновесие в сторону свернутого состояния (**Рисунок 2.3.43Б**) и точку перехода в сторону нейтральной среды (**Таблица 2.3.11**). Этот сдвиг был едва заметен для 1',2'-дидезоксирибозных линкеров, тогда как алкильные линкеры увеличивали  $pH_{1/2}$  почти на 0,2 единицы (**Рисунок 2.3.43В**). Короткие и гибкие алкильные линкеры также оказались лучше 1',2'-дидезоксирибозы и более длинного (бутильного) линкера с точки зрения кинетики (**Таблица 2.3.12**). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что этильные и пропильные линкеры являются оптимальными модификациями петель.

Для выяснения влияния количества и положений модификации мы сравнили полностью модифицированные производные FAM-C5T-TAMRA (**Рисунок 2.3.42Б**), их аналоги с одиночными заменами в центральной петле и дважды модифицированные аналоги с заменами в петлях 1 и 3 (**Рисунок 2.3.43**). В целом, скорость отклика на pH и точки перехода увеличивались с увеличением количества замен для каждого типа модификации, и оптимальные характеристики были получены для тройной модификации (**Рисунок 2.3.42В**).



**Рисунок 2.3.43.** Влияние единичной (А) и двойной (Б) модификаций петель на кривые и кинетику отклика pH-сенсора. Единичные модификации (А) вводили в центральную петлю иМ (петля 2), тогда как петли 1 и 3 оставляли немодифицированными. Две модификации (Б) вводили в петли 1 и 3, при этом центральную петлю оставляли немодифицированной. Кривые pH-сенсора получали путем сравнения ИФ в максимумах эмиссии FAM и TAMRA (520 и 580 нм соответственно) при возбуждении в соответствующих максимумах поглощения (480 и 550 нм соответственно) в  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$  буфере, pH 6-8 и использовали для расчета  $pH_{1/2}$ . Кинетические кривые получали при изменении  $pH\ 6,6 \leftrightarrow 7,2$  и использовали для расчета  $\tau_{1/2}$ .

Таким образом, основные результаты оптимизации сенсоров можно резюмировать следующим образом:

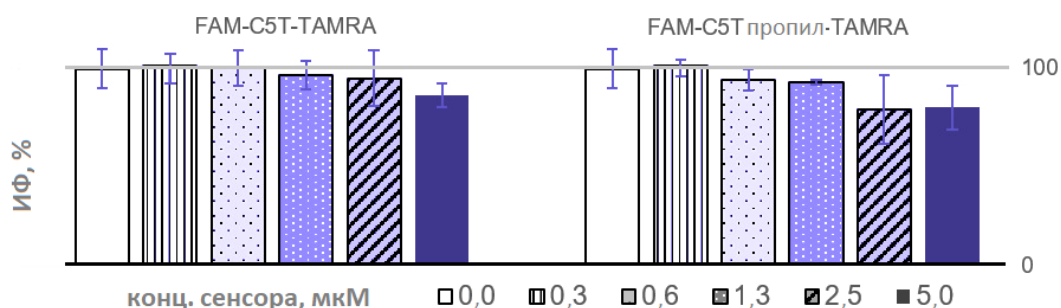
- удаление азотистых оснований и замена нуклеозидов на алкильный линкер ускоряет отклик сенсора на изменения pH в физиологически значимом диапазоне 6,6–7,2;

- алкильные линкеры смещают диапазон отклика сенсора и точку перехода ближе к нейтральной среде;
- замена всех трех петель на короткие алкильные линкеры оказалась особенно пригодной для увеличения скорости и диапазона отклика на pH.

Самые высокие скорости отклика (**Таблица 2.3.12**) и близкие к физиологическим рабочие диапазоны (**Таблица 2.3.11**) были получены для трижды модифицированных иМ с пропильной и этильной заменами в петлях. Мы выбрали пропильный вариант (далее называемый FAM-C5T<sup>пропил</sup>-TAMRA) для последующих исследований, поскольку он показал немного большую точку перехода и контрастность (**Таблица 2.3.11**).

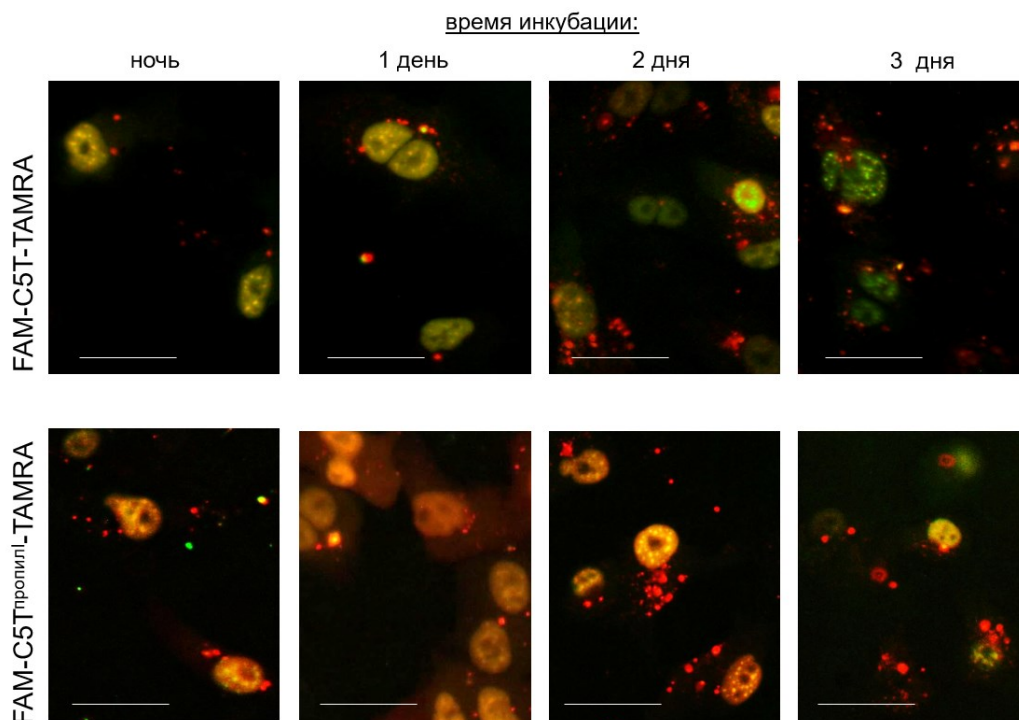
Благодаря большому значению точки перехода ( $\text{pH}_{1/2} = 6,93 \pm 0,05$ ) FAM-C5T<sup>пропил</sup>-TAMRA может подходить для отслеживания внутриклеточных изменений pH (кроме процесса созревания лизосом). По рабочему диапазону (pH 6,5–7,4) он превосходит межмолекулярные сенсоры на основе иМ (pH 5,7–6,8) [514,540] и аналогичен иМ, содержащим дополнительный шпилечный модуль (pH 6,5–7,4) [527]. Его скорость отклика ( $\tau_{1/2} < 1$  с для умеренного закисления, что сравнимо с кинетикой генетически кодируемых индикаторов последнего поколения [541]) предполагает применимость для отслеживания быстропротекающих процессов.

Чтобы проверить применимость FAM-C5T-TAMRA и FAM-C5T<sup>пропил</sup>-TAMRA для определения внутриклеточного pH с помощью флуоресцентной микроскопии, мы трансфицировали клетки A549 сенсорами с конечной внеклеточной концентрацией, равной 150 нМ. Анализы Presto blue подтвердили отсутствие значительной токсичности FAM-C5T-TAMRA и FAM-C5T<sup>пропил</sup>-TAMRA при данных концентрациях (**Рисунок 2.3.44**).



**Рисунок 2.3.44.** Тест на цитотоксичность. Жизнеспособность клеток A549 через 1 день после трансфекции сенсорами оценивали по относительной ИФ PrestoBlue, измеренной в максимуме эмиссии (590 нм) при возбуждении с длиной волны 560 нм при комнатной температуре. Чтобы исключить влияние TAMRA на флуоресценцию резорурфина, эмиссию при 590 нм после возбуждения при 560 нм корректировали по базовой линии путем вычитания эмиссии, обнаруженной до добавления реагента. Планки погрешности указывают стандартное отклонение трех измерений.

Сначала мы исследовали внутриклеточное распределение сенсоров и его изменение с течением времени (**Рисунок 2.3.45**). В среднем распределение оставалось постоянным через 12–24 ч после трансфекции. За исключением нескольких красных и меньшего количества зеленых фокусов, сигналы FAM и TAMRA накладывались друг на друга, что свидетельствует о сохранении целостности сенсора (**Рисунок 2.3.45**). Количество неналожимых флуоресцентных пятен увеличивалось при длительной инкубации клеток (2–3 дня после трансфекции), что, предположительно, свидетельствует о захвате сенсора и его деградации в лизосомах. Чтобы дополнительно проверить целостность сенсора с течением времени, мы проанализировали FRET от FAM к TAMRA с помощью FRET-микроскопии. Выраженный FRET, указывающий на близость FAM и TAMRA в интактных сенсорах, наблюдался через 12–24 ч после трансфекции. Все последующие эксперименты проводили через 12–24 ч после трансфекции.



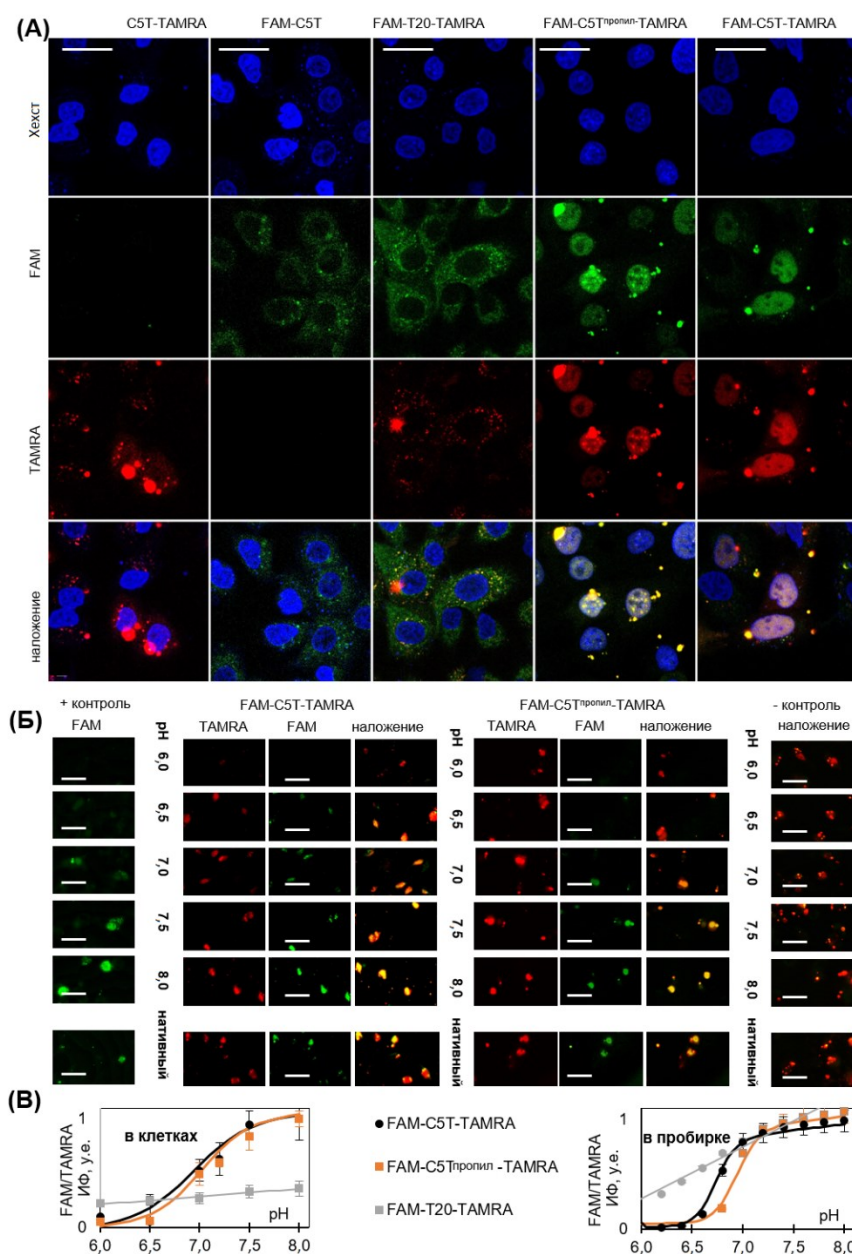
**Рисунок 2.3.45.** Стабильность сенсора в клеточной среде. Изображения, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа в разные моменты времени после трансфекции клеток A549 сенсорами. Визуализация с помощью флуоресцентной микроскопии в каналах FAM и TAMRA: показано наложение изображений FAM и TAMRA. Масштаб: 50 мкм.

Аналогично другим экзогенным иМ, включая геномные последовательности [46] и нератиометрические сенсоры на их основе, FAM-C5T-TAMRA и FAM-C5T<sup>пропил</sup>-TAMRA локализуются в ядре (**Рисунок 2.3.46А**). Удаление одной метки или замена иМ рН-нечувствительным спейсером T20 уменьшало флуоресцентный сигнал в нуклеоплазме (**Рисунок 2.3.46А**). Мы объясняем это различием в скорости гидролиза T20 и иМ с

одной/двумя метками. Это предположение подтверждается результатами сравнительного анализа скорости гидролиза всех ОДН нуклеазой S1 и EhoI в бесклеточной системе с электрофоретическим обнаружением. Результаты подтверждают важность ядра иМ и двух терминальных меток для обеспечения устойчивости сенсора к нуклеазному гидролизу.

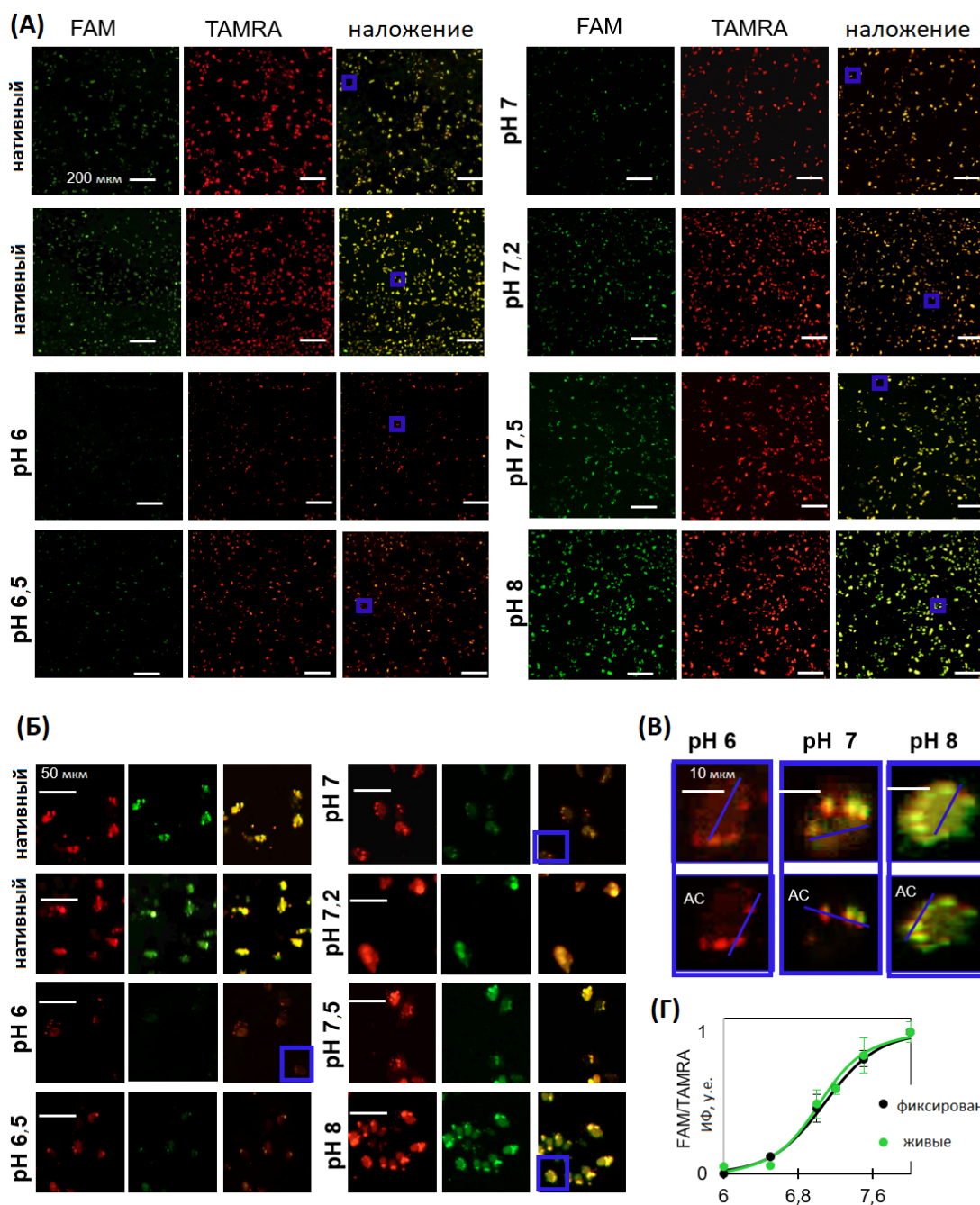
Эксперименты по калибровке в живых клетках A549 (**Рисунок 2.3.46Б**) дали кривые отклика на рН FAM-C5T-TAMRA и FAM-C5T<sup>пропил</sup>-TAMRA, схожие с кривыми, полученными в экспериментах в пробирке, за исключением более широких переходов и слегка смещенных значений  $pH_{1/2}$ , которые совпадали в пределах диапазона погрешность ( $pH_{1/2} = 6,9 \pm 0,1$  и  $7,0 \pm 0,1$ ). Снижение кооперативности сворачивания/разворачивания иМ в пробирке соответствует предыдущим наблюдениям и может быть объяснено влиянием условий «молекулярного краудинга».

Калибровка в фиксированных клетках дала аналогичные результаты (**Рисунок 2.3.47**). На основании калибровочных кривых в живых клетках (**Рисунок 2.3.46В**) мы оценили нативный рН в ядрах A549. Полученное значение ( $7,4 \pm 0,2$ ) согласуется с ранее полученными данными, и аналогичный результат был получен с использованием контрольного нератиометрического сенсора АТХ. Используя тот же протокол, мы откалибровали сенсор в клетках НЕК293 (**Рисунок 2.3.48**) и получили значение нативного рН, равное  $7,0 \pm 0,2$ , что также соответствует ранее полученным данным. Таким образом, мы продемонстрировали применимость новых ратиометрических сенсоров для определения рН в нуклеоплазме.

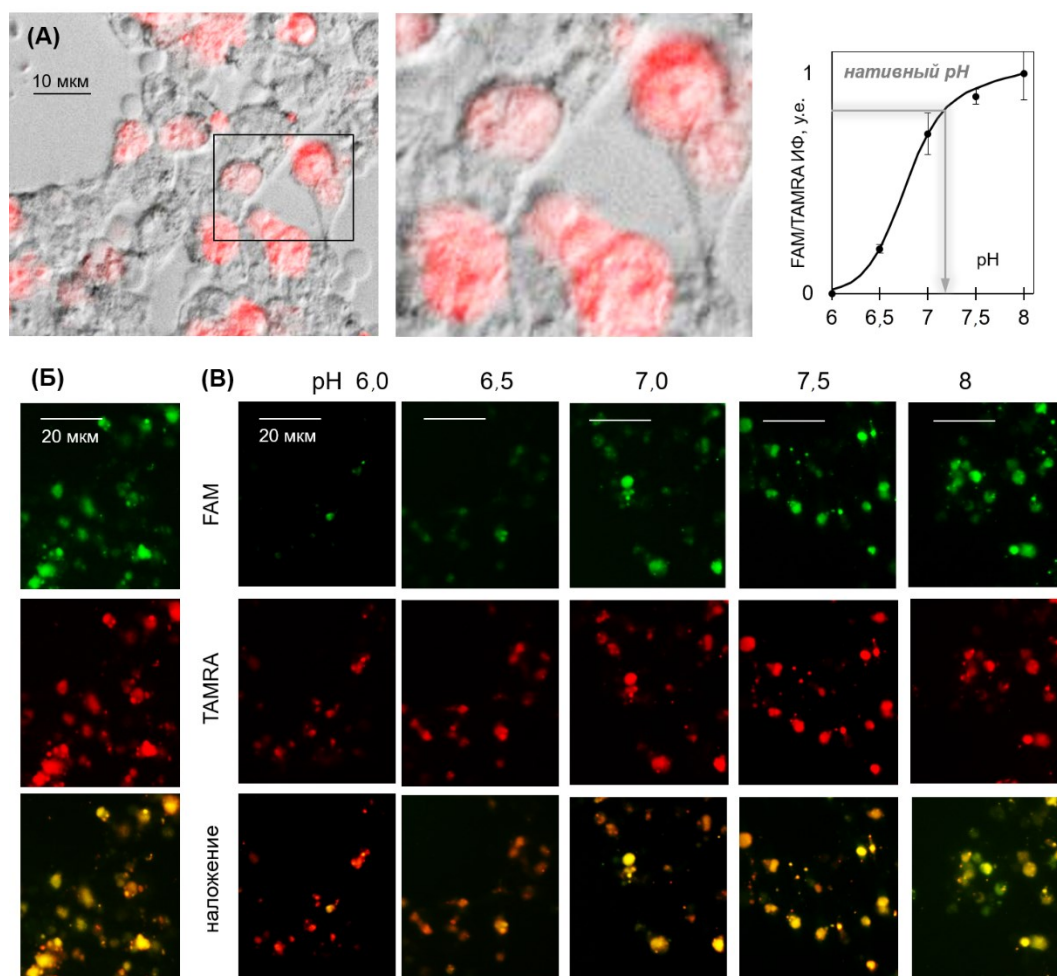


**Рисунок 2.3.46.** Визуализация и калибровка сенсора в клетках A549. (А) Изображения конфокальной флуоресцентной микроскопии, иллюстрирующие распределение сенсоров в клетках A549 через 12 часов после трансфекции. (Б) Внутриклеточная калибровка сенсора. Изображения флуоресцентной микроскопии получали для живых клеток A549 через 12 ч после трансфекции без дополнительной обработки (нативные условия) или при изменении pH с использованием контрольных буферов (pH 6,0-8,0). FAM-ATX-BHQ использовали в качестве положительного контроля, FAM-T20-TAMRA – в качестве отрицательного контроля. Масштаб на (А) и (Б): 20 мкм. (В) Сравнение кривых pH-зависимости FAM-T20-TAMRA, FAM-C5T<sup>пропил</sup>-TAMRA и FAM-C5T<sup>пропил</sup>-TAMRA, полученных при внутриклеточной калибровке (слева) и калибровке в пробирке (справа). Планки погрешности обозначают стандартное отклонение для 3 измерений (в пробирке) или 2 биологических повторов, по 3 технических повтора каждый (в клетке).





**Рисунок 2.3.47.** Калибровка сенсора в фиксированных клетках A549. Изображения флуоресцентной микроскопии, полученные после трансфекции A549 FAM-C5T<sup>пропил</sup>-TAMRA и последующей обработки стандартными буферами с указанным pH. (А) Широкопольные изображения. (Б) Увеличенные фрагменты. (В) Сравнение сенсорных сигналов в нуклеоплазме и спеклах. АС = скорректированный контраст. (Г) Сравнение калибровочных кривых сенсора, полученных с использованием фиксированных и живых клеток. Планки погрешности указывают стандартное отклонение для 3 технических и 2 биологических повторов.



**Рисунок 2.3.48.** Калибровка сенсора и применение в живых клетках НЕК293. Изображения флуоресцентной микроскопии, полученные после трансфекции НЕК293 FAM-C5T<sup>пропил</sup>-TAMRA и последующей обработки стандартными буферами с указанным pH. (А) Локализация и калибровочная кривая. (Б) Изображения для нативного pH. (В) Исходные изображения для калибровочной кривой.

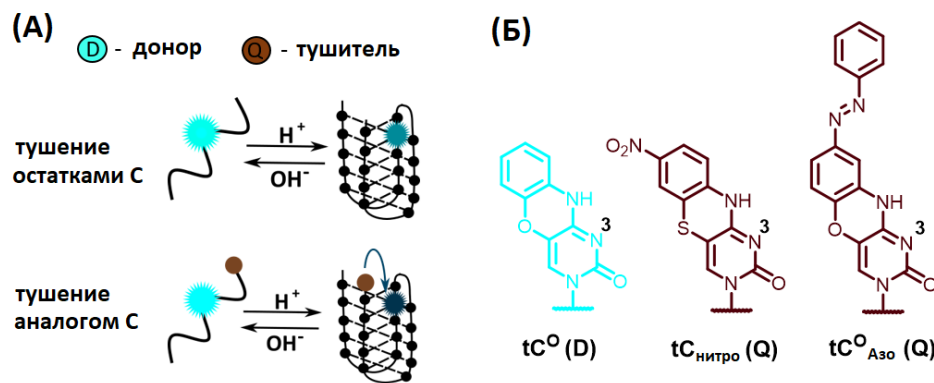
Таким образом, мы минимизировали структуру мономолекулярного 3',5'-меченного иМ, заменив петлевые нуклеозиды на алкильные (этил, пропил, бутил) линкеры. Данная модификации улучшили термическую стабильность иМ и увеличили скорости его конформационных переходов, вызванных pH. Наилучшие эффекты были получены при замене всех трех петлевых нуклеозидных остатков на пропильные линкеры. Полученный сенсор показал значение  $\text{pH}_{1/2}$   $6,9 \pm 0,1$  и быстро реагировал на незначительное подкисление ( $\tau_{1/2} < 1$  с для скачка  $\text{pH}$   $7,2 \rightarrow 6,6$ ). Мы продемонстрировали применимость сенсора-лидера для измерения pH в ядрах клеток аденокарциномы легкого человека ( $\text{pH} = 7,4 \pm 0,2$ ) и иммортализованных эмбриональных клеток почки ( $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$ ). Сенсор диффузно окрашивал нуклеоплазму и накапливался в гранулах интерхроматина. Результаты подчеркивают перспективы использования иМ в исследованиях нормальных и

патологических рН-зависимых процессов в ядре, включая образование биомолекулярных конденсатов.

Помимо использования объемных терминальных меток/тушителей, для создания рН-сенсоров можно также применять небольшие флуоресцентные нуклеотидные модификации. Среди подобных меток можно выделить миметики цитозина - производные 1,3-диаза-2-оксофеноксазина [8] и 1,3-диаза-2-оксофенотиазина [499,542]. Эти производные могут быть введены непосредственно в иМ-образующую последовательность в качестве внутренних меток, обеспечивающих максимальную чувствительность к окружению иМ. Предполагается, что флуоресцентный сигнал полученных конструкций уменьшается в ответ на подкисление, поскольку образование  $C-C^+$  пар приводит к стэкинг-взаимодействиям с меткой и ее контактному тушению [8,499,542]. Этот эффект пропорционален доле свернутого иМ. Таким образом, сенсор имеет сигмоидальную кривую отклика на изменение рН, аналогичную кривой зависимости доли свернутого иМ от рН. Отклик является резким и псевдолинейным вблизи  $pH_{1/2}$  иМ из-за кооперативного характера сворачивания иМ [543]. Этот эффект обычно более выражен, чем собственная зависимость метки от рН [538], и определяет повышенную чувствительность сенсоров на основе иМ по сравнению с небольшими молекулами вблизи  $pH_{1/2}$  иМ.

Как мы продемонстрировали выше (**Рисунок 2.3.40Г**), сенсоры на основе иМ с одной меткой часто дают плохой контраст в биологически-значимом диапазоне рН (соотношение сигналов рН 6:рН 8) из-за неполного тушения метки  $C-C^+$  парами в свернутых иМ (рН 6). Чтобы решить данную проблему, в ОДН можно ввести дополнительный тушитель так, чтобы он оказывался в непосредственной близости от донора флуоресценции при внутримолекулярном сворачивании иМ. Мы показали выше пригодность данного принципа дизайна в случае терминального (вне ядра иМ) мечения иМ FAM (донор) и TAMRA (акцептор) или ВНQ1 (тушитель). Тот же принцип должен быть применим к иМ с миметиками цитозина внутри ядра иМ (**Рисунок 2.3.49А**). Для сохранения структуры ядра и ее зависимости от рН миметики цитозина должны иметь значения  $pK_a$ , близкие к значениям природного остатка цитозина, и не должны дестабилизировать соседние  $C-C^+$  пары.



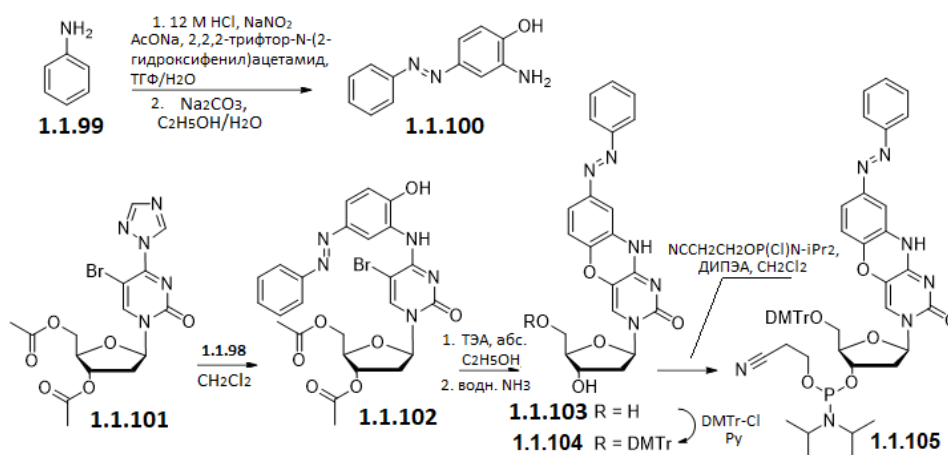


**Рисунок 2.3.49.** Сенсоры для определения pH на основе иМ с внутренними нуклеотидными модификациями: структура, принцип работы и метки. (А) Подход к увеличению контрастности pH-сенсоров на основе иМ за счет введения чувствительного к окружающей среде флуоресцентного и тушащего флуоресценцию миметиков цитозина. (Б) Структуры ранее известных ( $tC^O$  и  $tC_{\text{нитро}}$ ) и нового ( $tC^O_{\text{Азо}}$ ) миметиков цитозина.

FRET пара, состоящая из 1,3-диаза-2-оксофеноксазина ( $tC^O$ ) в качестве донора [6] и 7-нитро-1,3-диаза-2-оксофенотиазина ( $tC_{\text{нитро}}$ ) в качестве тушителя [544], является единственной известной парой на основе миметиков цитозина, отвечающей большинству вышеперечисленных требований (**Рисунок 2.3.49Б**). Ранее  $tC^O$  и  $tC_{\text{нитро}}$  модификации использовались в качестве FRET-пары в дуплексной ДНК, что позволяло точно анализировать вклад расстояния и ориентации в эффективность FRET [544]. Однако использование  $tC_{\text{нитро}}$  в конструкции pH-сенсоров на основе иМ может быть ограничено из-за предполагаемого снижения основности N3 атома, вызванного наличием нитрогруппы, проявляющей сильный электроноакцепторный эффект. Для получения тушителя с менее электроноакцепторным заместителем мы решили синтезировать  $tC^O_{\text{Азо}}$  – феноксазиновый аналог цитозина, содержащий фенилдиазенильную группу при атоме С8 феноксазиновой системы (**Рисунок 2.3.49Б**) и оценить его пригодность в качестве тушителя  $tC^O$  в конструкциях на основе иМ для отслеживания pH, а затем в составе молекулярных маяков (ММ).

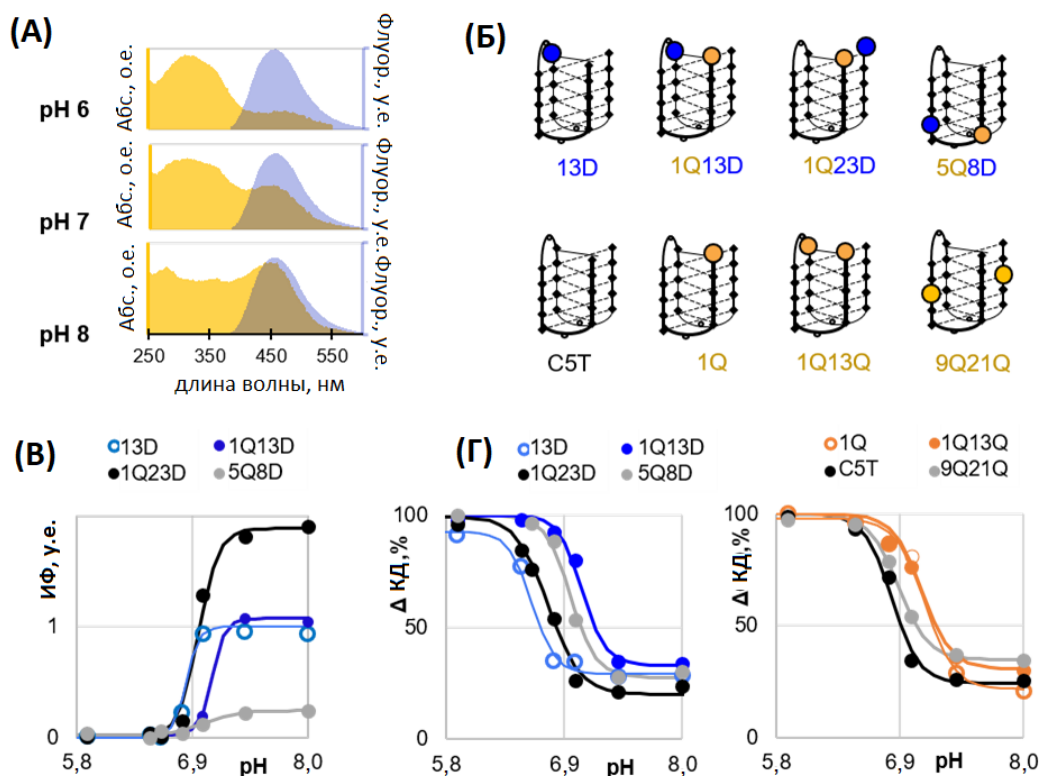
Синтез  $tC^O_{\text{Азо}}$  фосфорамидита проводили согласно **Схеме 2.3.3**. Фосфорамидит **1.1.105** фенилдиазенилзамещенного 1,3-диаза-2-оксофеноксазинового ( $tC^O_{\text{Азо}}$ ) нуклеозида для синтеза ОДН получали в шесть стадий с общим выходом 19%. Анилин **1.1.99** сначала превращали в соль бензолдиазония, а затем использовали в азосочетании с 2,2,2-трифтор-N-(2-гидроксифенил)ацетамидом, содержащим гидроксильную (пара/орто-ориентант) и 2,2,2-трифторацетамидную группы (мета-ориентант) с последующим гидролизом амидной связи в присутствии карбоната натрия с образованием исключительно 4-замещенного аминофенола **1.1.100**. Замещение триазолильной группы в **1.1.101** на замещенный

аминофенол **1.1.100** в отсутствие обычно используемого основания, такого как ДБУ или ДИПЭА, давало производное **1.1.102**. Перемешивание **1.1.102** при кипячении с обратным холодильником в смеси абсолютного  $C_2H_5OH$ /ТЭА с последующей обработкой водным раствором аммиака приводило к циклизации феноксазинового кольца и снятию защиты с гидроксильных. Полученный нуклеозид  $tC^{O}_{Azo}$  **1.1.103** был 5'-О-диметокситритилирован и подвергнут реакции 3'-О-фосфитилирования, в результате чего был получен целевой фосфорамидит **1.1.105** для автоматизированного твердофазного синтеза модифицированных ОДН.

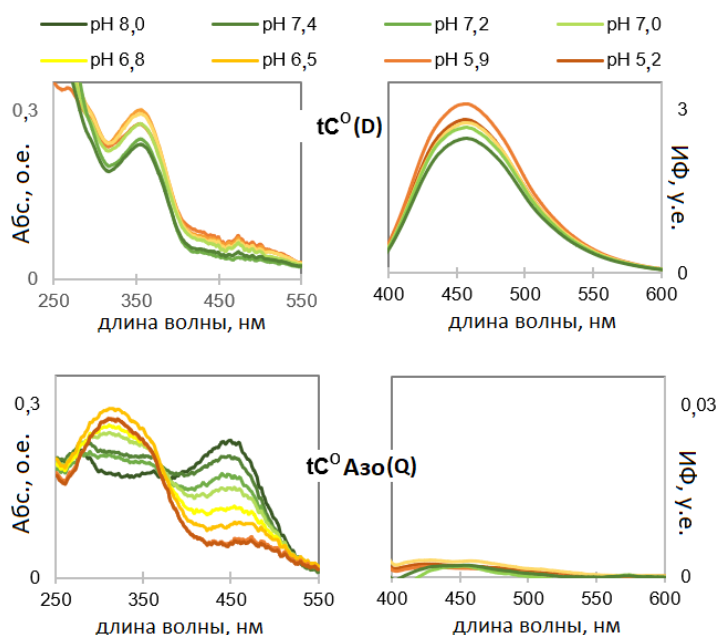


**Схема 2.3.3.** Синтез фосфорамидита фенилдиазенилзамещенного 1,3-диаза-2-оксофеноксазинового ( $tC^{O}_{Azo}$ ) нуклеозида.

Спектр поглощения  $tC^{O}_{Azo}$  нуклеозидного производного **1.1.103** в ближней УФ-видимой области близок к спектру  $tC^O$  с основной полосой 320-350 нм ( $\epsilon_{tC^{O}_{Azo}^{350}} = 4600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  при pH 7,0). В отличие от  $tC^O$ ,  $tC^{O}_{Azo}$  показал дополнительную полосу поглощения приблизительно при 450 нм ( $\epsilon_{tC^{O}_{Azo}^{450}} = 3100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  при pH 7,0) и не флуоресцировал при возбуждении в 350 нм (**Рисунок 2.3.50А** и **Рисунок 2.3.51**). Важно отметить, что поглощение  $tC^{O}_{Azo}$  зависело от pH: значение молярной экстинкции при 450 нм увеличивалось почти в 4 раза между pH 6,0 и 8,0, а соотношение полос 350:450 нм уменьшалось с 3,8:1 до 0,8:1. Эти результаты демонстрируют, что  $tC^{O}_{Azo}$  (далее Q, тушитель) может быть pH-чувствительным тушителем флуоресценции  $tC^O$  (далее D, донор) и подтверждают потенциальное использование пары Q-D в конструкции pH-сенсоров (**Рисунок 2.3.49А**).

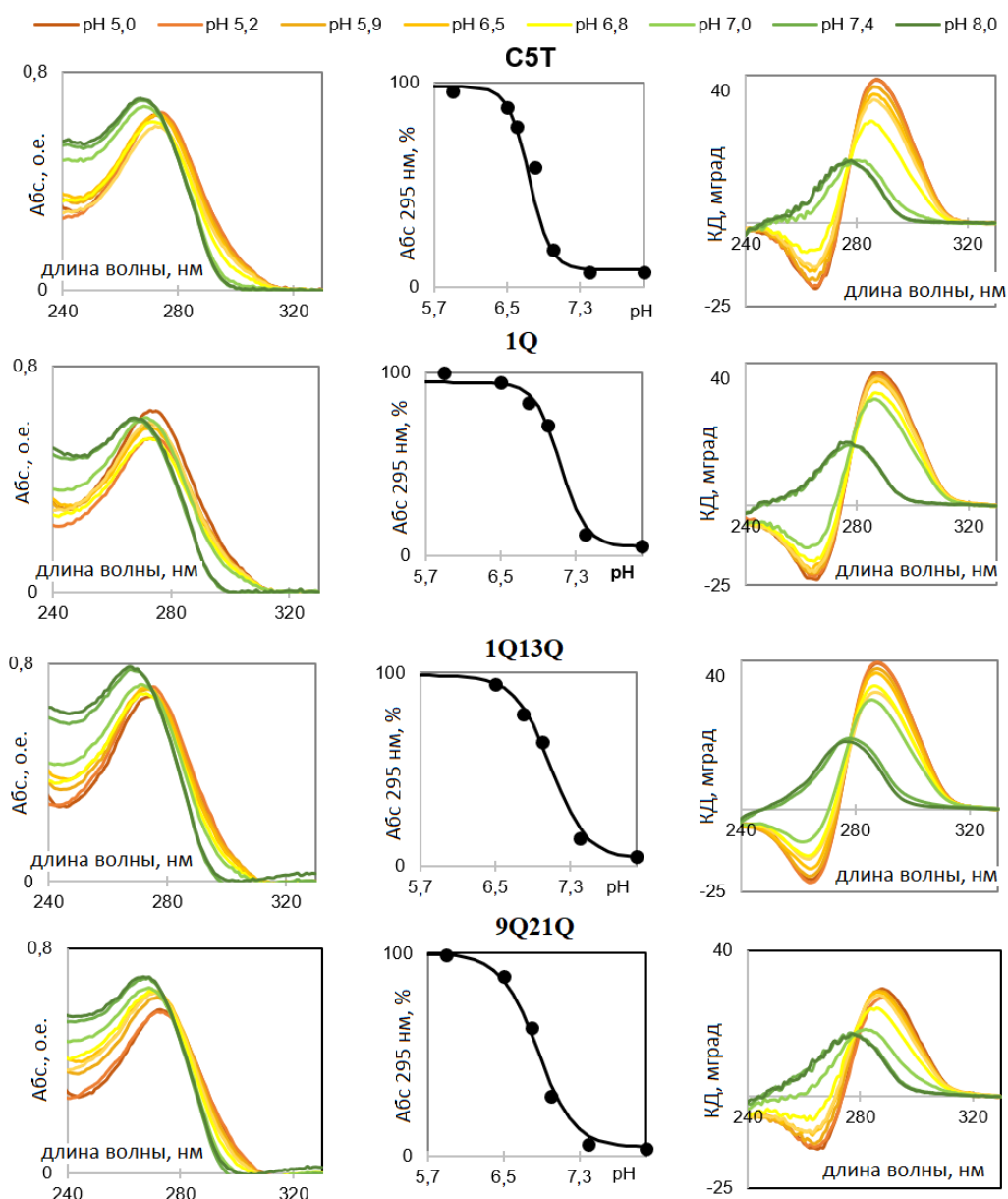


**Рисунок 2.3.50.** иМ с модификациями  $tC^O_{A30}$  (Q) и  $tC^O$  (D): спектральные характеристики и зависимость от pH в кювете. (А) Схематическая иллюстрация потенциального pH-зависимого эффекта тушения флуоресценции при наложении QD. Нормализованные спектры поглощения Q (желтый) накладываются на спектры испускания флуоресценции D (синий), и пересекающаяся зона определяет прогнозируемое тушение флуоресценции D. (Б) Верхняя панель: схематическое изображение Q,D-меченных иМ-образующих ОДН (кандидатов в сенсоры и контрольного ОДН), предназначенных для проверки Q-зависимого и иМ-зависимого тушения D. Нижняя панель: схематическое изображение контрольного и Q-модифицированных иМ-образующих ОДН, не содержащих D, предназначенных для выяснения влияния Q на pH-зависимость иМ. (В) Кривые pH-зависимости на основе флуоресценции кандидатов в сенсоры, меченных Q,D, и контрольного ОДН. Условия: 4 мкМ ОДН в 25 мМ  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$  (pH 5,8-7,4) или трис-HCl (pH 8) буфере, дополненном 100 мМ NaCl. Эмиссию флуоресценции при длине волны 450 нм регистрировали при возбуждении при длине волны 350 нм. (Г) Кривые pH-зависимости на основе КД Q,D-меченных кандидатов в сенсоры и контрольного ОДН (слева) и Q-модифицированных ОДН, не содержащих D (справа). Изменения КД регистрировались при специфичном для иМ максимуме (288 нм). Для всех точек представлено среднее значение трех измерений; стандартное отклонение не превышало 10%.



**Рисунок 2.3.51.** Спектры УФ-поглощения (слева) и флуоресценции (справа) аналогов нуклеозидов D и Q. Условия: 50 мкМ Q/D в 25 мМ натрий-ацетатном (pH 5,0–5,2),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 5,8–7,4) или трис-HCl (pH 8,0) буфере, дополненных 100 мМ NaCl. Эмиссию флуоресценции на длине волны 450 нм регистрировали при возбуждении на длине волны 350 нм.

Мы решили использовать Q в pH-сенсорах на основе иМ и выбрали в качестве сенсорного каркаса ранее использованную нами для создания ратиометрических pH-сенсоров последовательность C5T с диапазоном перехода pH в пределах 6,0–8,0. Мы получили немодифицированный C5T и проверили его pH-зависимость с помощью УФ- и КД-спектроскопии (**Рисунок 2.3.52**). Изменения амплитуд характеристических полос поглощения и КД в специфичных для иМ максимумах (288 нм и 295 нм соответственно) [320,494] измеряли в интересующем диапазоне pH, нормировали и аппроксимировали уравнением Хилла, которое давало значение  $\text{pH}_{1/2} 6,8 \pm 0,1$ .



**Рисунок 2.3.52.** Спектры поглощения (слева), кривые pH-зависимости (в центре) и КД-спектры (справа) Q-модифицированных ОДН, не содержащих D. Условия: 4 мкМ ОДН в 25 мМ натрий-ацетатном (pH 5,0–5,2),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 5,8–7,4) или трис-НСl (pH 8,0) буфере, дополненном 100 мМ NaCl. Комнатная температура.

Чтобы проверить влияние Q на зависимость C5T от pH, мы синтезировали ОДН с одной (1Q) или двумя (1Q13Q и 9Q21Q) заменами С на Q (**Рисунок 2.3.50Б** и **Таблица 2.3.13**). Мы решили модифицировать 5'-концевое положение, поскольку замена нуклеотидного остатка в этом положении, например, на *i*-clamp- и гуанидино-*i*-clamp-нуклеотид, положительно влияла на  $\text{pH}_{1/2}$  иМ (**Таблица 2.3.2**, **Таблица 2.3.3** и **Таблица 2.3.4**). Варианты 1Q13Q и 9Q21Q были получены для оценки влияния двух объемных модификаций, расположенных напротив друг друга на концах иМ и в середине ядра иМ соответственно. Зависимость от pH модифицированных иМ сравнивали с pH-зависимостью

для C5T (**Рисунок 2.3.50Г** и **Рисунок 2.3.52**). Единичная 5'-концевая модификация увеличивала точку перехода на 0,3 единицы ( $pH_{1/2\_1Q} = 7,1 \pm 0,1$ ). Дополнительный остаток Q напротив терминальной модификации не вызывал дальнейших изменений точки перехода ( $pH_{1/2\_1Q13Q} = 7,1 \pm 0,1$ ), что свидетельствует против спаривания Q-Q. Две модификации в середине С-тракта вызывали лишь незначительную стабилизацию ( $pH_{1/2\_9Q21Q} = 6,9 \pm 0,1$ ), что указывает на дополнительные стерические затруднения по сравнению с единичной терминальной модификацией.

**Таблица 2.3.13.** Последовательности иМ-образующих ОДН и рН перехода иМ.

| шифр  | Последовательность <sup>a</sup> | $pH_{1/2} \pm 0,1$ |
|-------|---------------------------------|--------------------|
| C5T   | CCCCSTCCCCSTCCCCSTCCCC          | 6,8                |
| 5Q8D  | CCCCQTCDCCSTCCCCSTCCCC          | 7,0                |
| 1Q23D | QCCCCSTCCCCSTCCCCSTCCCCD        | 6,9                |
| 1Q13D | QCCCCSTCCCCSTDCCSTCCCC          | 7,1                |
| 13D   | CCCCSTCCCCSTDCCSTCCCC           | 6,8                |
| 1Q    | QCCCCSTCCCCSTCCCCSTCCCC         | 7,1                |
| 1Q13Q | QCCCCSTCCCCSTQCCSTCCCC          | 7,1                |
| 9Q21Q | CCCCSTCCQCSTCCCCSTCCQCC         | 6,9                |

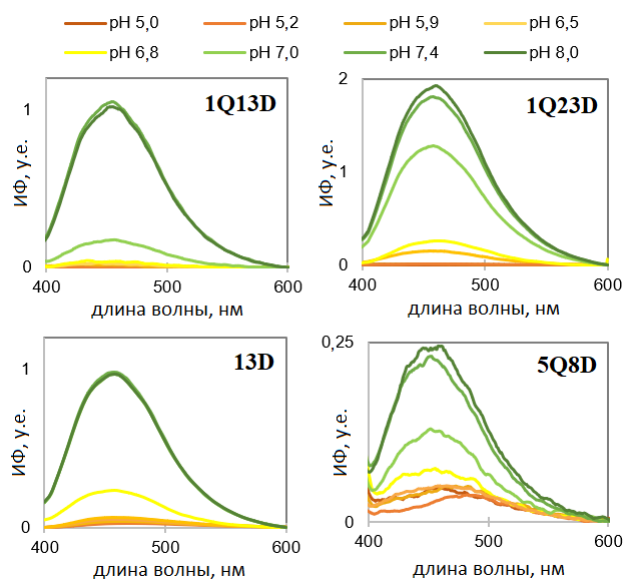
<sup>a</sup> Q и D обозначают  $tC^{O}_{A30}$  и  $tC^O$  нуклеотиды соответственно.

Вызванный заменой C→Q сдвиг  $pH_{1/2}$  иМ в сторону физиологического значения улучшает охват интересующего диапазона рН, что полезно в контексте разрабатываемых нами сенсоров. Далее, мы протестировали Q в качестве тушителя D в кандидатах в сенсоры на основе последовательности C5T.

Мы синтезировали два Q,D-модифицированных кандидата в сенсоры: 1Q13D и 1Q23D (**Таблица 2.3.13**). Оба содержали остаток Q на 5'-конце, который должен был располагаться рядом с внутривитлевым (1Q13D) или 3'-концевым (1Q23D) остатком D в свернутых иМ. Дополнительно мы получили контрольные ОДН 13D и 5Q8D. ОДН 13D без Q был получен для проверки тушения D фланкирующей парой C-C<sup>+</sup> в свернутом иМ. ОДН 5Q8D содержал остатки Q и D в непосредственной близости друг от друга независимо от сворачивания иМ. Мы синтезировали его для проверки тушения D Q.

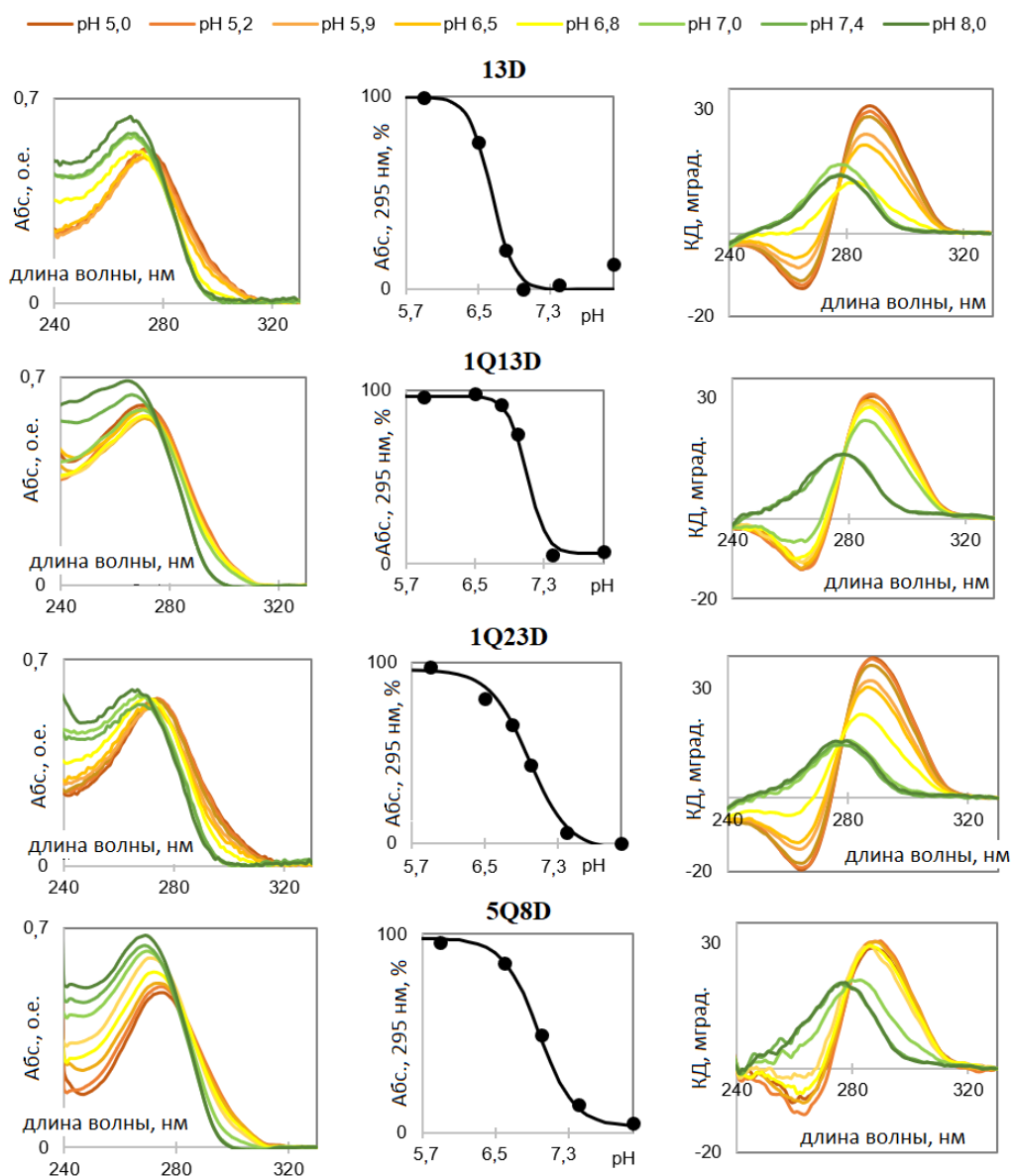
Сначала мы проанализировали контрастность (отношение максимального и минимального сигналов) кандидатов в сенсоры в биологически значимом диапазоне рН (**Рисунок 2.3.53**). При рН 8 (развернутый иМ; минимальное тушение, максимальная ИФ) флуоресцентный сигнал варьировался в зависимости от расстояния Q-D вдоль цепи ОДН: 1Q23D > 1Q13D ≈ 13D >> 5Q8D. При рН 6 сигнал изменялся следующим образом: 1Q23D ≈ 1Q13D > 13D > 5Q8D, что приводило к значениям контрастности  $120 \pm 10$  (1Q23D),  $70 \pm 20$  (1Q13D),  $30 \pm 10$  (13D) и  $10 \pm 5$  (5Q8D). Сравнение 13D и 1Q13D показывает, что

микроокружение иМ вносило значительный вклад в тушение D, тогда как Q обеспечивал примерно в 3 раза более эффективное тушение при сближении с D. Разница между расположением Q-D друг над другом (1Q23D) и друг напротив друга (1Q13D) была незначительной. ОДН 1Q23D превзошел 1Q13D по контрастности, вероятно, из-за повышенной яркости в развернутом иМ. Таким образом, исходя из имеющихся данных, 1Q23D кажется более многообещающим кандидатом в сенсоры, чем 1Q13D, с точки зрения контрастности.



**Рисунок 2.3.53.** Спектры флуоресценции D в составе ОДН. Условия: 4 мкМ ОДН в 25 мМ натрий-ацетатном (pH 5,0–5,2),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 5,8–7,4) или Трис-HCl (pH 8,0) буфере, дополненном 100 мМ NaCl. Эмиссию флуоресценции на длине волны 450 нм регистрировали при возбуждении при длине волны 350 нм.

Далее мы проанализировали точки перехода кандидатов в сенсоры (Таблица 2.3.13). В соответствии с основным вкладом сворачивания/разворачивания иМ в тушение D, точки перехода, определенные по зависимости флуоресценции D от pH (Рисунок 2.3.50В), соответствовали точкам перехода, определенным по зависимости амплитуды иМ-специфичных КД-полос и полос поглощения от pH (Рисунок 2.3.50Г и Рисунок 2.3.54). Точка перехода 13D ( $\text{pH}_{1/2\_13\text{D}} = 6,8 \pm 0,1$ ) совпадала с точкой перехода немодифицированного C5T, что указывает на отсутствие влияния флуоресцентного мечения петли на ядро иМ. Точки перехода Q,D-модифицированных иМ были увеличены на 0,2 единицы (1Q23D и 5Q8D) или 0,3 единицы (1Q13D), что подтверждает стабилизирующее влияние Q на структуру иМ в нейтральных средах. Таким образом, ОДН 1Q13D представляется особенно многообещающим кандидатом в сенсоры с точки зрения рабочего диапазона.

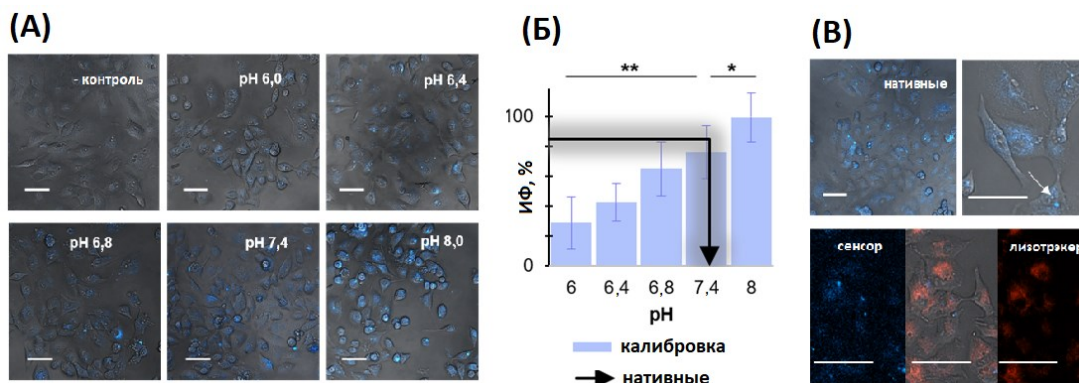


**Рисунок 2.3.54.** Спектры поглощения (слева), кривые pH зависимости (в центре) и КД-спектры (справа) Q,D-модифицированных ОДН. Условия: 4 мкМ ОДН в 25 мМ натрий-ацетатном (pH 5,0–5,2  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 5,8–7,4) или Трис- $\text{HCl}$  (pH 8,0) буфере, дополненном 100 мМ  $\text{NaCl}$ . Комнатная температура.

ОДН 1Q13D был выбраны как лучший кандидат в pH-сенсоры с точки зрения контрастности и рабочего диапазона соответственно. При переходе к внутриклеточной визуализации, мы решили повысить устойчивость к гидролизу нуклеазами и ввели на 3'-конец две фосфоротриоатные межнуклеотидные связи [475,545]. Полученный кандидат в



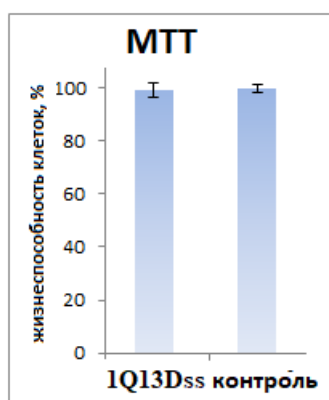
сенсоры 1Q13Dss обладал оптическими свойствами, аналогичными 1Q13D.



**Рисунок 2.3.55.** Кандидат в pH-сенсоры 1Q13Dss: внутриклеточная калибровка. (А) Репрезентативные конфокальные изображения клеток A549, трансфицированных 1Q13Dss (конечная концентрация 450 нМ) или контрольным раствором (отрицательный контроль), и затем обработанных ионофорами и буферами PBS с указанным pH. Масштаб: 50 мкм. (Б) Результаты внутриклеточной калибровки pH 1Q13Dss. ИФ — нормированная ИФ в синем канале. Все эксперименты проводили в двух биологических повторах и трех технических повторах. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Черная стрелка указывает на средний показатель ИФ в нативных клетках (без изменений pH после трансфекции), и серая штриховка указывает на стандартное отклонение ИФ в нативных клетках, составляющее 19%. (В) Верхняя панель: репрезентативные изображения 1Q13Dss в нативных клетках. Белая стрелка указывает на репрезентативное скопление сенсора или свободной метки в цитоплазме. Нижняя панель: анализ локализации сенсора относительно лизосом. Слева: сенсор визуализирован в синем канале; справа: LysoTracker визуализирован в красном канале. В центре: объединенные изображения, наложенные на изображения световой микроскопии. Масштаб: 50 мкм.

Используя МТТ тест (**Рисунок 2.3.56**), мы подтвердили, что 1Q13Dss нетоксичен для клеток A549 в концентрации 450 нМ. Для внутриклеточной калибровки сенсора клетки A549 трансфицировали 1Q13Dss и обрабатывали ионофорами и буферами с известным pH через 24 часа после трансфекции (**Рисунок 2.3.55А**). По сравнению с ранее разработанными сенсорами на основе иМ, мечеными красным/зеленым флуоресцентными красителями, сенсор 1Q13Dss продемонстрировал пониженное соотношение сигнал/шум, вероятно, из-за автофлуоресценции A549 в синем канале. Зависимость сигнала сенсора от pH не могла быть надежно аппроксимирована сигмоидальной кривой, но все же оставалась псевдолинейной в пределах физиологического диапазона pH (**Рисунок 2.3.55Б**). Разница между средним сигналом сенсора в норме (pH 7,4) и условиях, имитирующих острый ацидоз (pH 6,0–6,4),

была статистически значимой (значение  $p < 0,05$ ). Однако изменения сигнала, соответствующие небольшим отклонениям pH, типичным для раннего онкогенеза (защелачивание/подкисление в пределах 0,5 единиц pH [546]), были едва заметны. В нативных клетках A549, не подвергавшихся изменению pH (**Рисунок 2.3.55B**), сенсорный сигнал имел выраженную дисперсию (около 20%). Однако среднее значение нескольких измерений было близко к значению, полученному для pH 7,4 во время калибровки (**Рисунок 2.3.55B**), что согласуется с нашими предыдущими оценками внутриклеточного pH ( $pH_{вк}$ ) A549 с использованием низкомолекулярных индикаторов pHrodo Green/Red.



**Рисунок 2.3.56.** Жизнеспособность клеток A549 после 6-часовой трансфекции + 24-часовой инкубации с сенсором 1Q13Dss. В качестве контроля использовали только Липофектамин 2000. Планки погрешности указывают стандартное отклонение трех измерений.

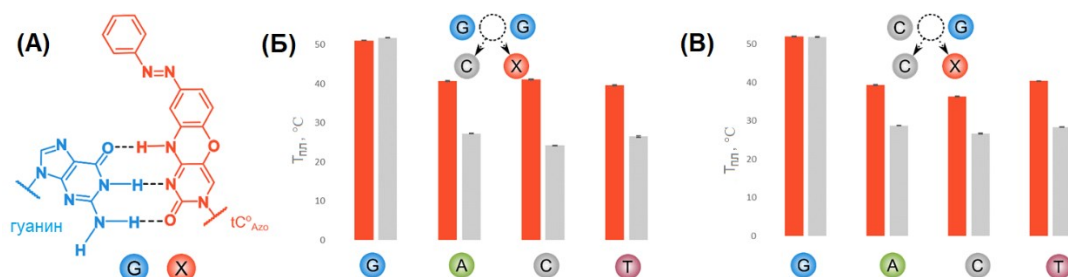
Анализ локализации 1Q13Dss в нативных клетках A549 (**Рисунок 2.3.55B**) выявил преимущественное накопление в цитоплазме. Сенсор был распределен достаточно равномерно, за исключением единичных скоплений, обнаруженных также в цитоплазме. На основании литературных данных [514] мы предположили, что эти скопления могут свидетельствовать о попадании сенсора в лизосомы, и дополнительно окрасили клетки препаратом LysoTracker. Мы не наблюдали значимой колокализации с лизосомами (**Рисунок 2.3.55B**). В любом случае количество и интенсивность сигнала в местах скопления сенсора/метки не показали явной зависимости от pH, и их наличие не препятствует измерению pH в цитоплазме.

Таким образом, 1Q13Dss позволяет достоверно выявлять острый ацидоз (pH 6) и умеренное подщелачивание (pH 8). Его адаптация для отслеживания незначительных изменений pH потребует повышения яркости метки и/или оптимизации схемы трансфекции для увеличения внутриклеточной концентрации сенсора. Важно отметить, что цитоплазматическая локализация 1Q13Dss отличает его от описанных выше сенсоров на основе иМ, включая другие производные C5T, меченные цианиновыми красителями FAM-

TAMRA, которые в конечном итоге секвестрируются в ядрах. Аналогичное накопление в ядрах наблюдается для других конструкций на основе нуклеиновых кислот, таких как антисмысловые ОДН [547,548] и молекулярные биконы [549–551]. Важно отметить, что их локализация не зависит от способа доставки, поскольку аналогичные закономерности распределения были получены после микроинъекции ОДН [550,551], трансфекции [551] или доставки с использованием порообразующих агентов [552]. Эти наблюдения подтверждают нашу гипотезу о влиянии схемы мечения на внутриклеточную локализацию ОДН.

Затем, мы дополнительно изучили гибридизационные и дискриминационные свойства  $tC^O_{A30}$  в дуплексном контексте, а также влияние его включения на термическую стабильность молекулярных маяков (ММ) и способность тушить флуоресценцию репортерной молекулы (FAM) в сложенных ММ.

Модификация  $tC^O_{A30}$  сохраняет Уотсон-Криковскую схему водородных связей цитозина и, таким образом, может образовывать водородные связи с остатком гуанина (Рисунок 2.3.57А). Мы изучили способность  $tC^O_{A30}$  действовать в качестве миметика цитозина в контекстах GXG и CXG, которые будут использоваться в последующих экспериментах с ММ (Рисунок 2.3.57Б и В).



**Рисунок 2.3.57.** Чувствительность  $tC^O_{A30}$  к однонуклеотидным заменам в коротких дуплексах: (А) схема предполагаемого спаривания оснований G- $tC^O_{A30}$ ; температуры плавления ( $T_{пл}$ ) дуплексов, образованных ОДН, содержащими  $tC^O_{A30}$  или цитозин, и соответствующими немодифицированными компонентами с G, A, C или T напротив  $tC^O_{A30}$ /цитозина в контексте GXG/GCG (Б) или CXG/CCG (В) (последовательности представлены в Таблице 2.3.14).

**Таблица 2.3.14.** Последовательности ОДН, используемых для оценки чувствительности  $tC^O_{A30}$  к однонуклеотидным заменам, ММ и комплементов

| Шифр     | последовательность 5'-3'                                    |
|----------|---|
| GXG      | 5'-GCAGXGTACG-3' <sup>1a</sup>                              |
| CYC      | 5'-CGTACYCTGC-3' <sup>1b</sup>                              |
| GCG      | 5'-GCAGCGTACG-3'  |
| MM1      | GCCGGGGCTCATTTCGAAACGCATTCATTACCCCGGC                       |
| MM2      | CGCCGGGGCTCATTTCGAAACGCATTCATTACCCCGGCG                     |
| MM1-F/BQ | FAM-GCCGGGGCTCATTTCGAAACGCATTCATTACCCCGGC-BHQ1 <sup>B</sup> |
| MM2-F/BQ | FAM-CGCCGGGGCTCATTTCGAAACGCATTCATTACCCCGGCG-BHQ1            |
| MM1-1X   | FAM-GCCGGGGCTCATTTCGAAACGCATTCATTACCCXGGC                   |
| MM1-2X   | FAM-GCCGGGGCTCATTTCGAAACGCATTCATTACX <sup>1</sup> CXGGC     |
| MM1-3X   | FAM-GCCGGGGCTCATTTCGAAACGCATTCATTAXX <sup>1</sup> CXGGC     |
| MM2-1X   | FAM-CGCCGGGGCTCATTTCGAAACGCATTCATTACCCCGGXG                 |
| MM2-2X   | FAM-CGCCGGGGCTCATTTCGAAACGCATTCATTACCCXGGXG                 |
| MM2-3X   | FAM-CGCCGGGGCTCATTTCGAAACGCATTCATTACX <sup>1</sup> CXGGXG   |
| MM1-F    | FAM-GCCGGGGCTCATTTCGAAACGCATTCATTACCCCGGC                   |
| MM2-F    | FAM-CGCCGGGGCTCATTTCGAAACGCATTCATTACCCCGGCG                 |
| матрица  | TTTTCGCCGGGGTAATGAATGCGTTTCGAATGAGCCCCGGCGTTTT              |
| scr      | TGTAGTAGGTTGTGTCTGGTGTAGTAGGTT                              |

<sup>a</sup> X обозначает  $tC^O_{A30}$  нуклеотид.

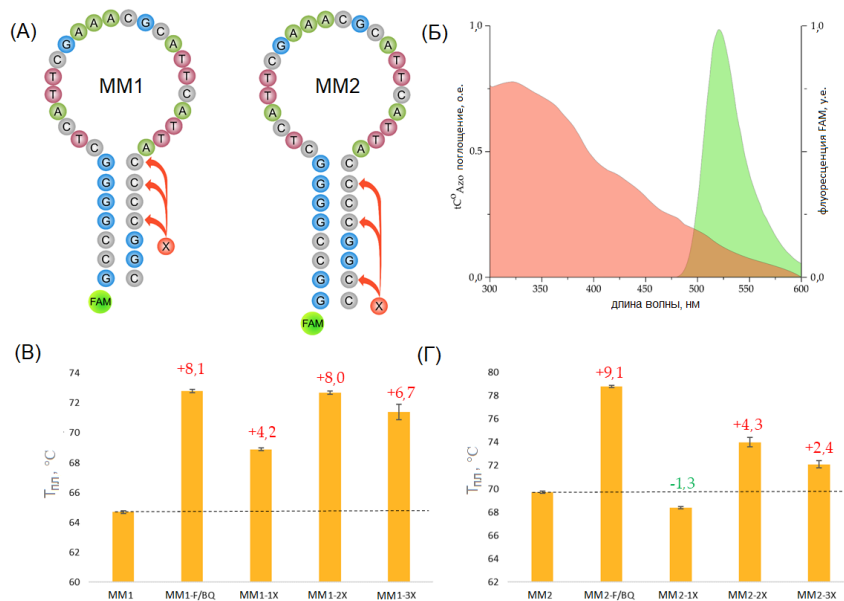
<sup>b</sup> Комплементарная цепь 5'-CGTACYCTGC-3', где Y представляет G, A, C или T.

<sup>B</sup> FAM = 6-карбоксифлуоресцеин и BHQ1 - Black Hole Quencher 1.

Дуплексы с парой  $tC^O_{A30}/G$  имеют  $T_{пл}$  по крайней мере на 10 °C выше, чем когда A, C или T расположены напротив модификации (**Рисунок 2.3.57Б и В**). Соответствующие различия для немодифицированных дуплексов составляют 23-27 °C в зависимости от противоположного нуклеинового основания. Хотя различия являются меньшими для  $tC^O_{A30}$ , чем для канонического C,  $tC^O_{A30}$  сохраняет способность дискриминировать гуанин от других нуклеиновых оснований. Кроме того, «идеальная» пара  $tC^O_{A30}/G$  не изменяет  $T_{пл}$  по сравнению с природной парой G/C. Уменьшение чувствительности к однонуклеотидным заменам может быть результатом увеличения стэкинговых взаимодействий между соседними нуклеиновыми основаниями и фенилдиазенилзамещенным 1,3-диаза-2-оксофеноксазином с расширенной ароматической системой. Данные согласуются с результатами, полученными для другого миметика цитозина -  $tC^O_{нитро}$  [544].

Для дальнейших исследований термической стабилизации и способности тушить флуоресценцию репортерной молекулы мы сконструировали структуры типа стебель-петля, содержащие один, два или три остатка  $tC^O_{A30}$ . Ранее описанные молекулярные маяки MM1 и MM2, меченые красителями FAM/BHQ1 на 5'- и 3'-концах соответственно, использовались в качестве контроля [553]. Мы получили их производные, не содержащие остатка BHQ1 и несущие один (MM1-1х, MM2-1х), два (MM1-2х, MM2-2х) или три (MM1-3х, MM2-3х) остатка  $tC^O_{A30}$  вблизи 3'-конца (**Рисунок 2.3.58А, Таблица 2.3.14**). Поскольку азотистые основания, особенно гуанин, непосредственно прилегающие к FAM, могут снижать его ИФ [554], мы также получили две последовательности, меченные только FAM

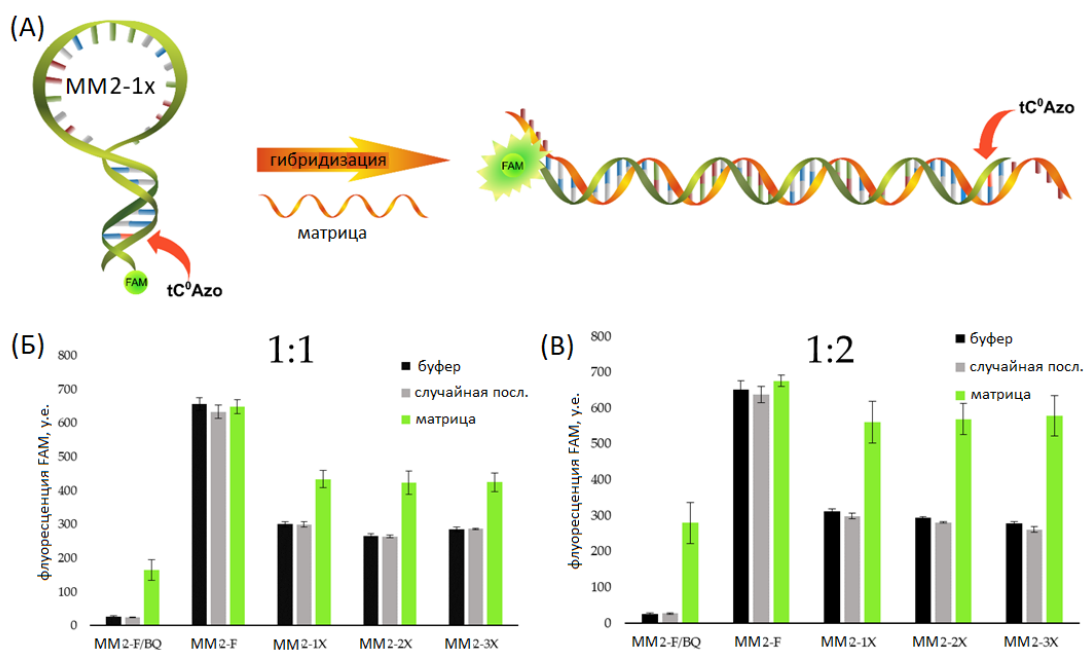
на 5'-конце, MM1-F и MM2-F, чтобы оценить вклад соседних остатков гуанина в тушение флуоресценции FAM (Таблица 2.3.14).



**Рисунок 2.3.58.** Влияние  $tC^O_{Azo}$  на термическую стабильность ММ: (А) структура стебель-петля модифицированных ММ1 и ММ2; (Б) спектры поглощения и испускания тушителя  $tC^O_{Azo}$  и флуорофора FAM соответственно; термическая стабильность структур стебель-петля на основе ММ1 (В) и ММ2 (Г). Значения  $T_{пл}$  получены УФ-плавлением (ММ1 и ММ2) и плавлением с регистрацией флуоресценции (другие ММ). Над столбиками приведена  $\Delta T_{пл}$ , рассчитанная как разница в  $T_{пл}$  между  $tC^O_{Azo}$ -модифицированным или содержащим FAM/BNQ1 ММ и немеченым ОДН с той же нуклеотидной последовательностью.

Тушение флуоресценции FAM остатком  $tC^O_{Azo}$  в тесте с плавлением по флуоресценции позволяет оценить термическую стабильность ММ и сравнить ее с температурой немодифицированного ОДН и модифицированных FAM/BNQ1 ММ (Рисунок 2.3.58В и Г). Введение модификации  $tC^O_{Azo}$  в ММ1 оказало более выраженное влияние на термическую стабильность, достигнув  $T_{пл}$  ММ1-F/BQ для дважды модифицированного ММ1-2X. В контексте ММ2 стабилизирующий эффект  $tC^O_{Azo}$  был менее выражен, и однократно модифицированный ММ2-1X имел  $T_{пл}$ , почти равную температуре плавления немеченого ММ2, полученной с помощью УФ-плавления. Между тем, двойное мечение FAM/BNQ1 в ММ1-F/BQ и ММ2-F/BQ привело к значительной стабилизации, предположительно из-за стэкинг-взаимодействий меток друг с другом и соседними нуклеиновыми основаниями. Чтобы исключить возможность тушения флуоресценции соседними остатками гуанина в закрытом состоянии ММ [554,555], мы изучили 5'-FAM-меченые ММ1-F/ММ2-F без тушителя  $tC^O_{Azo}$ . Данные ММ не показали заметного изменения ИФ при плавлении.

Затем производные MM2-F/BQ, MM2-F и MM2 с одним, двумя или тремя остатками  $tC^O_{Azo}$  смешивали с полностью комплементарным ОДН (матрица) или ОДН со случайной последовательностью (scr) в соотношении 1:1 или 1:2 (**Рисунок 2.3.59А**; последовательности представлены в **Таблице 2.3.14**). Образование дуплекса между маяком и матрицей приводило к увеличению ИФ, предположительно из-за пространственного разделения FAM и BHQ1 или модификации  $tC^O_{Azo}$ , в то время как присутствие ОДН со случайной последовательностью не вызывало изменений ИФ во всех случаях (**Рисунок 2.3.59Б и В**). Меченый FAM MM2-F демонстрировал самую высокую ИФ в свернутом состоянии и был нечувствителен к добавлению обеих последовательностей. Усиление флуоресценции (УФЛ) MM2-F/BQ при гибридизации составило 6,1 и 10,7 для соотношений 1:1 и 1:2 соответственно. Эффект разгорания для всех модифицированных MM2 был почти одинаковым, и УФЛ составляло 1,5 (1:1) и 1,9 (1:2). Хотя ИФ в открытом состоянии была выше в случае  $tC^O_{Azo}$ -модифицированных MM2 по сравнению с MM2-F/BQ, значения УФЛ были ниже из-за их более высокой фоновой флуоресценции в закрытом состоянии. По сравнению с однократно  $tC^O_{Azo}$ -модифицированным MM2-1X, введение дополнительных одного или двух остатков  $tC^O_{Azo}$ , расположенных на расстоянии 5 и 7 нуклеотидов от метки FAM в стебле, не привело к дополнительному усилению тушения FAM (**Рисунок 2.3.59Б и В**). Это наблюдение, вместе с небольшим перекрытием спектров испускания FAM и поглощения  $tC^O_{Azo}$  (**Рисунок 2.3.58Б**), говорит в пользу контактного тушения флуоресценции FAM модификацией [240]. В целом, минимальное влияние  $tC^O_{Azo}$  на термическую стабильность MM и способность тушить флуоресценцию 5'-FAM, предположительно за счет контактного тушения при расположении вблизи 3'-конца, расширяет возможности точной настройки свойств MM.



**Рисунок 2.3.59.** Увеличение ИФ при раскрытии ММ на матрице: (А) гибридизация ММ2, модифицированного tC<sup>0</sup>Azo, с комплементарной последовательностью приводит к пространственному разделению флуорофора и тушителя, вызывая усиление ИФ (показан ММ2-1X); (Б) флуоресценция FAM ММ при гибридизации с матрицей по сравнению с буфером (без добавления ОДН) и ОДН со случайной последовательностью (scr) в соотношении ММ2:ОДН 1:1 (Б) и 1:2 (В).

Таким образом, мы разработали ряд подходов к оптимизации термодинамических свойств молекулярных маяков и рН-сенсоров, а также кинетических свойств последних. Кроме того, мы показали, что схема мечения определяет клеточную локализацию рН-сенсоров на основе иМ, что открывает возможности для отслеживания изменений рН в различных компартментах живых клеток.

Помимо использования в составе различных наноустройств, иМ, по-видимому, имеют биологическое значение, поскольку обнаружены в ядрах живых клеток [268] и могут регулировать транскрипцию [556,557]. Низкомолекулярные соединения, которые связывают геномные неканонические вторичные структуры ДНК в регуляторных областях, рассматриваются как потенциальные терапевтические средства. Таким образом, необходимы надежные подходы к высокопроизводительному скринингу (ВПС) подобных соединений для оценки их стабилизирующих свойств [176,178,503]. Регистрация изменения флуоресцентного сигнала при плавлении 5',3'-меченной ОДН в присутствии потенциальных лигандов является одним из наиболее привлекательных подходов, потому что для него требуется минимальное количество ОДН и его можно автоматизировать для

ВПС. Такие подходы уже были разработаны для скрининга G4-лигандов, но применимость этих методов для профилирования иМ-лигандов все еще остается открытым вопросом [433]. Недавние попытки разработать подобную систему выявили множество артефактов, связанных с вероятными взаимодействиями флуоресцентных красителей с ядром иМ и лигандами [176]. Отслеживание изменений КД-сигналов, специфичных для вторичной структуры, является более прямым и надежным методом. КД-спектроскопия редко используется при скрининге и вряд ли может быть автоматизирована для оценки влияния соединений на стабильность иМ [558]. Однако этот метод дает прямую информацию о стэкинг-взаимодействиях оснований в ядре иМ, в то время как флуоресцентные тесты с 5',3'-меченными ОДН основаны на изменениях расстояний между метками при сворачивании структуры. Ранее было показано, что чувствительные к микроокружению флуоресцентные аналоги нуклеотидов являются отличными зондами для изучения сворачивания ДНК и взаимодействий ДНК-белок [559–561]. Мы предположили, что метки, чувствительные к структурным изменениям, в петлях иМ могут помочь создать репортерную систему, свободную от артефактов, связанных с взаимодействиями между внешним красителем и ядром иМ и типичных для обычных иМ-образующих ОДН с концевыми метками.

Выше мы показали, что флуоресценция остатка *i*-clamp зависит от сворачивания иМ (**Рисунок 2.3.15**), и значения  $pH_{1/2}$  иМ, определенные при отслеживании pH-зависимого изменения ИФ, совпадают со значениями, определенными с помощью КД-спектроскопии. Основываясь на данных результатах, мы решили оценить производные 1,3-диаза-2-оксофеноксазина в иМ-образующих ОДН в качестве внутренних репортеров для отслеживания сворачивания-разворачивания иМ. Мы исследовали, будут ли вставки феноксазиновых псевдонуклеотидов в петли влиять на термическую стабильность иМ в слабокислых (pH 5,8) и близких к физиологическим (pH 6,7) условиях. Для этого, мы выбрали две иМ-образующие последовательности:  $G_0$  и  $U_0$ . Первая представляет собой геномную последовательность, которая сворачивается в иМ при нейтральном pH [44]. Вторая представляет собой модельную последовательность, использованную нами ранее для оценки влияния *i*-clamp и гуанидино-*i*-clamp на стабильность иМ.

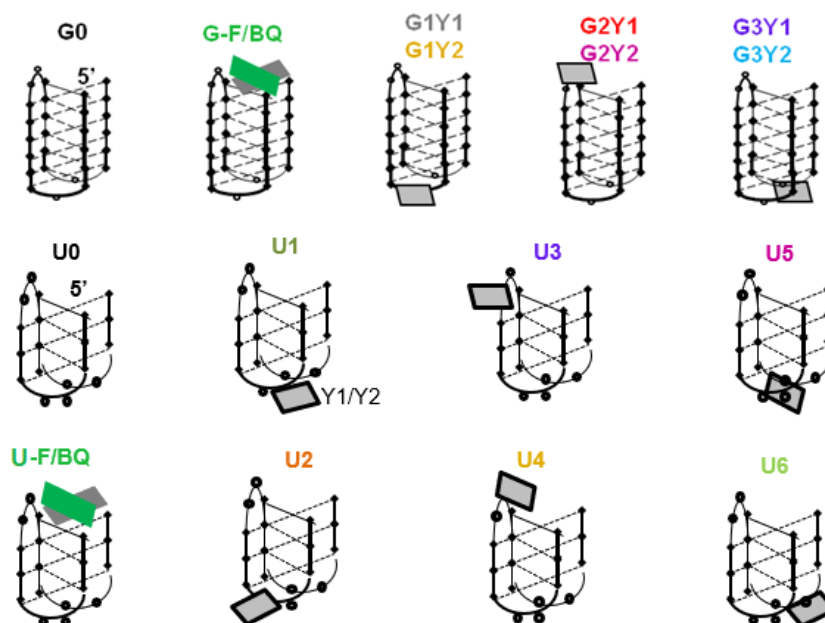
На первом этапе мы проверили, могут ли терминальные метки FAM или BHQ1 влиять на сворачивание иМ. Для этого мы сравнили следующие свойства меченых и немодифицированных иМ: а) конформация в свободном состоянии и в комплексах с лигандами; б) термическая стабильность в отсутствие лигандов; в) вызванная лигандами стабилизация/дестабилизация иМ. Последовательности ОДН приведены в **Таблице 2.3.15**, и их схематические изображения показаны на **Рисунке 2.3.60**.



**Таблица 2.3.15.** Последовательности и термическая стабильность иМ G<sub>0</sub>, U<sub>0</sub> и их аналогов.

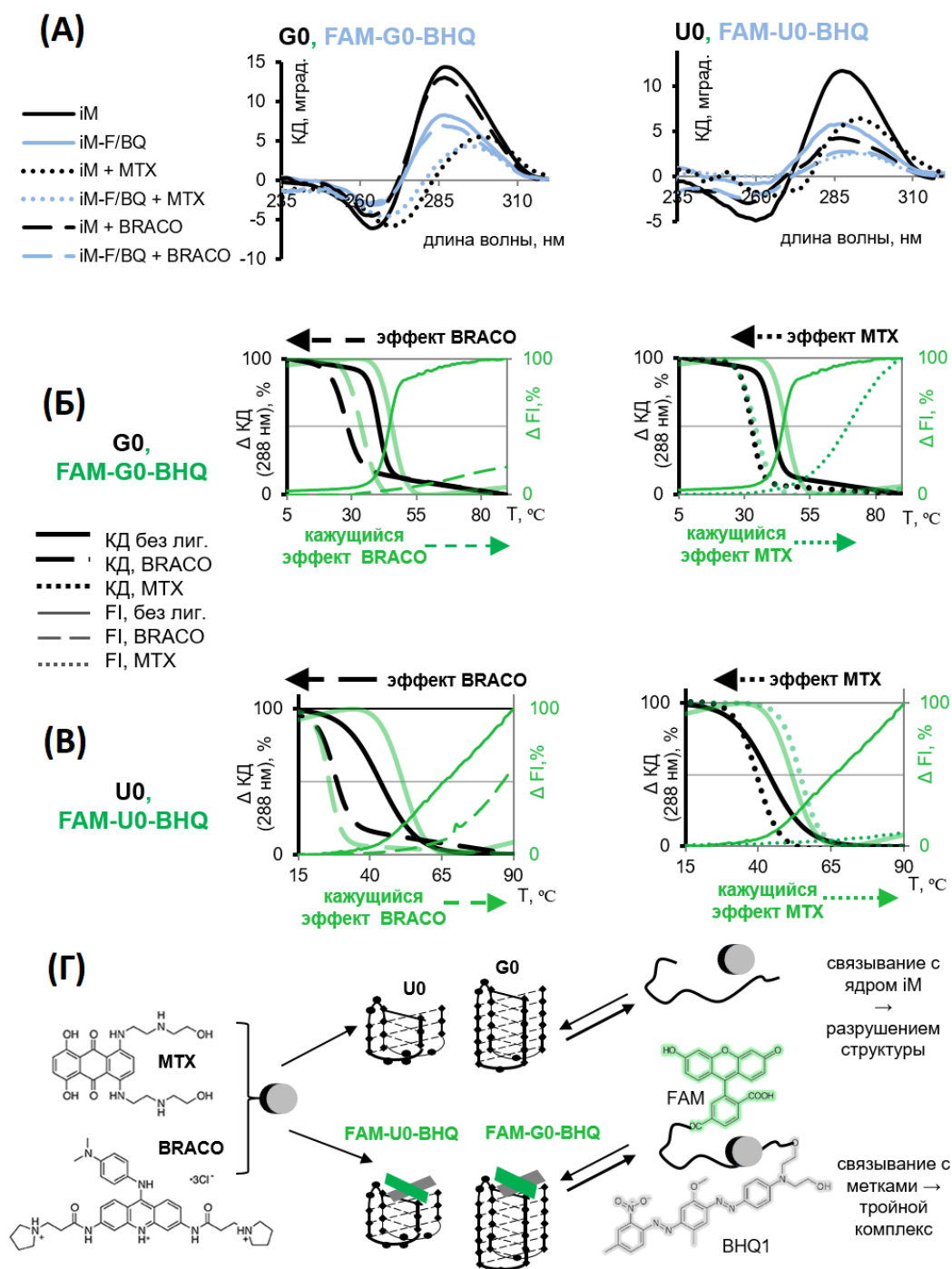
| шифр           | последовательность (5'-3')         | T <sub>пл</sub> ± 1, °C; КД-плавление/флуоресцентное плавление |                  |                  |                  |                  |
|----------------|------------------------------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                |                                    | X=Y <sub>1</sub>   | X=Y <sub>2</sub> | X=Z <sub>1</sub> | X=Z <sub>2</sub> | X=Z <sub>3</sub> |
| G <sub>0</sub> | CCCCCSTCCCCCCTCCCCCTCCCCC          |  |                  | 41/-             |                  |                  |
| G-F/BQ         | FAM-CCCCCSTCCCCCCTCCCCCTCCCCC-BHQ1 |  |                  | 46/45            |                  |                  |
| G <sub>1</sub> | CCCCCXXCCCCCCTCCCCCTCCCCC          | 41/41  | 40/40            | 39/39            | 39/40            | 39/39            |
| G <sub>2</sub> | CCCCCSTCCCCCXXCCCCCTCCCCC          | 40/41  | 40/39            | 38/39            | 40/38            | 38/38            |
| G <sub>3</sub> | CCCCCSTCCCCCCTCCCCCXXCCCCC         | 41/40  | 40/40            | 39/39            | 39/38            | 39/38            |
| U <sub>0</sub> | CCCATCCCATCCCATCCC                 | 43   |                  |                  |                  |                  |
| U-F/BQ         | FAM-CCCATCCCATCCCATCCC-BHQ1        | 52   |                  |                  |                  |                  |
| U <sub>1</sub> | CCCXTCCCATCCCATCCC                 | 43/51  | 42/55            |                  |                  |                  |
| U <sub>2</sub> | CCCAXCCTCCCATCCC                   | 39/51  | 41/53            |                  |                  |                  |
| U <sub>3</sub> | CCCATCCCXTCCCATCCC                 | 42/47  | 43/46            |                  |                  |                  |
| U <sub>4</sub> | CCCATCCCAXCCCATCCC                 | 44/47  | 42/46            |                  |                  |                  |
| U <sub>5</sub> | CCCATCCCATCCCXTCCC                 | 45/52  | 43/56            |                  |                  |                  |
| U <sub>6</sub> | CCCATCCCATCCCAXCCC                 | 39/48  | 41/47            |                  |                  |                  |

<sup>a</sup>Для U<sub>0</sub> и его аналогов погрешность T<sub>пл</sub> составляла 0,5 °C. Условия: 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0 (G<sub>0</sub> и его аналоги) или 6,7 (U<sub>0</sub> и его аналоги).



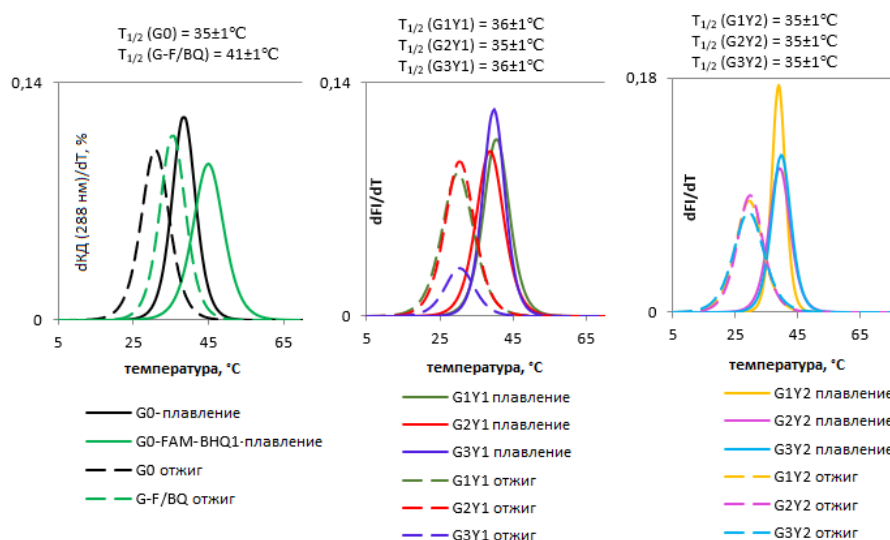
**Рисунок 2.3.60.** Схематические изображения немодифицированных иМ G<sub>0</sub> и U<sub>0</sub> и их аналогов. Аналоги включают производные, меченные FAM/BHQ1 (G-F/BQ и U-F/BQ), и феноксазин-содержащие аналоги G<sub>0</sub>/U<sub>0</sub> с модификациями в первой (G<sub>1</sub>Y<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>, U<sub>1</sub> и U<sub>2</sub>), второй (G<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>Y<sub>2</sub>, U<sub>3</sub> и U<sub>4</sub>) или третьей петле (G<sub>3</sub>Y<sub>1</sub>, G<sub>3</sub>Y<sub>2</sub>, U<sub>5</sub> и U<sub>6</sub>).

КД-спектроскопия выявила существенное уменьшение специфичной для иМ полосы (285-288 нм) для G-F/BQ и U-F/BQ, что указывает на менее эффективный стэкинг в ядре иМ (**Рисунок 2.3.61А**). В то же время метки оказывали умеренное стабилизирующее действие на вторичную структуру (**Таблица 2.3.15**), о чем свидетельствовали кривые плавления (**Рисунок 2.3.61Б и В**).



**Рисунок 2.3.61.** КД-спектры (А); кривые плавления G<sub>0</sub> (Б) и U<sub>0</sub> (В), их меченых аналогов и комплексов с лигандами; структуры иМ-лигандов и принципиальная схема их взаимодействия с иМ и метками (Г). Условия: 10 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,7 (U<sub>0</sub> и U-F/BQ) или 7,0 (G<sub>0</sub> и G-F/BQ). Концентрации ОДН: 1 мкМ (G<sub>0</sub> и G-F/BQ) или 2 мкМ (U<sub>0</sub> и U-F/BQ) для КД-экспериментов и 0,5 мкМ для экспериментов с плавлением по флуоресценции. Температура: 20 °С. Условия (Б,В): КД регистрировали при 288 нм, а ИФ FAM регистрировали при 520 нм с возбуждением при 495 нм.

Для точной оценки стабилизирующих эффектов, т.е. сравнения значений  $T_{1/2}$ , требуется регистрация как кривых плавления, так и кривых отжига. Однако мы подтвердили, что гистерезис был умеренным, а значения  $T_{пл}$  коррелировали со значениями  $T_{1/2}$  (**Рисунок 2.3.62**). Поэтому для упрощения анализа далее мы обсуждаем только кривые плавления.



**Рисунок 2.3.62.** Кривые плавления и отжига  $G_0$  и его аналогов. Первые производные КД-кривых плавления/отжига показаны для  $G_0$  и G-F/BQ, и первые производные кривых плавления, полученных при регистрации изменения ИФ, показаны для  $G_1$ ,  $G_2$  и  $G_3$ . Амплитуду КД регистрировали при 288 нм, и ИФ феноксазиновых производных регистрировали при 450 нм с возбуждением в 360 нм. Условия: 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  буфер, pH 6,7. Концентрация ОДН: 1 мкМ.

Данные флуоресцентного плавления для G-F/BQ соответствовали данным КД-плавления, тогда как в случае U-F/BQ верхнее плато было нечетким, что приводило к неинтерпретируемой кривой (**Рисунок 2.3.61Б и В**).

Чтобы проверить, влияет ли повышенная стабильность иМ, меченных F/BQ, на результаты флуоресцентного скрининга иМ-лигандов, мы повторили эксперименты по плавлению в присутствии известных малых молекул, влияющих на термическую стабильность иМ - митоксантрона (MTX) и BRACO-19 [176,562] (**Рисунок 2.3.61Г**). Как видно из КД-спектров смесей иМ-лиганд (**Рисунок 2.3.61А**), как МХТ, так и BRACO нарушают укладку остатков цитозина в ядре иМ. В соответствии с литературными данными [562], MTX вызывал сдвиг максимума КД-спектра до 295-300 нм (**Рисунок 2.3.61А**), что указывает на конформационные изменения иМ. В соответствии с уменьшением амплитуды КД-спектров эксперименты по КД-плавлению выявили негативное влияние лигандов на термическую стабильность иМ. И наоборот, отслеживание изменения ИФ при плавлении

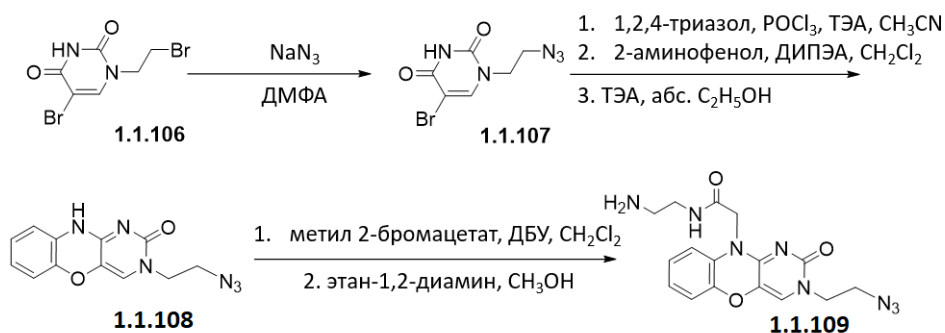
G-F/BQ и U-F/BQ показало стабилизацию, вызванную лигандами (**Рисунок 2.3.62**, **Таблица 2.3.16**). Эти данные привели нас к следующим выводам: а) терминальное мечение красителем/тушителем влияет на конформацию иМ; б) результаты профилирования лигандов по изменению ИФ при плавлении терминально меченых иМ не соответствуют данным, полученным при КД-плавлении немеченых иМ; в) оценка стабилизирующего/дестабилизирующего действия иМ-лигандов на основе FAM/BHQ1-меченных ОДН приводит к недостоверным результатам.

**Таблица 2.3.16.** Сравнение лиганд-индуцированной стабилизации/дестабилизации иМ, определяемой по КД-плавлению ( $G_0$  и  $U_0$ ) и плавлению по изменению ИФ (модифицированные аналоги).

| шифр   | Эффект MTX $\pm 2$ , °C <sup>a</sup>          | Эффект BRACO $\pm 2$ , °C <sup>a</sup>        |
|--------|---|---|
| G0     | -7  | -12   |
| G-F/BQ | По-видимому, положительный,<br>неопределенный | >45   |
| G1Y1   | -8  | -19   |
| G1Y2   | -8  | -19   |
| G2Y1   | -8  | -18   |
| G2Y2   | -8  | -18   |
| G3Y1   | -8  | -15   |
| G3Y2   | -8  | -15   |
| U0     | -4  | -17   |
| U-F/BQ | По-видимому, положительный,<br>неопределенный | По-видимому, положительный,<br>неопределенный |
| U3Y1   | -9  | Неопределенный                                |
| U3Y2   | -7  | Неопределенный                                |
| U4Y1   | -8  | Неопределенный                                |
| U4Y2   | -7  | Неопределенный                                |

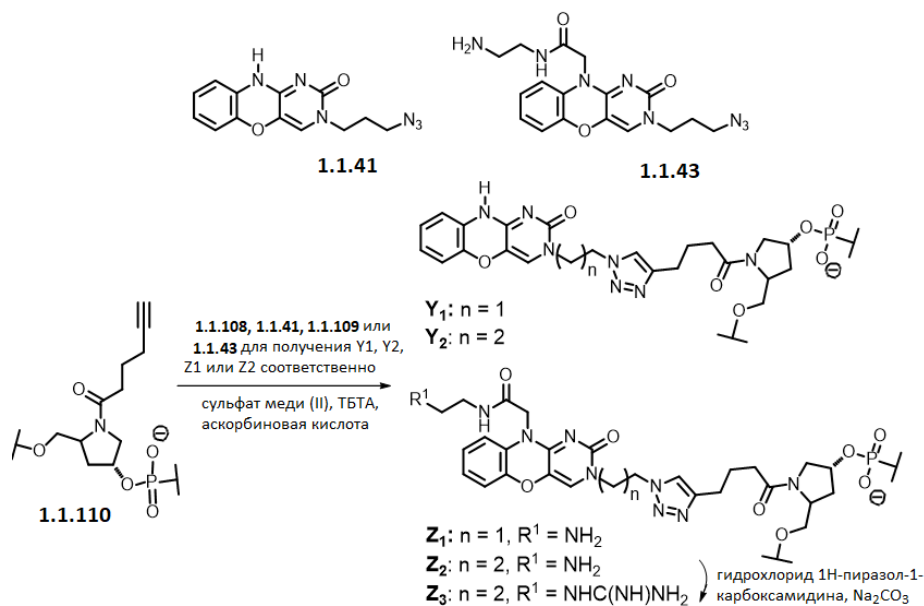
<sup>a</sup>Условия: 0,5 мкМ иМ, 10 мкМ лиганд, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфер, pH 5,8 ( $U_0$  и его аналоги) или 6,7 ( $G_0$  и его аналоги).

В связи с этим мы разработали серию новых псевдонуклеотидных производных феноксазина и использовали ранее опубликованные производные для внутреннего мечения иМ-образующих ОДН. Для получения исходного производного урацила **1.1.106** мы использовали 5-бромурацил и 1,2-дибромэтан (**Схема 2.3.4**) [563]. Добавление азидата натрия к производному **1.1.106** в ДМФА давало соединения **1.1.107**. Для синтеза **1.1.108** мы использовали метод, разработанный нами ранее (**Схема 2.2.1**). Атом С4 урацильного кольца активировали 1,2,4-триазолом, POCl<sub>3</sub> и ТЭА в CH<sub>3</sub>CN [429] с последующим замещением на 2-аминофенол в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Затем мы проводили циклизацию путем кипячения промежуточного продукта - N-(2-аминофенол)-замещенного 5-бромцитозина в смеси абсолютного этанола и ТЭА с получением соединения **1.1.108**. Атом N10 феноксазинового фрагмента алкилировали метил 2-бромацетатом в присутствии ДБУ в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, и сложный эфир превращали в амид, получая соединение **1.1.109**.



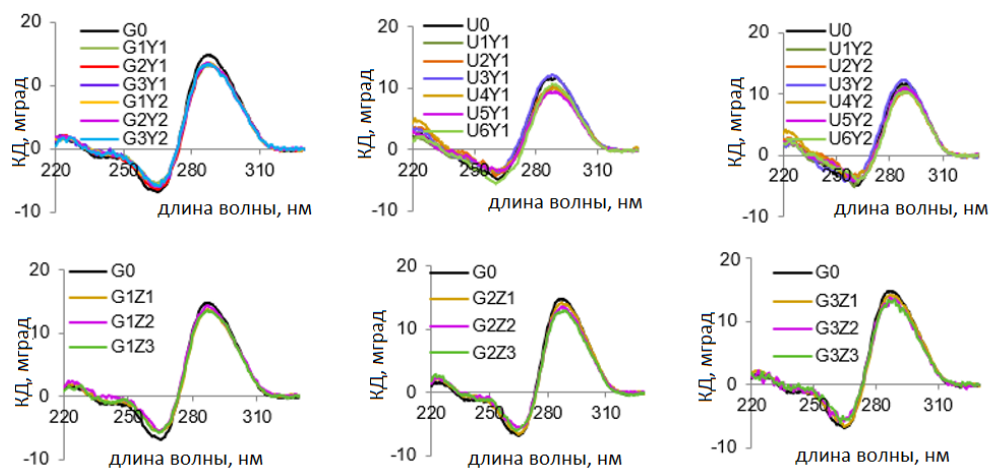
**Схема 2.3.4.** Получение азидосодержащих производных феноксазина.

Производные **1.1.108** и **1.1.109**, содержащие 2-азидоэтильную группу, и ранее описанные производные **1.1.41** и **1.1.43** с 3-азидопропильной группой использовали для постсинтетической конъюгации с иМ-образующими ОДН, содержащими алкин-модифицированные остатки 4-гидроксипропинола **1.1.110**, применяя катализируемое медью 1,3-диполярное циклоприсоединение (**Схема 2.3.5**). В результате мы получили ОДН  $G_{1-3}$  и  $U_{1-6}$  с модификациями Y1, Y2, Z1 и Z2 (**Таблице 2.3.15**). ОДН, несущие модификацию Z3, были получены путем гуанидинилирования ОДН, содержащих Z2.



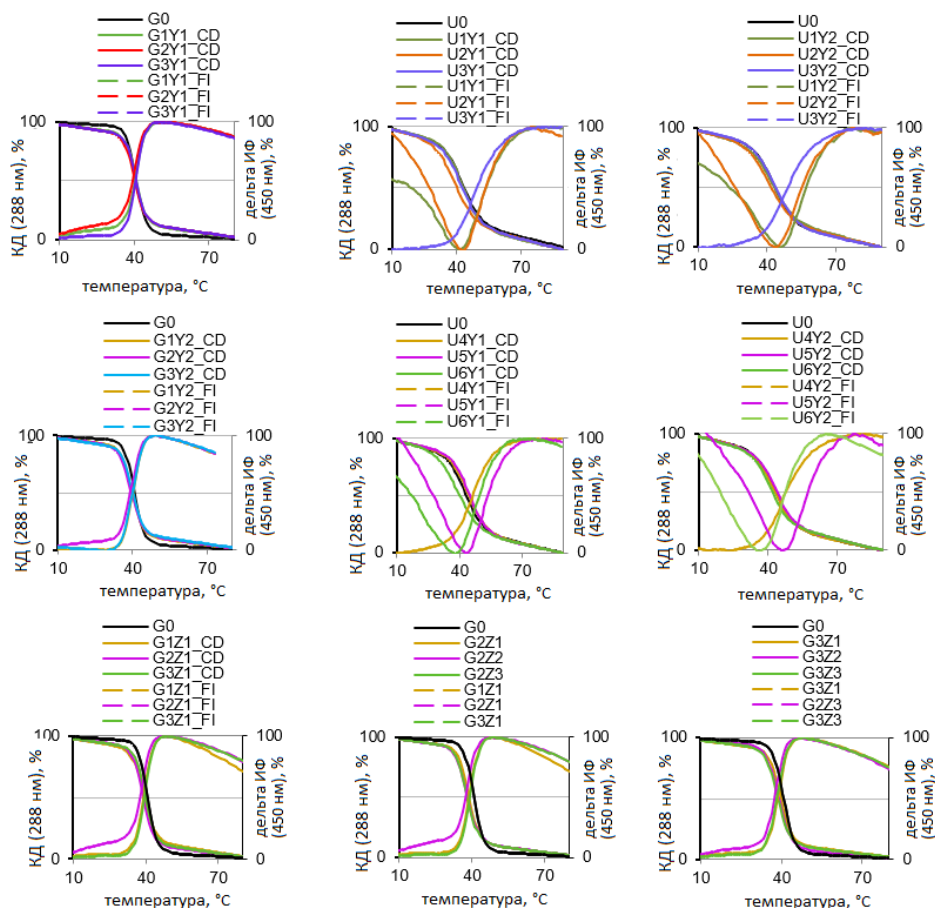
**Схема 2.3.5.** Включение азидосодержащих производных феноксазина в олигонуклеотиды посредством азид-алкинового циклоприсоединения и гуанидинилирование.

В отличие от F/BQ-меченных ОДН, все Y/Z-меченные ОДН имели КД-спектры, аналогичные спектрам немодифицированных аналогов, что позволяет предположить отсутствие структурных изменений в ядре иМ при введении производных феноксазина (**Рисунок 2.3.63**).



**Рисунок 2.3.63.** КД-спектры феноксазин-содержащих аналогов  $G_0$  и  $U_0$ . Условия: 10 mM  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$  буфер, pH 5,8 (аналоги  $U_0$ ) или 6,7 (аналоги  $G_0$ ). Концентрации ОДН: 1 мкМ ( $G_0$  и его аналоги) или 2 мкМ ( $U_0$  и его аналоги). Температура: 20 °С.

Как и ранее описанные феноксазиновые производные [6], новые производные флуоресцируют с максимумами возбуждения и испускания при 360 и 450 нм соответственно. Внутри структуры иМ флуоресценция феноксазина частично тушилась, и разрушение иМ приводило к усилению флуоресценции в 2–3 раза. Мы зарегистрировали кривые плавления по флуоресценции всех модифицированных иМ (Рисунок 2.3.64), отслеживая изменения ИФ в максимуме эмиссии (450 нм) и сравнили их с результатами КД-плавления  $U_0/G_0$ .



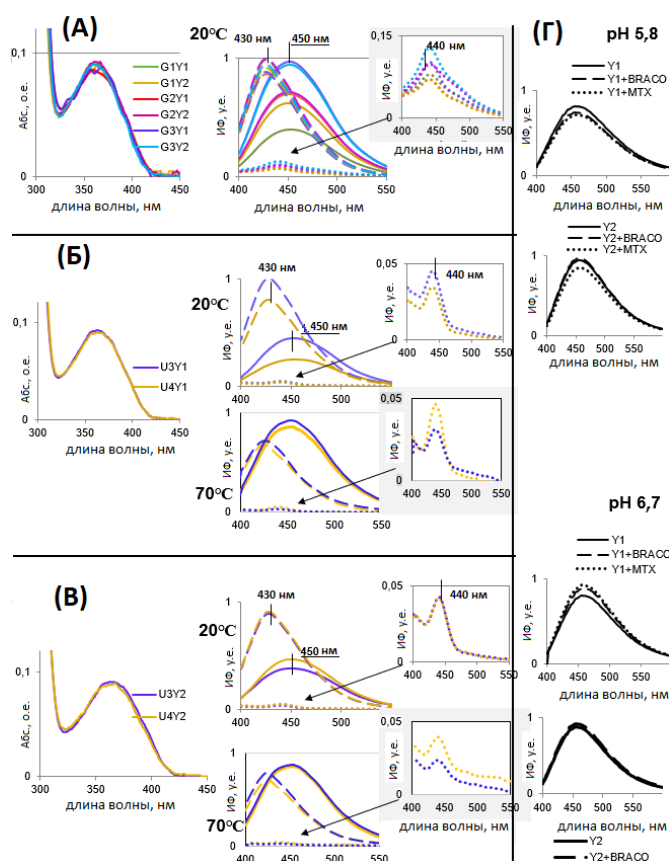
**Рисунок 2.3.64.** КД-плавление и плавление по изменению ИФ феноксазин-содержащих аналогов  $U_0$  и  $G_0$ . КД регистрировали при 288 нм, и флуоресценцию производных феноксазина регистрировали при 450 нм при возбуждении в 360 нм.

Модификации Y1 и Y2 не изменили термическую стабильность  $G_0$  и явно превосходили модификации Z1, Z2 и Z3, которые вызвали незначительную дестабилизацию иМ (Таблица 2.3.15). Важно отметить, что результаты плавления по изменению ИФ всех аналогов  $G_0$  совпадали с результатами по КД-плавлению (Рисунок 2.3.64). В аналогах  $U_0$  (Таблице 2.3.15) модификации Y1 и Y2 в петлях 1 и 3, по-видимому, стабилизировали иМ, но изменения ИФ едва превышали температурную зависимость. В центральной петле модификации Y1 и Y2 были достаточно чувствительны к вторичной структуре, а результаты плавления по изменению ИФ хорошо согласовывались с КД-плавлением.

Затем мы проверили, применимо ли флуоресцентное плавление Y1 или Y2-содержащих иМ для скрининга лигандов. MTX и BRACO снова были выбраны как примеры лигандов, влияющих на стабильность иМ. При смешивании феноксазиновых производных 1.1.108 и 1.1.41 (азид-содержащие компоненты для введения Y1 и Y2 соответственно) с лигандами спектры флуоресценции не изменились. Однако в комплексах с модифицированными иМ лиганды влияли на флуоресценцию Y1 и Y2, вероятно, из-за

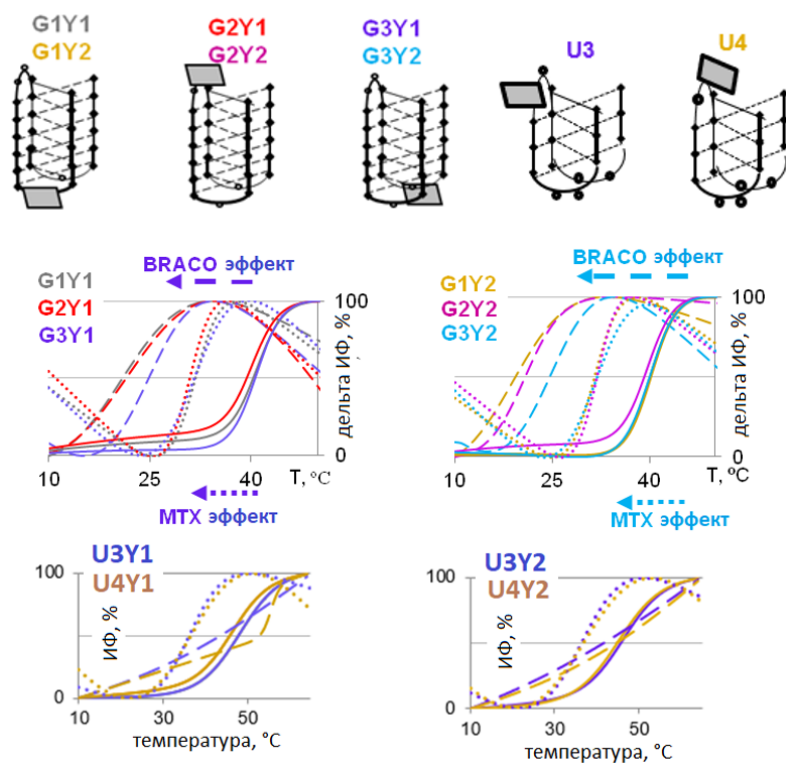


индуцированных лигандами искажений ядра иМ (**Рисунок 2.3.65**). МТХ приводил к умеренному гипсохромному сдвигу и существенному тушению флуоресценции, тогда как BRACO вызывал существенный гипсохромный сдвиг и усиление флуоресценции (**Рисунок 2.3.65**). Нагревание модифицированных иМ и их комплексов с лигандами приводило к увеличению флуоресценции феноксазина. Кривые плавления по флуоресценции показаны на **Рисунке 2.3.66**. В присутствии BRACO кривые плавления аналогов  $U_0$  были в основном нечеткими, тогда как аналоги  $G_0$  были значительно дестабилизированы. МТХ вызывал меньшую, но все же значительную дестабилизацию аналогов  $U_0$  и  $G_0$ .



**Рисунок 2.3.65.** Спектры поглощения и флуоресценции феноксазин-содержащих ОДН и их комплексов с лигандами. Концентрация ОДН: 1 мкМ (измерения оптической плотности) или 0,5 мкМ (измерения флуоресценции). Концентрация лиганда: 10 мкМ. Сплошные линии, свободный ОДН (А-В) или свободная метка (Г); пунктирные линии — комплексы с BRACO; точечные линии — комплексы с МТХ. (А) Спектры поглощения (слева) и эмиссии флуоресценции (справа) производных  $G_0$  с модификациями Y1 и Y2. (Б) Спектры поглощения (слева, 20°C) и эмиссии флуоресценции (справа, 20°C или 70°C) производных  $U_0$  с модификацией Y1. (В) Спектры поглощения (слева, 20°C) и эмиссии флуоресценции (справа, 20°C или 70°C) производных  $U_0$  с модификацией Y2. (Г) Спектры флуоресценции Y1 (1.1.108) и Y2 (1.1.41) и их комплексов с лигандами.





**Рисунок 2.3.66.** Кривые плавления по изменению ИФ феноксазина в аналогах  $G_0$  и  $U_0$  в комплексах с лигандами. ИФ феноксазиновых производных регистрировали при 450 нм (лиганд отсутствует, сплошные линии), 430 нм (аналоги  $G_0$  в присутствии 20 эквивалентов BRACO, пунктирные линии) или 440 нм (аналоги  $G_0$  в присутствии 20 эквивалентов MTX, точечные линии). Концентрация ОДН составляла 0,5 мкМ

Мы пришли к выводу, что иМ, несущие в петлях новые феноксазиновые псевдонуклеотиды, могут стать отправной точкой для разработки инструментом высокопроизводительного скрининга иМ-лигандов. Влияния лигандов на термическую стабильность немодифицированных иМ (определенное методом КД-плавления) и модифицированных иМ (определенных путем регистрации изменений ИФ феноксазина при плавлении) хорошо согласовывались (Таблица 2.3.16). В то же время тест с использованием иМ, меченных парой красителей FAM-BHQ-1, приводил к противоположным и неверным результатам. Разработанные системы на основе иМ, модифицированных феноксазиновыми псевдонуклеотидами, предпочтительны по сравнению с обычными системами на основе терминального мечения двумя красителями, поскольку позволяют избежать нежелательных взаимодействий красителей с ядром иМ и лигандом, приводящих к неправильным результатам. Таким образом, метод позволяет объединить преимущества ВПС с регистрацией изменений флуоресцентного сигнала и точность, сравнимую с более прямыми подходами, основанными на КД-спектроскопии. В

дальнейшем, наша система может быть использована для разработки высокопроизводительных систем скрининга иМ-лигандов.

В результате приведенных в разделе исследований:

- разработан ряд нуклеотидных модификаций, позволяющих регулировать термодинамические и кинетические параметры иМ;
- разработан набор рН-сенсоров на основе мономолекулярных иМ, позволяющих отслеживать небольшие изменения рН вблизи физиологических значений в различных клеточных отделах;
- разработана платформа для надежной оценки способности низкомолекулярных соединений влиять на стабильность иМ.

## 2.4. Химическая модификация аптамеров для определения структуры и регуляции сродства

Выше оксофеноксазиновый остов был использован при разработке низкомолекулярных стабилизаторов G4, в составе нуклеотидных модификаций для модуляции стабильности ПУ и иМ, для создания системы скрининга низкомолекулярных модуляторов стабильности иМ и рН-сенсоров.

В данном разделе продемонстрирована применимость описанной  $tC^O$  и впервые синтезированной 7,8-дигидро-8-оксо-1, $N^6$ -этенoadениновой (оксо- $\epsilon A$ ) модификаций в составе аптамеров для картирования нуклеотидных остатков, участвующих в процессе узнавания мишени, и для регуляции сродства к мишени, опосредованной ионами металла, соответственно.

Введение единичных остатков  $tC^O$  в различные положения аптамера BV42 к гемагглютнину вируса гриппа А позволило получить данные об их вовлеченности в образование иМ структуры. Впервые был продемонстрирован потенциал данной модификации для выявления сайта связывания аптамера с мишенью, что позволило провести дизайн конформационно однородного производного BV42, сохраняющего способность связываться с гемагглютинином. В разделе также описан дизайн, синтез и изучение физико-химических и биологических свойств уникальной нуклеотидной модификации оксо- $\epsilon A$ , представляющей собой комбинацию двух природных окислительных повреждений ДНК, 7,8-дигидро-8-оксоаденина (оксо-А) и 1, $N^6$ -этенoadенина ( $\epsilon A$ ). УФ-, КД- и ЯМР-спектроскопия ДНК-дуплексов показали, что оксо- $\epsilon A$  принимает неканоническую син конформацию, не нарушает геометрию ДНК-спирали и является функциональным аналогом тимина. Мы продемонстрировали способность оксо- $\epsilon A$  повышать стабильность антипараллельных дуплексов за счет образования ею комплексов между собой и с остатком цитозина в присутствии ионов серебра ( $Ag^+$ ). Исследования двойной замены  $T \rightarrow$  оксо- $\epsilon A$  в составе модельного тромбин-связывающего аптамера ТВА15 позволило разработать модифицированный аптамер с программируемым сродством.

Данный раздел написан по результатам совместной работы автора с сотрудниками кафедры химии природных соединений (химический факультет МГУ, Москва), лаборатории структуры и функций биополимеров (Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства, Москва), сотрудниками института химической физики Rocasolano (Мадрид, Испания), института неорганической и аналитической химии университета Мюнстера

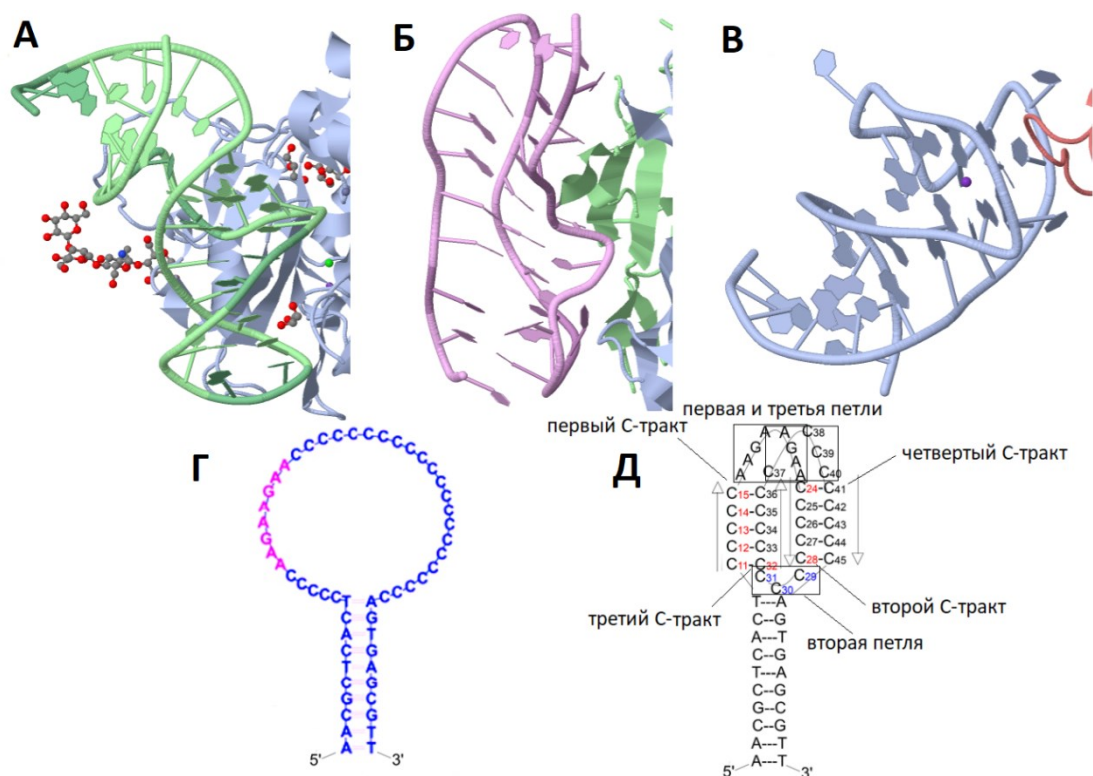
(Мюнстер, Германия) и кафедры биологической инженерии и кафедры химии и центра по изучению влияния экологических факторов на здоровье человека (Массачусетский технологический институт, Кэмбридж, США): *Nucleic Acids Res.* 2022. № 50. С. 3056-3069; *J. Inorg. Biochem.* 2021. № 219. С. 111369; *Nucleic Acids Res.* 2025. № 53. С. 3056-3069

При этом, в данном разделе лично и под руководством автора или при его участии выполнены следующие эксперименты:

- синтез tC<sup>O</sup> фосфорамидита;
- дизайн и синтез tC<sup>O</sup>-модифицированных ОДН (аналоги аптамера BV42);
- дизайн конформационно однородного немодифицированного аналога аптамера BV42;
- дизайн и синтез оксо-εА фосфорамидита;
- синтез немодифицированных и оксо-εА-модифицированных ОДН;
- оценка термической стабильности и вторичной структуры дуплексов, содержащих немодифицированные и оксо-εА-модифицированные ОДН, с помощью УФ-, КД- и флуоресцентной спектроскопии в присутствии и в отсутствие Ag<sup>+</sup>;
- эксперименты по удлинению праймера на немодифицированной и оксо-εА-модифицированной матрицах;
- дизайн и синтез оксо-εА-модифицированного ОДН (аналог аптамера TBA15).

Оптимизация сродства и селективности является критическим аспектом разработки аптамеров как во время, так и после проведения SELEX. Оптимизация последовательности аптамера и включение неприродных нуклеотидов, которые могут обеспечить дополнительные контакты для повышения стабильности комплекса аптамер-мишень, позволяет снизить константы диссоциации ( $K_D$ ) до значений вплоть до 2-20 пМ [564–568]. Кроме того, структурная оптимизация может обеспечить увеличение доли конформации(ий) аптамера, участвующего(их) в эффективном распознавании мишени, что позволяет дополнительно снизить значений  $K_D$  комплексов аптамер-белок в 10-100 раз [569,570].

Обычно аптамеры содержат шпильчатые структуры с вставками/делециями, которые приводят к образованию выпетливаний, неканонических пар оснований или других нестандартных структурных фрагментов, создавая уникальную поверхность для взаимодействия с мишенью. Более того, неканонические структуры нуклеиновых кислот, такие как триплексы и G4, могут участвовать в распознавании мишени (**Рисунок 2.4.1А-В**) [197]. Следует отметить, что аптамеры с подтвержденной иМ структурой ранее описаны не были. Тем не менее известен ряд белков, связывающихся с геномными иМ [115,125,571,572].



**Рисунок 2.4.1.** Примеры структуры аптамеров в комплексе с белками-мишенями, частичная структура аптамера BV42 и полная предполагаемая вторичная структура одного из его конформеров. Неканонические вторичные структуры ДНК-аптамеров обеспечивают уникальные поверхности для распознавания мишеней. (А) аптамер RB011 (показан зеленым) на основе шпильки в комплексе с аутооксином (PDB ID 5HRT); (Б) аптамер SL1049 (показан фиолетовым) на основе триплекса в комплексе с фактором роста нервов (PDB ID 4ZBN); (В) аптамер RE31 (показан голубым) на основе G4 в комплексе с тромбином (PDB ID 5CMX). (Г) последовательность ДНК-аптамера BV42 с длинным неструктурированным С-трактом, который может образовывать иМ; (Д) предполагаемая вторичная структура одного из конформеров BV42.

В 2014 году в результате рационального дизайна был получен набор ДНК-аптамеров, которые связываются с белком гемагглютинином вируса гриппа [573]. Среди них аптамер-лидер BV42 содержал протяженный участок, богатый остатками цитозина, и концевые последовательности, образующие дуплексную структуру (**Рисунок 2.4.1Г**). Аптамер ингибировал связывание вируса гриппа А с клетками-хозяевами и последующее их инфицирование при низких наномолярных концентрациях в натрий-фосфатном буфере с нейтральным pH [573]. Поскольку в 2014 г отсутствовала информация о стабильности иМ в нейтральных условиях, возможность образования данной структуры в BV42 авторами не рассматривалась. В связи с накопившимися в последующие за этим годы данными о стабильности некоторых иМ при близких к физиологическим pH [44], сотрудники кафедры

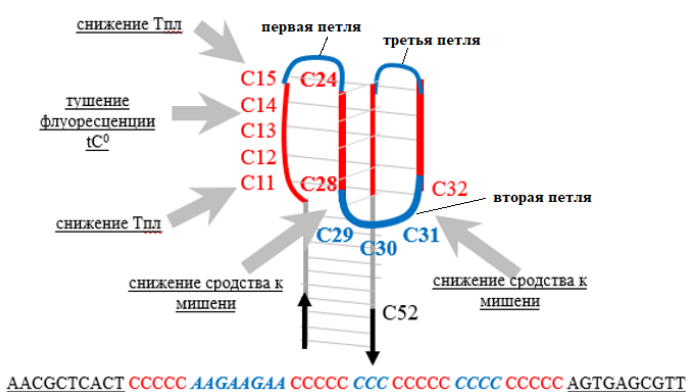
химии природных соединений (Алиева Р.Ш. и Завьялова Е.Г., химический факультет МГУ) предположили наличие в составе аптамера функционального иМ и подтвердили гипотезу с помощью КД-спектроскопии и БСИ. Однако, исследования методом ЯМР-спектроскопии указали на существование BV42 в виде смеси конформеров, что оставляло открытым вопрос непосредственного участия иМ в связывании гемагглютинаина.

Мы решили ввести единичные нуклеотидные модификации в состав последовательности аптамера BV42, образующего смесь конформеров, и изучить влияние замен на его связывающую способность. В качестве рабочей гипотезы предполагалось, что введение модификации может как непосредственно повлиять на сродство аптамера к мишени за счет контактов модификации с мишенью, так и увеличить долю в смеси пространственных изомеров, обладающих большим связывающим сродством.

В качестве такого модифицирующего звена мы выбрали описанный выше миметик цитозина, 1,3-диаза-2-оксофеноксазин ( $tC^O$ ), сохраняющий способность образовывать водородные связи, аналогичные цитозину, и минимально влияющий на термическую стабильность,  $pH_{1/2}$  и сворачивание иМ. Наличие у  $tC^O$  чувствительной к микроокружению флуоресценции может позволить провести дифференциацию нуклеотидных остатков по степени вовлеченности в образование иМ, как это уже было продемонстрировано ранее на более простой системе, иМ из промотора гена *c-Myc* [8]. Тушение флуоресценции  $tC^O$  в составе свернутого иМ вызвано его взаимодействием с окружающими протонированными остатками цитозина, как подтверждается компьютерными расчетами и предполагает фотоиндуцированный перенос электронов [574]. Модификация в середине С-тракта ( $tC^O:C^+$  пара, расположенная между двумя соседними парами  $C:C^+$ ) обеспечивает максимальное тушение флуоресценции. Модификация по концам С-тракта (пара  $tC^O:C^+$ , осуществляющая стэкинг-взаимодействия только с одной соседней парой  $C:C^+$ ) обеспечивает в 1,5 раза меньшее тушение флуоресценции; тогда как  $tC^O$  в петле (остаток не участвует в образовании пары  $tC^O:C^+$ ) приводит к небольшому тушению по сравнению с неструктурированной последовательностью, предположительно из-за слабых взаимодействий с соседней терминальной парой  $C:C^+$  и/или петлевыми азотистыми основаниями [8]. Мы провели дизайн и синтезировали набор модифицированных вариантов BV42 с единичными заменами  $C \rightarrow tC^O$  для выяснения локальной стабильности пар  $C:C^+$  и влияния модификации на сродство к мишени.

Выбор положений модификаций проводился по следующей схеме. В последовательности 55-звенного аптамера BV42 (Рисунок 2.4.2) выделяли три типа фрагментов: 1) концевые, образующие антипараллельный дуплекс; 2) С5-тракты,

предположительно входящие в ядро иМ; 3) фрагменты, предположительно соответствующие петлям иМ. Замены  $C \rightarrow tC^O$  вносили во все положения первого С-тракта (C11-C15), краевые положения второго С-тракта (C24, C28), все положения второй (центральной) петли (C29-C31), краевое положение третьего С-тракта (C32) и – в качестве отрицательного контроля – положение внутри антипараллельного дуплекса (C52). Результаты оценки эффектов модификаций, выполненной сотрудниками кафедры химии природных соединений (химический факультет МГУ), обобщены на **Рисунке 2.4.2**. Оценка включала анализ тушения флуоресценции  $tC^O$ , влияния замен на термостабильность иМ методами КД/УФ-плавления и влияния на сродство аптамера к гемагглютининому методом БЛИ.



**Рисунок 2.4.2.** Влияние замен  $C \rightarrow tC^O$  на характеристики аптамера BV42 и его флуоресценцию (схематичное представление). В последовательности аптамера фрагменты, соответствующие антипараллельному дуплексу, выделены черным, ядро иМ – красным, петли – синим. Серыми стрелками отмечены положения, в которых замены  $C \rightarrow tC^O$  оказывали наибольший эффект.

Флуориметрия подтвердила сворачивание иМ и его структурный полиморфизм (в особенности при pH 7), а также позволила картировать некоторые остатки внутри структуры иМ. Анализ термостабильности показал наибольшие эффекты в случае модификаций C11, C15, C24 и C30, что может указывать на их расположение во внешних гемипротонированных парах в соответствии с предложенной структурой. Интерферометрия выявила наибольшие отличия в сродстве C28- и C31-модифицированных аптамеров по сравнению с контролем, что позволяет предположить участие этих остатков в связывании с гемагглютинином.

Практическая значимость этих результатов обусловлена тем, что они позволили сконструировать конформационно однородное производное BV42 – CapTr4C3. Использование конформационно однородных аптамеров обеспечивает меньшую чувствительность к внешним условиям и в итоге – большую воспроизводимость при

детекции аналита. В то же время, расшифровка структуры и подтверждение функциональности упрощенного аптамера CapTr4C3 служат дополнительным подтверждением роли и структуры активного конформера исходного аптамера BV42. Дизайн CapTr4C3 опирался на работы коллектива проф. К. Гонзалеза по минимизации проскальзывания С-трактов в иМ и взаимовлиянию различных структурных мотивов, таких как иМ, неканонические тетрады, дуплексы.

Одномерные  $^1\text{H}$  ЯМР-эксперименты с BV42 предполагают одновременное образование иМ с гемипротонированными цитозинами и дуплекса с Уотсон-Криковскими парами оснований. На настоящий момент имеется единственная хорошо разрешенная структура фрагмента ДНК, содержащего иМ и спиральную В-форму, которые образуют так называемое иМ/дуплексное соединение [575]. Структура остается стабильной при нейтральном рН, отчасти из-за наличия малобороздочной тетрады G:T:G:T, накрывающий один конец иМ. Подобные тетрады могут вызывать значительные сдвиги  $\text{pK}_a$  соседней с ней пары оснований C:C $^+$ , что приводит к существенной стабилизации всей структуры при нейтральном рН. Наличие тетрады на одной стороне иМ-модуля не только стабилизирует структуру, но также может устранять потенциальные эффекты проскальзывания С-тракта относительно других, что приводит к улучшению качества ЯМР-спектров.

Поскольку анализ эффектов замен C $\rightarrow$ tC $^O$  выявил участие второй (центральной) петли иМ BV42 в связывании с гемагглютинином, эта петля была сохранена в CapTr4C3, тогда как первая и последняя петли были заменены короткими последовательностями, способными образовывать G:T:G:T тетраду с двумя петлями T2. Для облегчения интерпретации ЯМР-спектров мы также укоротили С-тракт до 4 остатков цитозина и удалили две АТ пары вблизи 5'- и 3'-концов дуплексного модуля. Кроме того, мы заменили пару АТ на границе дуплексного и иМ модулей на пару GC, чтобы дополнительно стабилизировать дуплексную часть. В рамках совместной работы с коллективами К. Гонзалеза и Е. Г. Завьяловой было показано соответствие структуры CapTr4C3 теоретическим представлениям и сохранение сродства данного аптамера к гемагглютину. Эта работа иллюстрирует возможности применения tC $^O$  в структурных исследованиях и рациональном дизайне аптамеров.

В продолжение наших исследований по использованию нуклеотидных модификаций в составе аптамеров, мы разработали флуоресцентный аналог тимина и показали, что модификация в составе антипараллельных дуплексов способна образовывать комплексы с двумя ионами серебра. При дизайне модификации мы использовали две идеи:

(1) смещение равновесия пуриновых (например, природных повреждений 8-оксогуанин и 8-оксоаденин) оснований в сторону син конформации может приводить к

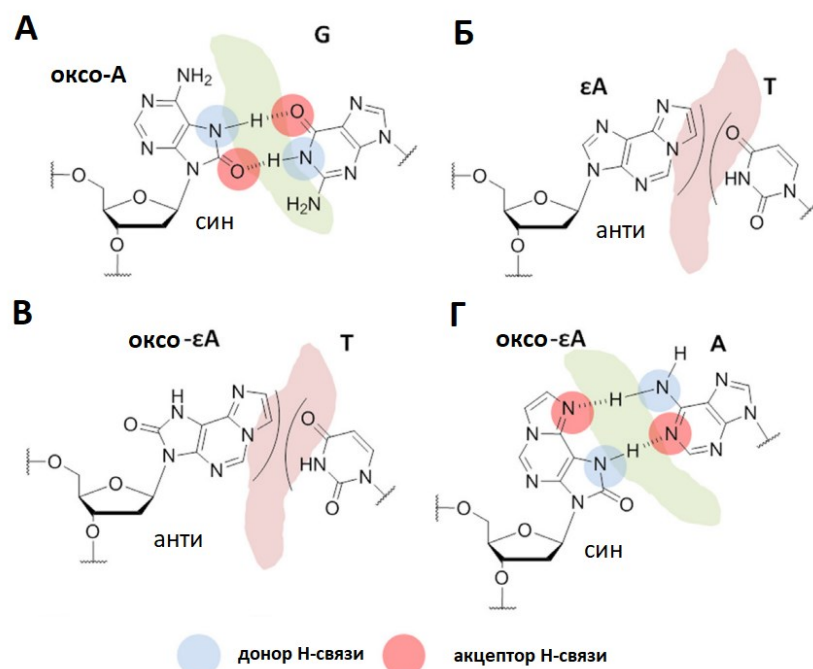


повышению термодинамической стабильности содержащих их дуплексов с пуриновым основанием в противоположенной цепи (т.е. поврежденное основание начинает вести себя как аналог моноциклического пиримидина);

(2) блокировка возможности образования водородных связей модификации в анти конформации и изменение схемы образования водородных связей в син конформации может обеспечить специфическое спаривание модифицированного пуринового основания с пуриновым основанием в противоположной цепи.

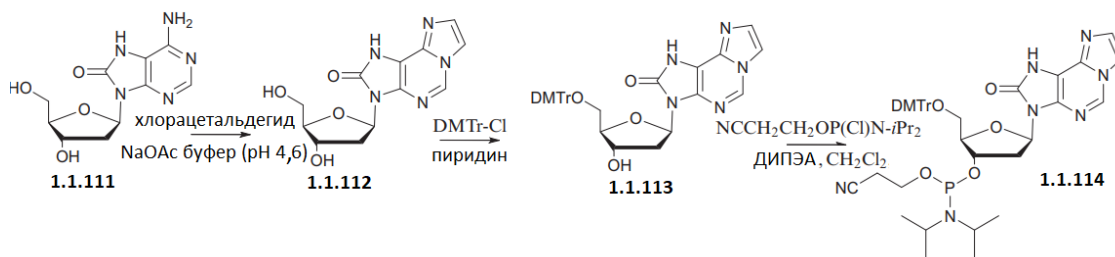
В качестве основы для модификации мы выбрали аденин, изучили возможные комбинации его повреждений и отобрали комбинацию 7,8-дигидро-8-оксоаденина (оксо-А) и 1,N<sup>6</sup>-этенoadенина (εА).

ДНК-повреждение оксо-А возникает при воздействии на ДНК активных форм кислорода и может образовывать стабильную Хугстиновскую пару в син конформации с противоположным гуанином (**Рисунок 2.4.3А**) [576]. Присутствие 8-оксогруппы в оксо-А увеличивает популяцию син конформера по сравнению с природным аденином [577,578] и приводит к трансверсивным мутациям А→С [576]. ДНК-повреждение εА также является мутагенным [579]. Этот ДНК-аддукт образуется после воздействия канцерогенного винилхлорида при реакции с аденином его метаболита, 2-хлорацетальдегида [580], или путем реакции аденина с эндогенными альдегидными побочными продуктами перекисного окисления липидов [581]. В анти-конформации εА неспособен образовывать пару с любым каноническим основанием в ДНК-дуплексах (**Рисунок 2.4.3Б**). Однако присутствие 1,N<sup>6</sup>-этеногруппы может частично сместить равновесие син-анти в сторону син конформации гликозидной связи [582], что приводит к включению А, С и G напротив εА [583–585]. Таким образом, оксо-А и εА имеют общий механизм мутагенеза: мутагенное спаривание достигается, когда поврежденное основание принимает син конформацию, что позволяет образовывать Хугстиновские водородные связи с немодифицированными основаниями, отличными от комплементарного тимина, в противоположной цепи ДНК. Комбинация данных повреждений приводит к оксо-εА модификации, которая должна блокировать каноническое Уотсон-Криковское спаривание оснований (**Рисунок 2.4.3В**) и обеспечивать как оптимальную геометрию Хугстиновского спаривания оснований, так и идеальную схему водородных связей (один донор водородной связи и один акцептор водородной связи) (**Рисунок 2.4.3Г**).



**Рисунок 2.4.3.** Предложенные схемы спаривания модифицированных азотистых оснований в различных конформациях. Син оксо-А:анти G (А) может способствовать трансверсивной мутации А→С. Анти εА не образует пару с Т (Б). Анти оксо-εА также не может образовывать пару с Т (В) и предложенное спаривание син оксо-εА:анти А (Г).

Фосфорамидит **1.1.114** для введения оксо-εА модификации был получен в три стадии (Схема 2.4.1). Обработка 2'-дезоксид-7,8-дигидро-8-оксоаденозина **1.1.111** [586] хлорацетальдегидом давала нуклеозидное производное **1.1.112**, которое было последовательно 5'-*O*-диметокситритилировано и 3'-*O*-фосфитилировано с получением целевого фосфорамидита **1.1.114**.



**Схема 2.4.1.** Синтез оксо-εА фосфорамидита.

Олигонуклеотиды были синтезированы с использованием фосфорамидитной химии, очищены с помощью ВЭЖХ и охарактеризованы с помощью ЖХ–МС. Для оценки влияния оксо-εА на стабильность ДНК-дуплексов мы синтезировали восемь модифицированных гомологичных декамеров с различными центральными триплетами (Рисунок 2.4.4). Используя УФ-плавление и КД-спектроскопию, мы оценили влияние оксо-εА на

стабильность дуплексов, в которых модификация была расположена в восьми фланкирующих контекстах, и где напротив модификации располагались все четыре возможных партнера по спариванию.

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | TAT | TGT | TCT | TTT |     | GAG | GGG | GCG | GTG |
| ATA | 39  | 33  | 23  | 26  | CTC | 41  | 24  | 12  | 21  |
| AXA | 35  | 29  | 25  | 18  | CXC | 35  | 28  | 14  | 20  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | AAA | AGA | ACA | ATA |     | CAC | CGC | CCC | CTC |
| TTT | 44  | 30  | 26  | 19  | GTG | 48  | 25  | 10  | 23  |
| TXT | 37  | 27  | 24  | 27  | GXG | 43  | 29  | 20  | 23  |

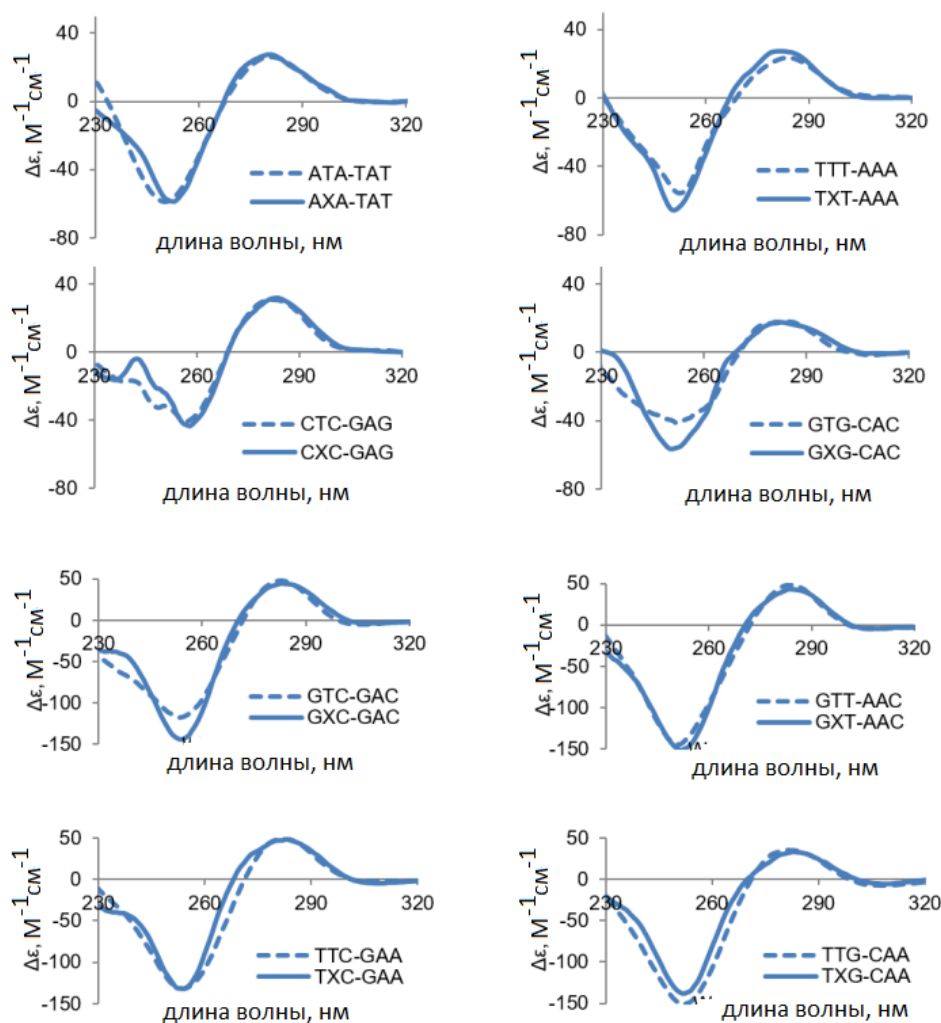
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | GAC | GGC | GCC | GTC |     | GAA | GGA | GCA | GTA |
| GTC | 42  | 36  | 12  | 26  | TTC | 38  | 33  | 14  | 24  |
| GXC | 48  | 33  | 8   | 18  | TXC | 42  | 28  | 7   | 28  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | AAC | AGC | ACC | ATC |     | CAA | CGA | CCA | CTA |
| GTT | 36  | 24  | 12  | 12  | TTG | 43  | 36  | 31  | 34  |
| GXT | 46  | 35  | 27  | 35  | TXG | 35  | 28  | 21  | 26  |

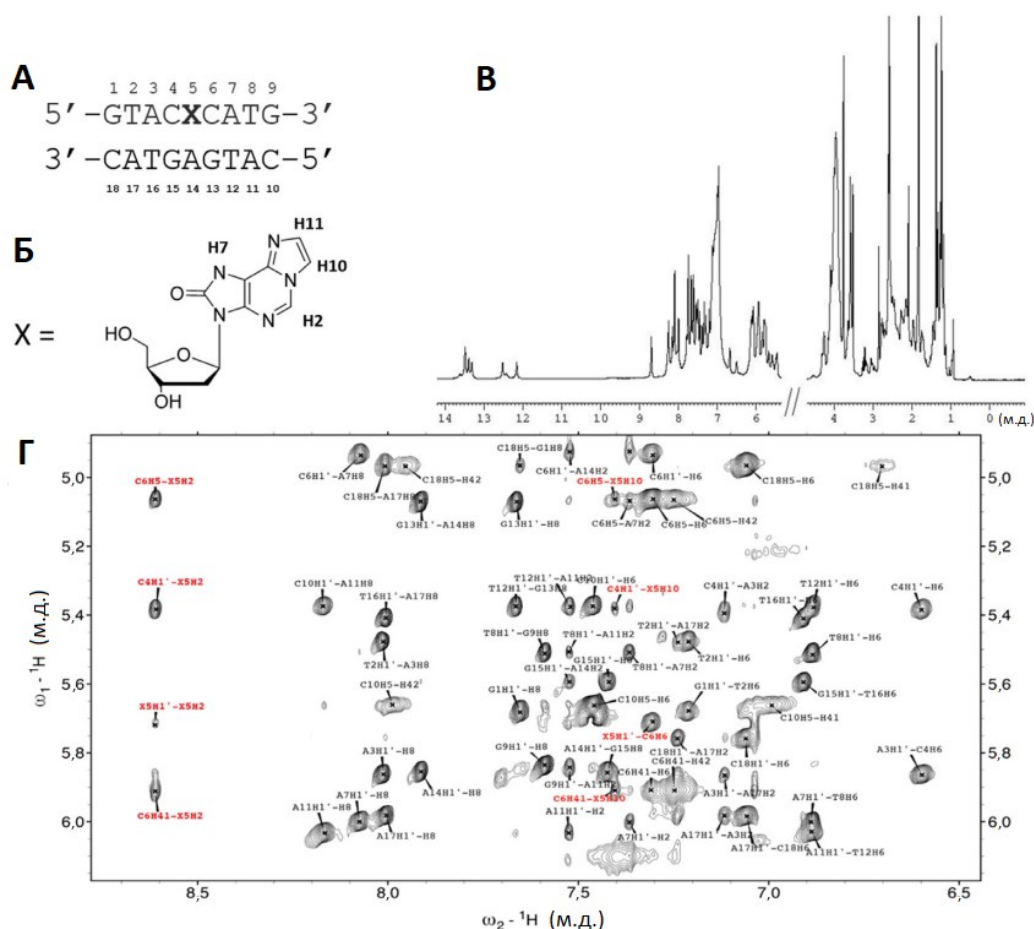
**Рисунок 2.4.4.** Тепловые карты, суммирующие относительную термическую стабильность ( $T_{пл} \pm 2^\circ\text{C}$ ) дуплексов, образованных немодифицированной (5'-GCANTNTACG-3') или модифицированной (5'-GCANXNTACG-3', X = оксо-εА) и комплементарной (5'-CGTANNNTGC-3') цепями, где N представляет собой любое из четырех природных нуклеиновых оснований.

Согласно «тепловой карте» относительной стабильности дуплексов (**Рисунок 2.4.4**), оксо-εА ведет себя аналогично тимину, каноническому партнеру аденина по спариванию оснований. В то же время оксо-εА модулирует стабильность дуплексов по сравнению с классической Т:А парой в зависимости от соседнего основания, и  $T_{пл}$  варьируется от  $-7 \pm 2^\circ\text{C}$  (TXT) до  $+10 \pm 2^\circ\text{C}$  (GXT) (**Рисунок 2.4.4**). Специфичность гибридизации также зависит от контекста, при этом самое низкое значение наблюдается для триплета GXT. КД-спектры дуплексов с различным окружением (5'-NXN-3'; где X = оксо-εА и N = любое нуклеиновое основание) близки к 5'-NTN-3' вариантам и соответствуют типичному КД-спектру дцДНК-последовательности с отрицательными и положительными полосами около 250 нм и 280 нм соответственно (**Рисунок 2.4.5**). Взятые вместе, полученные данные говорят в пользу того, что оксо-εА существенно не изменяет стабильность и геометрию дуплекса и, вероятно, образует почти идеальную пару с аденином в составе В-формы ДНК.



**Рисунок 2.4.5.** КД-спектры дуплексов, образованных немодифицированной (5'-GCANTNTACG-3') или модифицированной (5'-GCANXNTACG-3', X = оксо-εА) и комплементарной (5'-CGTANANTGC-3') цепями.

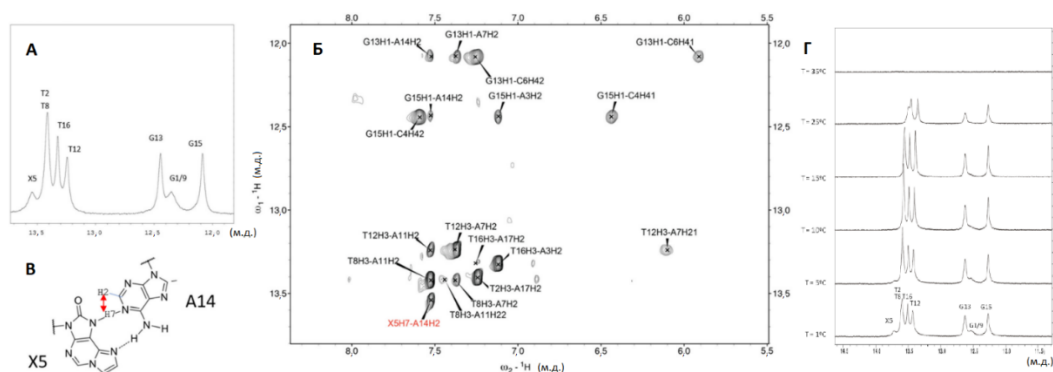
Для выяснения причин необычного селективного спаривания оксо-εА с аденином в противоположной цепи, коллеги из института химической физики Rocasolano (Мадрид, Испания) провели ЯМР исследования 9-мерного ДНК-дуплекса, используемого ранее для определения конформации εА напротив Т или G [582,587], в котором центральная пара оснований была заменена на оксо-εА:аденин (X:A) (**Рисунок 2.4.6А и Б**).



**Рисунок 2.4.6.** ЯМР-анализ оксо-εА в ДНК-дуплексе. (А) ДНК-дуплекс, используемый в ЯМР-исследованиях; (Б) Нумерация атомов водорода в нуклеозиде оксо-εА; (В) одномерный ЯМР-спектр; (Г) Н1'-ароматическая область NOESY-спектра (время смешивания 150 мс, T = 3 °C (резонансы протонов X5 отмечены красным)).

Одномерный ЯМР-спектр показан на **Рисунок 2.4.6В**. Необменивающиеся протоны относили, используя разработанные методы отнесения для правозакрученных двухцепочечных нуклеиновых кислот и DQF-COSY-, TOCSY- и 2D NOESY-спектры. Область протонов нуклеиновых оснований и Н1' показана на **Рисунке 2.4.6Г**. В ЯМР-спектрах наблюдали три сигнала в области имино протонов гуанина (**Рисунок 2.4.7А**). Два сигнала можно отнести к G13 и G15, проследив их связь с Н5 цитозинов (Н5C→HN4C→Н1G), участвующих в G:C парах (**Рисунок 2.4.7Б**). Наиболее вероятно, что широкий сигнал при 12,53 м.д. (**Рисунок 2.4.7А**) соответствует терминальным гуанинам (G1 и/или G9), что дополнительно подтверждается <sup>1</sup>H ЯМР-экспериментом с плавлением дуплекса (**Рисунок 2.4.7Г**). Имино протоны Н3 тимина были идентифицированы по их сильным межцепочечным кросс-пикам с Н2 спаренных с ними аденинов. NOE-кросс пики между имино протонами подтвердили последовательное отнесение всех имино- и большинства аминопроtons нетерминальных пар оснований. Наблюдаемые паттерны

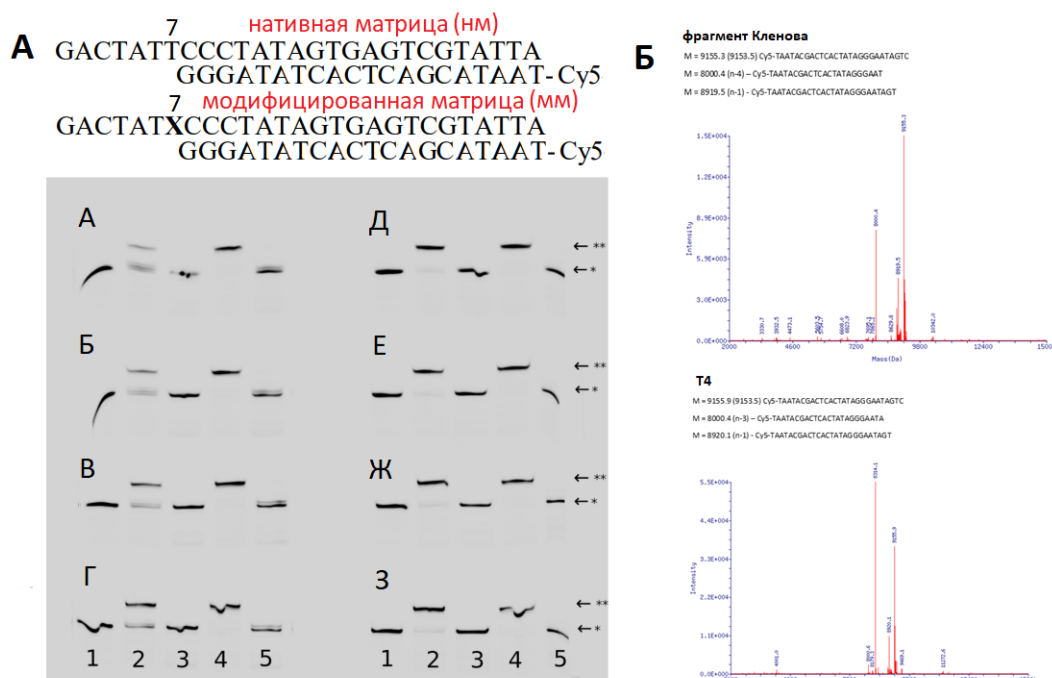
кросс-пиков указывают на то, что все основания образуют Уотсон–Криковские пары оснований. Интенсивности H1'–H6/H8 NOE для каждого из оснований указывают на то, что гликозидные углы всех немодифицированных оснований, включая A14, находятся в антиконформации (**Рисунок 2.4.6Г**). Обнаружено большое количество NOE кросс пиков с участием протонов остатка оксо-εА, но особое значение имеет NOE H7X5–H2A14 (**Рисунок 2.4.7Б**), подтверждающий спаривание оксо-εА:А, показанное на **Рисунке 2.4.7В**. Химический сдвиг одного из amino протонов A14 (9,62 м.д.) также указывает на участие в образовании водородной связи.



**Рисунок 2.4.7.** Область обменивающихся протонов ЯМР-спектра (А); NOESY-спектр (время смешивания 50 мс, T = 3°C) (Б). Идентифицированы все неконцевые пары оснований. Протон H7 X5 демонстрирует четкий NOE с H2A14 (отмечен красным), подтверждая предложенное спаривание оснований X5:A14, показанное в (В); <sup>1</sup>H ЯМР-эксперимент с плавлением дуплекса (Г).

Чтобы подтвердить сходство пары X-A с T-A на биохимическом уровне, мы провели эксперименты по удлинению праймера, используя немодифицированную (T в 7-ом положении) или модифицированную ДНК-матрицу (остаток оксо-εA в 7-ом положении), праймер, несущий 5'-концевой остаток Cy5, и большой фрагмент ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова) или ДНК-полимеразу T4 [588] (**Рисунок 2.4.8А**). Для обеих полимераз после 4-часовой реакции удлинения праймера в оптимальных условиях продукт удлинения был обнаружен только в присутствии всех четырех 2'-дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ), тогда как в отсутствие 2'-дезоксаденозинтрифосфата (дАТФ) реакция не дала никакого измеримого продукта удлинения (дорожки 2 и 3, 4 и 5 соответственно). Обе полимеразы были одинаково эффективны в удлинении праймера на немодифицированной матрице, и ДНК-полимераза T4 также эффективно удлиняла праймер на модифицированной матрице в течение 1 ч. В свою очередь, мы не наблюдали полного удлинения праймера с фрагментом Кленова на модифицированной матрице даже через 4 ч, что позволяет предположить, что оксо-εA может быть частичным блокатором репликации

для некоторых полимераз *in vitro*. Анализ с помощью масс-спектрометрии показал наличие продукта полного удлинения и некоторых промежуточных продуктов для обеих полимераз с включением остатка 2'-дезоксиаденозинмонофосфата напротив оксо-εА (Рисунок 2.4.8Б).



**Рисунок 2.4.8.** Анализ удлинения праймера (А) и идентификация его продуктов с помощью масс-спектрометрии (Б). Анализ удлинения праймера проводили с использованием немодифицированной (нм, Т в 7-ом положении) или модифицированной (мм, оксо-εА в 7-ом положении) матрицы: после инкубации с фрагментом Кленова в течение 1 (А), 2 (Б), 3 (В) или 4 (Г) часов или с ДНК-полимеразой Т4 в течение 1 (Д), 2 (Е), 3 (Ж) или 4 (З) часов; дорожка 1 – мм + 1 мкл 0,5 М ЭДТА; дорожка 2 – мм + дНТФ, дорожка 3 – мм + дНТФ без дАТФ, дорожка 4 – нм + дНТФ, дорожка 5 – нм + дНТФ без дАТФ (нижняя панель, \* – праймер, \*\* – продукт удлинения праймера).

Последующие исследования с участием наших коллег из Массачусетского технологического института (Кэмбридж, США) показали, что оксо-εА вызывает исключительно трансверсивные мутации А→Т в *E. coli*, не является существенным ингибитором репликации ДНК в *E. coli* и не удаляется ни ферментами системы репарации ДНК, удаляющими из двойной спирали поврежденные азотистые основания (MutM и MutY), ни ферментом AlkB, который удаляет этено мостик из этеноА, что свидетельствует о ее идеальной мимикрии остатка тимина.

На следующем этапе мы, совместно с сотрудниками лаборатории Дженса Мюллера института неорганической и аналитической химии Вестфальского университета им. Вильгельма (Мюнстер, Германия), исследовали способность модификации оксо-εА



участвовать в опосредованном ионами серебра ( $\text{Ag}^+$ ) спаривании оснований. Для этого мы синтезировали модифицированные последовательности, образующие антипараллельные ДНК-дуплексы (Таблица 2.4.1).

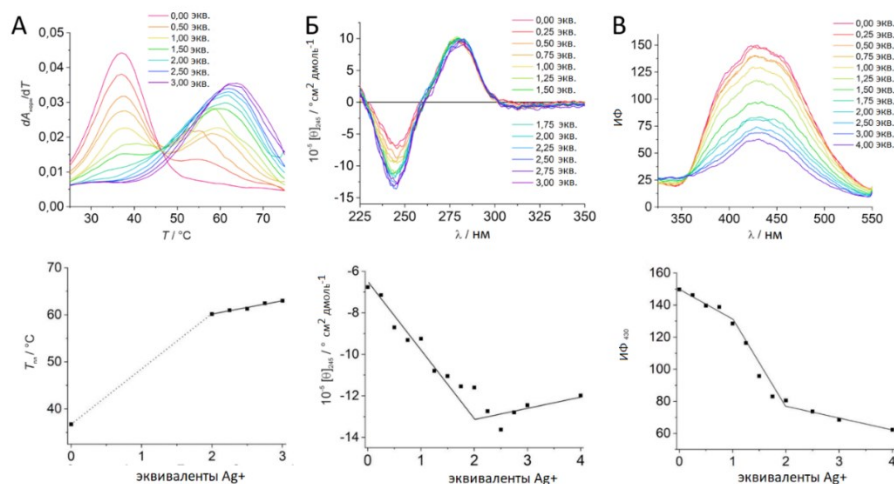
**Таблица 2.4.1.** Последовательности ДНК дуپлексов (X - оксо-εА-нуклеотид).

| Шифр        | Последовательность                                 |
|-------------|--|
| дуплекс I   | 5'-d(CTT TCT XTC CCT C)<br>d(GAA AGA XAG GGA G)-5' |
| дуплекс II  | 5'-d(CTT TCT XTC CCT C)<br>d(GAA AGA CAG GGA G)-5' |
| дуплекс III | 5'-d(CTT TCT GTC CCT C)<br>d(GAA AGA CAG GGA G)-5' |

Для исследования  $\text{Ag}^+$ -опосредованного образования гомопары оснований оксо-εА (X), дуплекс I титровали возрастающими количествами  $\text{Ag}^+$ . При этом, во время титрования регистрировали спектральные свойства дуплекса (зависимое от температуры поглощение УФ-излучения при 260 нм, КД и флуоресценцию) для определения стехиометрии полученной опосредованной металлом пары оснований.

Результаты титрования дуплекса I  $\text{Ag}^+$  показаны на **Рисунке 2.4.9**. Дуплекс I плавился при 36,8 °С в отсутствие  $\text{Ag}^+$  (**Рисунок 2.4.9А**). Последовательное увеличение концентрации  $\text{Ag}^+$  приводило к появлению двухфазных кривых плавления, что указывает на присутствие в растворе двух различных форм. Двухфазное плавление можно наблюдать до тех пор, пока в дуплексе не будет присутствовать два эквивалента  $\text{Ag}^+$  (**Рисунок 2.4.9А**). В присутствии двух (или более) эквивалентов  $\text{Ag}^+$  на дуплекс кривые плавления были монофазными. Меньшая температура плавления  $T_{\text{пл}}$ , полученная из двухфазных кривых плавления, по существу идентична температуре плавления дуплекса без  $\text{Ag}^+$ . Напротив, более высокая температура плавления, по-видимому, растет с увеличением количества  $\text{Ag}^+$ , пока не достигнет значения 60 °С в присутствии двух эквивалентов  $\text{Ag}^+$  на дуплекс. Избыток  $\text{Ag}^+$  приводит к незначительной дополнительной стабилизации дуплекса. Это дополнительное увеличение можно отнести к неспецифическому связыванию  $\text{Ag}^+$  с каноническими нуклеиновыми основаниями. Суммируя, данные предполагают, что с гомопарой X:X связываются два  $\text{Ag}^+$  [589].





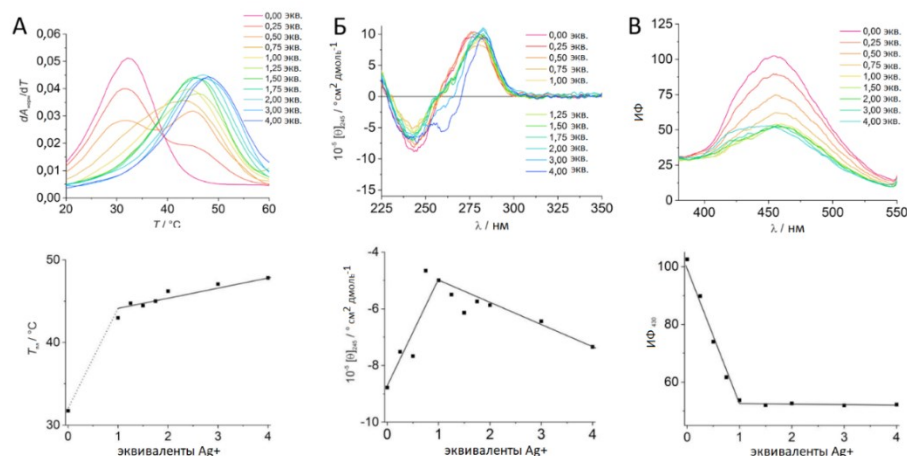
**Рисунок 2.4.9.** Графики первых производных кривых плавления (А, верхняя панель) и график зависимости температуры плавления  $T_{пл}$  дуплекса I от количества эквивалентов  $Ag^+$  (А, нижняя панель). КД-спектры (Б, верхняя панель) и график зависимости молярной эллиптичности при 245 нм дуплекса I в зависимости от количества эквивалентов  $Ag^+$  (Б, нижняя панель). Спектры флуоресценции (В, верхняя панель) и график зависимости ИФ при 430 нм ( $\lambda_{возб} = 280$  нм) дуплекса I в зависимости от количества эквивалентов  $Ag^+$  (В, нижняя панель). Условия: 3 мкМ дуплекс, 150 мМ  $NaClO_4$ , 5 мМ MOPS (pH 6,8).

Двухфазное плавление можно объяснить двумя способами: 1) два  $Ag^+$  включаются кооперативно [590]. В этом сценарии связывание первого  $Ag^+$  запускает немедленное связывание второго  $Ag^+$ . В результате в растворе присутствуют два вида дуплексов до тех пор, пока пара X:X не будет полностью насыщена, а именно полностью свободный от  $Ag^+$  дуплекс и дуплекс, содержащий пару оснований с 2  $Ag^+$  -  $X-Ag^+_2-X$ . 2) Два  $Ag^+$  связываются не кооперативно, а последовательно [591]. В этих условиях присутствие субстехиометрических количеств  $Ag^+$  приводит к трем типам дуплексов, а именно свободному от  $Ag^+$  и комплексам с одним и двумя  $Ag^+$ . Непрерывное повышение температуры сначала приводит к диссоциации дуплекса, свободного от  $Ag^+$ , что приводит к наблюдению первой (более низкой) температуры плавления. Затем начинает плавиться дуплекс с одним  $Ag^+$ . Высвободившиеся  $Ag^+$  становятся доступными для связывания с все еще присутствующим дуплексом с одним  $Ag^+$ , что приводит к образованию пар оснований  $X-Ag^+_2-X$  и, следовательно, повышению  $T_{пл}$ . Это приводит к противоположным изменениям в поглощении, так что по существу нет чистого изменения  $A_{норм}$ , и плавление дуплекса с одним  $Ag^+$  не наблюдается. Как результат, наблюдаются только температуры плавления дуплекса, свободного от металла, и дуплекса с двумя  $Ag^+$ . Независимо от способа образования пар оснований, опосредованных  $Ag^+$ , оба сценария согласуются с образованием пары оснований  $X-Ag^+_2-X$ .

Согласно КД-спектрам дуплекса I (**Рисунок 2.4.9Б**) с отрицательной полосой при 245 нм и положительной при 280 нм, дуплекс принимает обычную топологию В-ДНК [592]. Интересно, что отрицательная полоса становится более интенсивной при добавлении до двух эквивалентов  $\text{Ag}^+$ , затем изменение прекращается. Из-за наличия в КД-спектрах относительно высокого уровня шумов этот эффект выравнивания не так очевиден, как в случае температур плавления (**Рисунок 2.4.9А**). Тем не менее, КД-спектры также подтверждают предполагаемое образование опосредованной ионами металла пары оснований  $\text{X-Ag}^+_2\text{-X}$ .

Модификация является флуоресцентным производным аденина и, как результат, ОДН, содержащие оксо- $\epsilon\text{A}$ , также являются флуоресцентными (**Рисунок 2.4.9В**). Следовательно, образование пары оснований, опосредованной металлом, также можно исследовать с помощью флуоресцентной спектроскопии. Изменение ИФ при 430 нм ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм) дуплекса I при добавлении  $\text{Ag}^+$  показано на **Рисунке 2.4.9В**. ИФ уменьшается в присутствии  $\text{Ag}^+$ , причем устойчивое уменьшение наблюдается между 0 и 1 эквивалентами  $\text{Ag}^+$ , за которым следует более крутое уменьшение интенсивности от 1 до 2 эквивалентов  $\text{Ag}^+$ . Избыток  $\text{Ag}^+$  затем приводит к дальнейшему плавному снижению ИФ. Данные хорошо согласуются с образованием пары оснований  $\text{X-Ag}^+_2\text{-X}$  и подтверждают гипотезу о том, что два иона  $\text{Ag}^+$  включаются последовательно.

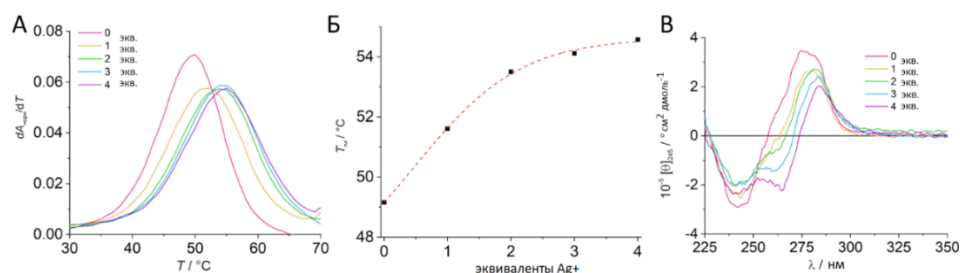
Предыдущие исследования показали, что  $\epsilon\text{A}$ , неокисленный предшественник оксо- $\epsilon\text{A}$ , образует пару оснований с каноническим цитозином с одним  $\text{Ag}^+$ , и эта пара содержит синергетическую водородную связь [593]. Нам было интересно оценить возможное образование гетеропары оксо- $\epsilon\text{A}$  с цитозином. С этой целью дуплекс II, содержащий одну центральную пару  $\text{X:C}$ , титровали увеличивающимися количествами  $\text{Ag}^+$ , как описано выше для исследования гомопары оснований. Как видно из **Рисунка 2.4.10А**, температура плавления  $T_{\text{пл}}$  дуплекса II увеличивается при добавлении  $\text{Ag}^+$  с 32°C в отсутствие  $\text{Ag}^+$  до 43°C в присутствии 1 эквивалента  $\text{Ag}^+$ . Между 0 и 1 эквивалентами  $\text{Ag}^+$  наблюдается двухфазное плавления. Избыток  $\text{Ag}^+$  приводит к дополнительному незначительному увеличению термической стабильности. Взяты вместе, эти данные предполагают сайт-специфическое включение одного  $\text{Ag}^+$  в ДНК-дуплекс. Это согласуется с образованием пары оснований  $\text{X-Ag}^+-\text{C}$ , аналогичной описанной ранее паре оснований  $\epsilon\text{A-Ag}^+-\text{C}$  [593]. Более того, стехиометрия подтверждается зависящим от  $\text{Ag}^+$  изменением интенсивности полосы при 245 нм в КД-спектрах (**Рисунок 2.4.10Б**) и, в частности, изменением ИФ при 430 нм (**Рисунок 2.4.10В**).



**Рисунок 2.4.10.** Графики первых производных кривых плавления (А, верхняя панель) и график зависимости температуры плавления  $T_{\text{пл}}$  дуплекса II от количества эквивалентов  $\text{Ag}^+$  (А, нижняя панель). КД-спектры (Б, верхняя панель) и график зависимости молярной эллиптичности при 245 нм дуплекса II в зависимости от количества эквивалентов  $\text{Ag}^+$  (Б, нижняя панель). Спектры флуоресценции (В, верхняя панель) и график зависимости ИФ при 430 нм ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм) дуплекса II в зависимости от количества эквивалентов  $\text{Ag}^+$  (В, нижняя панель). Условия: 3 мкМ дуплекс, 150 мМ  $\text{NaClO}_4$ , 5 мМ MOPS (pH 6,8).

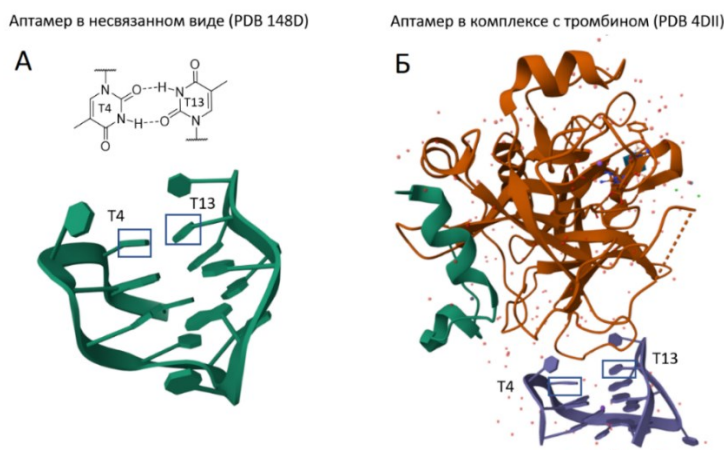
Наконец, мы оценили способность контрольного дуплекса III, содержащего центральную каноническую пару G:C, связывать  $\text{Ag}^+$ . Полученные результаты явно отличаются от полученных выше результатов для дуплексов I и II.

Как видно из графиков производных кривых плавления на протяжении всего титрования  $\text{Ag}^+$  наблюдается монофазное плавление (**Рисунок 2.4.11А**). С увеличением количества  $\text{Ag}^+$  температура плавления дуплекса увеличивается на 5 °С, пока асимптотически не достигнет значения приблизительно 54 °С (**Рисунок 2.4.11Б**). Следовательно,  $\Delta T_{\text{пл}}$  значительно меньше, чем для дуплексов I и II, что предполагает неспецифическое связывание  $\text{Ag}^+$ . Это хорошо согласуется с непрерывным изменением, обнаруженным в КД-спектрах дуплекса III при добавлении  $\text{Ag}^+$ . В предыдущих публикациях было зафиксировано смещение уменьшающегося положительной полосы при приблизительно 280 нм в красную область в сочетании с вновь появляющейся отрицательной полосой при приблизительно 270 нм, когда присутствовал избыток  $\text{Ag}^+$ , что указывает на неспецифическое связывание с ДНК-дуплексами [594,595]. Подводя итог, спектроскопические данные, полученные для дуплекса III, предполагают неспецифическое связывание  $\text{Ag}^+$  и косвенно подтверждают специфическое связывание  $\text{Ag}^+$  с модифицированными дуплексами.



**Рисунок 2.4.11.** Графики первых производных кривых плавления (А). Температуры плавления  $T_{пл}$  дуплекса III в присутствии возрастающих количеств  $Ag^+$  (Б). КД-спектры дуплекса III в присутствии возрастающих количеств  $Ag^+$  (В). Условия: 3 мкМ дуплекс, 150 мМ  $NaClO_4$ , 5 мМ MOPS (pH 6,8).

Учитывая тимин-имитирующие свойства и способность образовывать гомо- и гетеропары с  $Ag^+$  в составе двухцепочечных фрагментов ДНК, мы решили оценить влияние оксо-εА на термическую стабильность и сродство содержащего ее аптамера в присутствии и в отсутствие  $Ag^+$ . В качестве модели мы выбрали хорошо изученный тромбин-связывающий аптамер ТВА15, содержащий в петлях остатки тимина [596]. Среди них, остатки тимина Т3, Т4, Т12 и Т13 участвуют в связывании аптамера с тромбином. Остатки Т4 и Т13 в петлях свободного ТВА15 образуют неканоническую пару, как было установлено с помощью ЯМР-спектроскопии [597] (**Рисунок 2.4.12А**), и связывание с тромбином приводит к разрушению данной пары, как было показано рентгеноструктурным анализом [598] (**Рисунок 2.4.12Б**). Таким образом, данные остатки выглядят перспективными для модификации с целью регуляции свойств аптамера.



**Рисунок 2.4.12.** Вторичная структура свободного аптамера ТВА15, содержащего неканоническую пару оснований Т4:Т13, полученная с помощью ЯМР (PDB: 148D) (А), и рентгеновская структура комплекса человеческого альфа-тромбина и ТВА15 в присутствии ионов калия (PDB: 4DII) (Б).

Мы провели дизайн с двойной заменой остатков Т4 и Т13 в ТВА15 и синтезировали соответствующую последовательность Т4,Т13-ТВА15 (GGTXGGTGTGGTXGG, X = оксо-εА), а наши коллеги с кафедры химии природных соединений (Алиева Р.Ш., Соколова С.В., Завьялова Е.Г., химический факультет МГУ) изучили влияние модификации на его свойства при добавлении или без добавления  $\text{Ag}^+$  с использованием БСИ и УФ-, КД- и флуоресцентной спектроскопии.

Коллективом из МГУ под руководством Е.Г. Завьяловой было установлено, что аптамер Т4,Т13-ТВА15 сохранял структуру антипараллельного G4 и обладал повышенной термической стабильностью по сравнению с ТВА15 (согласно данным КД-спектроскопии). Согласно БСИ-экспериментам, введение оксо-εА приводило к значительному снижению сродства, что можно объяснить образованием пары оксо-εА:оксо-εА, ответственной за потерю способности распознавать мишень из-за сверхстабилизации структуры. Добавление  $\text{Ag}^+$  приводило к частичному разворачиванию/искажению структуры G4 и снижению молярной эллиптичности характеристичных пиков на КД-спектрах, вероятно, за счет образования неблагоприятного для G4 комплекса пары оксо-εА:оксо-εА с  $\text{Ag}^+$ . Тем не менее, модифицированный аптамер сохранял спектр G4 даже при 3-кратном избытке  $\text{Ag}^+$ . Термическая стабильность комплекса Т4,Т13-ТВА15 с двумя  $\text{Ag}^+$  была сравнима с ТВА15. Неожиданно, добавление  $\text{Ag}^+$  к Т4,Т13-ТВА15, не обладающему заметным сродством к тромбину в отсутствие  $\text{Ag}^+$ , приводило к возникновению сродства с константой диссоциации, сравнимой с таковой для ТВА15, как было установлено с помощью БСИ-экспериментов.

Таким образом, предложенное нами молекулярное зондирование с использованием  $\text{tC}^{\text{O}}$  способствовало подтверждению предполагаемой структуры иМ-содержащего аптамера и выявлению сайта узнавания гемагглютиниона вблизи второй петли для дальнейшего дизайна конформационно однородного аптамера, сохраняющего сродство к гемагглютиниону. Замена псевдопары Т-Т в аптамере к тромбину на чувствительную к  $\text{Ag}^+$  пару оксо-εА обеспечила  $\text{Ag}^+$ -зависимое связывание с мишенью, что иллюстрирует применимость модификации для создания программируемых распознающих элементов.

В результате приведенных в разделе исследований:

- впервые продемонстрирована применимость нуклеотидной модификации  $\text{tC}^{\text{O}}$  в установлении сайта связывания аптамера, содержащего иМ-модуль, к гемагглютиниону вируса гриппа А;
- разработана нуклеотидная модификация, флуоресцентный миметик тимидина, для регуляции сродства аптамера к тромбину *in vitro*.

### Глава 3. Экспериментальная часть

#### 3.1 Химический синтез

##### *Материалы и оборудование*

ЯМР-спектры на ядрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{31}\text{P}$  регистрировали на приборе Bruker Avance III 600 МГц (Германия) при 600, 151 и 243 МГц, соответственно; ЯМР-спектры на ядрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{19}\text{F}$  регистрировали на приборе Varian INOVA 400 МГц при 400, 100 МГц и 376 МГц соответственно. Химические сдвиги определены по отношению к остаточным сигналам используемых растворителей:  $\text{CDCl}_3$  (7,27 м.д. в  $^1\text{H}$  и 77,0 м.д. в  $^{13}\text{C}$  спектрах),  $\text{DMSO-d}_6$  (2,50 м.д. в  $^1\text{H}$  и 39,5 м.д. в  $^{13}\text{C}$  спектрах) или иных. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе LTQ FT Ultra (Thermo Electron Corp., Бремен, Германия) с ионизацией методом электрораспыления (ESI) и обнаружением ионов в положительном или отрицательном режиме. Аналитическую тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Merck (Германия) с флуоресцентным индикатором UV-254 с визуализацией пятен облучением при 254 и 365 нм. Для колоночной хроматографии использовали силикагель фирмы Merck (Kieselgel 60, 70-230 мэш). Реактивы SigmaAldrich (США), FluoroChem (Великобритания), Acros Organics (США), ABCR (Германия) и других коммерческих поставщиков применяли без дополнительной очистки. Для проведения реакций использовали растворители фирмы Химмед (Россия), перегнанные при необходимости. Йодид 1-метил-4-метилпиридиния, йодид 1-метил-2-метилпиридиния, йодид 1-метил-2,6-диметилпиридиния, йодид 1-метил-2,4-диметилпиридиния и йодид 1-метил-2,4,6-триметилпиридиния, используемые для получения соединений **1.1.3-1.1.7**, синтезировали по методике, описанной ранее [599–602]. Бромид 2-метил-3-(проп-2-ин-1-ил)бензо[d]тиазол-3-ия **1.1.22** и 2'-дезоксид-7,8-дигидро-8-оксоаденозин получали, следуя по описанным ранее методикам [590,607].

##### *Синтез низкомолекулярных соединений*

##### **Общая методика синтеза монозамещенных пиридиниевых производных 1.1.3 и 1.1.4**

К перемешиваемому раствору соответствующей соли пиколияния **1.1.1** (130 мг, 0,55 ммоль) в сухом ДМФА (5 мл) при 70°C добавляли ДБУ (165 мкл, 1,10 ммоль) с последующим добавлением йодида 3-метил-2-метилтиобензотиазолия **1.1.2** (355 мг, 1,10 ммоль). Смесь перемешивали при 70°C в течение 30 мин, охлаждали до комнатной температуры и разбавляли этилацетатом (15 мл). Образовавшийся осадок фильтровали и промывали этилацетатом (2 x 5 мл). Неочищенный продукт перекристаллизовывали из  $\text{CH}_3\text{OH}$  (25 мл) и сушили в вакууме, получая требуемый продукт:

##### ***Йодид 1-метил-4-[(3-метил-2(3H)-бензотиазолиден)метил]пиридиния 1.1.3***

Выход (162 мг, 0,42 ммоль, 77%):  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,27 (д,  $J=7,0$  Гц, 1H), 7,88 (д,  $J=7,9$  Гц, 1H), 7,56 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 7,50 (т,  $J=7,6$  Гц, 1H), 7,37 (д,  $J=7,0$  Гц, 2H), 7,28 (т,  $J=7,6$  Гц, 1H), 6,22 (с, 1H), 3,98 (с, 3H), 3,70 (с, 3H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 156,6, 149,9, 141,9 (2C), 140,3, 127,5, 123,2, 123,1, 122,3, 118,1 (2C), 111,7, 89,3, 44,7, 32,7. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{S}^+ [\text{M}-\text{I}]^+$ : 255,0950; найдено 255,0945.

**Йодид 1-метил-2-[(3-метил-2(3H)-бензотиазолилиден)метил]пиридиния 1.1.4**

Выход (156 мг, 0,41 ммоль, 74%):  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,52 (д,  $J=6,5$  Гц, 1H), 8,16 (т,  $J=8,0$  Гц, 1H), 7,89 (д,  $J=8,0$  Гц, 2H), 7,61 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 7,52 (т,  $J=7,9$  Гц, 1H), 7,31 (т,  $J=7,6$  Гц, 1H), 7,24 (т,  $J=6,8$  Гц, 1H), 5,82 (с, 1H), 4,07 (с, 3H), 3,78 (с, 3H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 157,4, 151,4, 144,5, 141,6, 140,6, 127,6, 123,5, 122,4, 122,3, 120,2, 116,6, 111,7, 82,0, 44,6, 32,9. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{S}^+ [\text{M}-\text{I}]^+$ : 255,0950; найдено 255,0950.

**Общая методика синтеза дизамещенных пиридиниевых производных 1.1.5 и 1.1.6**

К перемешиваемому раствору соответствующей соли лутидиния **1.1.1** (150 мг, 0,60 ммоль) в сухом ДМФА (5 мл) при  $70^\circ\text{C}$  добавляли ДБУ (180 мкл, 1,20 ммоль) с последующим добавлением йодида 3-метил-2-метилтиобензотиазолия **1.1.2** (390 мг, 1,21 ммоль). Смесь перемешивали при  $70^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, и затем добавляли дополнительно ДБУ (180 мкл, 1,20 ммоль) и йодид 3-метил-2-метилтиобензотиазолия **1.1.2** (390 мг, 1,21 ммоль). После перемешивания при  $70^\circ\text{C}$  в течение 30 мин смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли этилацетатом (15 мл). Образовавшийся осадок фильтровали и промывали этилацетатом (2 x 5 мл). Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-4%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) получая требуемый продукт:

**Йодид 1-метил-2,6-бис[(3-метил-2(3H)-бензотиазолилиден)метил]пиридиния 1.1.5**

Выход (280 мг, 0,52 ммоль, 87 %):  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 7,97 (т,  $J=8,1$  Гц, 1H), 7,76 (дд,  $J=7,9$  Гц,  $J=0,7$  Гц, 2H), 7,49 (д,  $J=8,1$  Гц, 2H), 7,47-7,41 (м, 4H), 7,20 (дд,  $J=7,4$  Гц,  $J=6,9$  Гц,  $J=1,5$  Гц, 2H), 5,81 (с, 2H), 3,95 (с, 3H), 3,69 (с, 6H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 155,1 (2C), 152,4 (2C), 141,1 (2C), 139,6, 127,2 (2C), 122,7 (2C), 122,1 (2C), 122,0 (2C), 114,0 (2C), 110,7 (2C), 84,0 (2C), 39,2 (2C), 32,5. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{S}_2^+ [\text{M}-\text{I}]^+$ : 416,1250; найдено 416,1249.

**Йодид 1-метил-2,4-бис[(3-метил-2(3H)-бензотиазолилиден)метил]пиридиния 1.1.6**

Выход (288 мг, 0,53 ммоль, 88 %):  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,01 (д,  $J=6,0$  Гц, 1H), 7,88 (дд,  $J=7,6$  Гц,  $J=2,0$  Гц, 2H), 7,46-7,40 (м, 4H), 7,23-7,17 (м, 2H), 7,13-7,07 (м, 1H), 6,89-6,84 (м, 1H), 6,01 (с, 1H), 5,62 (с, 1H), 3,83 (с, 3H), 3,65 (с, 3H), 3,62 (с, 3H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 154,1, 153,7, 149,2, 148,7, 141,9, 140,8, 140,5, 127,3, 127,3,

123,0, 122,5 (3C), 122,4, 122,3, 114,0, 111,0, 110,8, 110,0, 89,0, 81,9, 42,8, 32,4, 32,3. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{24}H_{22}N_3S_2^+$   $[M-I]^+$ : 416,1250; найдено 416,1250.

**Йодид 1-метил-2,4,6-трис[(3-метил-2(3H)-бензотиазолилиден)метил]пиридиния 1.1.7**

К перемешиваемому раствору соли коллидиния **1.1.1** (110 мг, 0,42 ммоль) в сухом ДМФА (5 мл) при 70°C добавляли ДБУ (190 мкл, 1,27 ммоль) с последующим добавлением йодида 3-метил-2-метилтиобензотиазолия **1.1.2** (410 мг, 1,27 ммоль). Смесь перемешивали при 70°C в течение 30 мин, и затем добавляли дополнительно ДБУ (190 мкл, 1,27 ммоль) и йодид 3-метил-2-метилтиобензотиазолия **1.1.2** (410 мг, 1,27 ммоль). После перемешивания при 70°C в течение 30 мин смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли этилацетатом (15 мл). Образовавшийся осадок фильтровали и промывали этилацетатом (2 x 5 мл). Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-4%  $CH_3OH$  в  $CH_2Cl_2$ ), получая требуемый продукт **1.1.7** (235 мг, 0,33 ммоль, 79%).  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 7,81 (д,  $J=7,8$  Гц, 1H), 7,71 (д,  $J=7,8$  Гц, 2H), 7,39-7,29 (м, 4H), 7,27 (д,  $J=8,2$  Гц, 2H), 7,14-7,07 (м, 3H), 6,97-6,92 (м, 2H), 5,89 (с, 1H), 5,53 (с, 2H), 3,70 (с, 3H), 3,55 (с, 3H), 3,53 (с, 6H).  $^{13}C$  ЯМР (101 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 152,5 (2C), 152,3, 149,8 (2C), 147,4, 141,2 (2C), 140,6, 127,0, 126,8 (2C), 123,0, 122,3 (2C), 122,1 (2C), 122,0 (2C), 121,9 (2C), 110,4, 109,9 (2C), 108,9 (2C), 89,1, 83,8 (2C), 38,5, 32,1 (2C), 32,0. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{33}H_{29}N_4S_3^+$   $[M-I]^+$ : 577,1549; найдено 577,1560.

**Бромид (E)-2-((1-метилхинолин-4(1H)-илиден)метил)-3-(проп-2-ин-1-ил)бензо[d]тиазол-3-ия 1.1.23**

К суспензии бромида 2-метил-3-(проп-2-ин-1-ил)бензо[d]тиазол-3-ия **1.1.22** (270 мг, 1 ммоль) в  $CH_2Cl_2$  (20 мл) добавляли бромид 1-метилхинолиния (270 мг, 1,2 ммоль) и ТЭА (0,7 мл, 5 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 часов. Смесь концентрировали в вакууме. Полученный твердый остаток растирали с  $Et_2O$  (3 x 15 мл) и затем очищали колоночной хроматографией на силикагеле (1→10%  $CH_3OH$  в  $CH_2Cl_2$ ), получая **1.1.23** (176 мг, 0,43 ммоль, 43 %) в виде красного твердого остатка.  $^1H$  ЯМР (600 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,81 (д,  $J=8,5$  Гц, 1H), 8,78 (д,  $J=7,1$  Гц, 1H), 8,13 (д,  $J=8,7$  Гц, 1H), 8,06 (д,  $J=7,1$  Гц, 1H), 8,04 (д,  $J=8,2$  Гц, 1H), 7,85 (т,  $J=7,7$  Гц, 1H), 7,79 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 7,61 (т,  $J=7,8$  Гц, 1H), 7,46 (д,  $J=7,1$  Гц, 1H), 7,41 (т,  $J=7,6$  Гц, 1H), 7,05 (с, 1H), 5,59 (д,  $J=1,9$  Гц, 2H), 4,24 (с, 3H), 3,53 (т,  $J=1,9$  Гц, 1H).  $^{13}C$  ЯМР (150 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 158,18, 149,00, 145,54, 139,12, 137,96, 133,32, 128,08, 127,18, 125,29, 124,44, 124,19, 123,36, 122,93, 118,40, 112,44, 108,65, 88,02, 76,82, 76,31, 42,55, 35,32. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{21}H_{17}N_2S^+$   $[M-Br]^+$ : 329,1107; найдено 329,1118;  $t_R=4,01$  мин.

**Бромид (E)-2-(2-(4-(диметиламино)фенил)этинил)-3-(2-пропинил)бензо[d]тиазолия 1.1.24**



Данное производное получали с выходом 79% по литературной методике [347].  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,32 (д,  $J=8,0$  Гц, 1H), 8,14 (д,  $J=15,0$  Гц, 1H), 8,13 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 7,95 (д,  $J=8,7$  Гц, 2H), 7,80 (т,  $J=7,7$  Гц, 1H), 7,74 (д,  $J=15,0$  Гц, 1H), 7,68 (т,  $J=7,6$  Гц, 1H), 6,86 (д,  $J=8,7$  Гц, 2H), 5,82 (с, 2H), 3,72 (т,  $J=2,0$  Гц, 1H), 3,13 (с, 6H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 171,34, 153,83, 151,56, 140,31, 133,30 (2C), 128,92, 127,40, 126,57, 123,99, 121,43, 115,50, 112,01, 105,18, 78,01, 75,96, 37,48. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{S}^+ [\text{M}-\text{Br}]^+$ : 319,1263; найдено 319,1255;  $t_R=4,11$  мин.

**Бромид (E)-3-(проп-2-ин-1-ил)-2-(2-(1,2,2,4-тетраметил-1,2-дигидрохинолин-6-ил)винил)бензо[d]тиазол-3-ия 1.1.25**

Смесь бромида 2-метил-3-(проп-2-ин-1-ил)бензо[d]тиазол-3-ия **1.1.22** (270 мг, 1 ммоль) и 1,2,2,4-тетраметил-1,2-дигидрохинолин-6-карбальдегида (430 мг, 2 ммоль) в уксусном ангидриде (3 мл) перемешивали при 90°C в течение 8 часов. Затем, к смеси добавляли воду (0,5 мл), и перемешивание продолжали в течение 30 мин с последующим концентрированием в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (1 $\rightarrow$ 10%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), получая **1.1.25** (330 мг, 0,71 ммоль, 71 %) в виде фиолетового твердого остатка.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,30 (д,  $J=8,0$  Гц, 1H), 8,13 (д,  $J=15,0$  Гц, 1H), 8,11 (д,  $J=8,7$  Гц, 1H), 7,86 (д,  $J=8,9$  Гц, 1H), 7,80 (т,  $J=7,9$  Гц, 1H), 7,68 (т,  $J=7,7$  Гц, 1H), 7,64 (д,  $J=15,0$  Гц, 1H), 7,61 (д,  $J=1,6$  Гц, 1H), 6,72 (д,  $J=8,9$  Гц, 1H), 5,79 (д,  $J=2,2$  Гц, 2H), 5,53 (с, 1H), 3,71 (т,  $J=2,2$  Гц, 1H), 2,99 (с, 3H), 2,04 (с, 3H), 1,40 (с, 6H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 170,98, 151,54, 149,82, 140,34, 134,34, 130,15, 128,89, 127,32, 126,45, 125,72 (2C), 123,92, 121,51, 121,49, 115,41, 110,74, 104,62, 78,03, 75,99, 58,14, 37,40, 31,48, 28,55, 18,19. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{S}^+ [\text{M}-\text{Br}]^+$ : 385,1733; найдено 385,1746;  $t_R=5,08$  мин.

**Бромид (E)-3-(проп-2-ин-1-ил)-2-(2-(2,3,6,7-тетрагидро-1H,5H-пиридо[3,2,1-ij]хинолин-9-ил)винил)бензо[d]тиазол-3-ия 1.1.26**

Данное производное получали с выходом 74% по литературной методике [347].  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,22 (д,  $J=8,0$  Гц, 1H), 8,02 (д,  $J=8,5$  Гц, 1H), 7,93 (д,  $J=14,8$  Гц, 1H), 7,75 (т,  $J=7,7$  Гц, 1H), 7,63 (т,  $J=7,8$  Гц, 1H), 7,52 (с, 2H), 7,48 (д,  $J=7,8$  Гц, 1H), 5,66 (д,  $J=2,2$  Гц, 2H), 3,59 (т,  $J=2,2$  Гц, 1H), 3,44-3,39 (м, 4H), 2,78-2,74 (м, 4H), 1,96-1,90 (м, 4H). HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{S}^+ [\text{M}-\text{Br}]^+$ : 371,1576; найдено 371,1593;  $t_R=4,81$  мин.

**N-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил)-5-(2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]имидазол-4-ил)пентанамид 1.1.27**

Данное производное получали с выходом 83%, исходя из 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этан-1-амина по литературной методике [349].  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 7,80 (т,  $J=5,5$  Гц, 1H), 6,39 (с, 1H), 6,34 (с, 1H), 4,33-4,29 (м, 1H),

4,15-4,11 (м, 1H), 3,62-3,59 (м, 2H), 3,58-3,49 (м, 8H), 3,42-3,38 (м, 4H), 3,21-3,17 (м, 2H), 3,12-3,08 (м, 1H), 2,83 (дд, J=12,4 Гц, J=5,1 Гц, 1H), 2,59 (д, J=12,4 Гц, 1H), 2,07 (т, J=7,4 Гц, 2H), 1,65-1,58 (м, 1H), 1,55-1,44 (м, 3H), 1,36-1,24 (м, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 172,1, 162,6, 69,7, 69,7, 69,6, 69,4, 69,1, 69,0, 61,0, 59,1, 55,3, 49,9, 39,7 (перекрывается с сигналом ДМСО), 38,4, 35,0, 28,1, 27,9, 25,1.

**ТО1-биотин** получали с выходом 6,8% по литературной методике [254]. HRMS (ESI) m/z: рассчитано  $\text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_2^+ [\text{M}-\text{CF}_3\text{COO}^-]^+$ : 749,3150; найдено 749,3143;  $t_{\text{R}}$ =7,42 мин.

**Общая методика азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого ионами меди (I)**

Раствор соответствующего алкинсодержащего производного **1.1.23-1.1.26** (0,06 ммоль) и азидсодержащего биотинилированного производного **1.1.27** (40 мг, 0,09 ммоль, 1,5 экв.) в смеси  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1, об/об, 5 мл) дегазировали и затем последовательно добавляли йодид меди (I) (1,1 мг, 0,006 ммоль, 0,1 экв.), ТВТА (1,6 мг, 0,003 ммоль, 0,05 экв.) и ДИПЭА (55 мкл, 0,3 ммоль, 5,0 экв.) в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и концентрировали в вакууме. Остаток распределяли между смесью *n*-бутанол/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:10, об/об, 10 мл) и 0,1 М ЭДТА раствором (10 мл), и водную фазу дополнительно экстрагировали смесью *n*-бутанол/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:10, об/об, 10 мл). Объединенные органические слои концентрировали в вакууме, и полученный остаток очищали препаративной ВЭЖХ.

**2,2,2-трифторацетат 2-((-1-метилхинолин-4(1H)-илиден)метил)-3-((1-(13-оксо-17-((3aR,4R,6aS)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]имидазол-4-ил)-3,6,9-триокса-12-азагептадецил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)бензо[d]тиазол-3-ия 1.1.28**

(Выход 58,1 %).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,78 (д, J=8,6 Гц, 1H), 8,67 (д, J=7,3 Гц, 1H), 8,31 (с, 1H), 8,13–8,10 (м, 1H), 8,07–8,03 (м, 2H), 7,96 (д, J=8,3 Гц, 1H), 7,86–7,82 (м, 1H), 7,80–7,75 (м, 1H), 7,65–7,61 (м, 1H), 7,45–7,40 (м, 2H), 7,35 (с, 1H), 6,38 (с, 1H), 6,34 (с, 1H), 5,93 (с, 2H), 4,51 (т, J=5,1 Гц, 2H), 4,32–4,27 (м, 1H), 4,22 (с, 3H), 4,13–4,09 (м, 1H), 3,77 (т, J=5,1 Гц, 2H), 3,45–3,37 (м, 10H), 3,19–3,13 (м, 2H), 3,10–3,05 (м, 1H), 2,81 (дд, J=12,4, 5,1 Гц, 1H), 2,57 (д, J=12,4 Гц, 1H), 2,05 (т, J=7,5 Гц, 2H), 1,54–1,39 (м, 6H). HRMS (ESI) m/z: рассчитано  $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_8\text{O}_5\text{S}_2^+ [\text{M}-\text{CF}_3\text{COO}^-]^+$ : 773,3262; найдено 773,3260;  $t_{\text{R}}$ =7,91 мин.

**2,2,2-трифторацетат 2-(4-(диметиламино)стирил)-3-((1-(13-оксо-17-((3aR,4R,6aS)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]имидазол-4-ил)-3,6,9-триокса-12-азагептадецил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)бензо[d]тиазол-3-ия 1.1.29**

(Выход 37,4 %).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,34 (с, 1H), 8,29 (д, J=8,0 Гц, 1H), 8,24 (д, J=8,9 Гц, 1H), 8,16 (д, J=14,6 Гц, 1H), 7,93 (д, J=9,0 Гц, 2H), 7,89 (д, J=15,2 Гц,

1H), 7,80–7,75 (м, 2H), 7,69–7,65 (м, 1H), 6,89 (д, J=9,0 Гц, 2H), 6,38 (с, 1H), 6,34 (с, 1H), 6,17 (с, 2H), 4,52 (т, J=5,1 Гц, 2H), 4,32–4,28 (м, 1H), 4,14–4,10 (м, 1H), 3,77 (т, J=5,1 Гц, 2H), 3,42–3,37 (м, 10H), 3,19–3,15 (м, 2H), 3,14 (с, 6H), 3,10–3,06 (м, 1H), 2,81 (дд, J=12,4, 5,1 Гц, 1H), 2,59–2,56 (м, 1H), 2,05 (т, J=7,5 Гц, 2H), 1,64–1,40 (м, 6H). HRMS (ESI) m/z: рассчитано  $C_{38}H_{51}N_8O_5S_2^+$  [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup>: 763,3418; найдено 763,3403; t<sub>R</sub>=8,27 мин.

**2,2,2-трифторацетат 3-((1-(13-оксо-17-((3aR,4R,6aS)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]имидазол-4-ил)-3,6,9-триокса-12-азагептадецил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)-2-(2-(1,2,2,4-тетраметил-1,2-дигидрохинолин-6-ил)винил)бензо[d]тиазол-3-ия 1.1.30**

(Выход 41,9 %) <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ м.д. 8,32 (с, 1H), 8,28 (д, J=8,8 Гц, 1H), 8,21 (д, J=8,7 Гц, 1H), 8,11 (д, J=15,0 Гц, 1H), 7,86–7,74 (м, 4H), 7,68–7,64 (м, 1H), 7,61–7,60 (м, 2H), 6,71 (д, J=9,0 Гц, 1H), 6,38 (с, 1H), 6,35 (с, 1H), 6,17 (с, 2H), 4,52 (т, J=5,1 Гц, 2H), 4,32–4,28 (м, 1H), 4,13–4,09 (м, 1H), 3,77 (т, J=5,0 Гц, 2H), 3,46–3,35 (м, 10H), 3,19–3,15 (м, 2H), 3,12–3,06 (м, 1H), 2,98 (с, 3H), 2,81 (дд, J=12,4, 5,2 Гц, 1H), 2,57–2,54 (м, 1H), 2,08–2,04 (м, 2H) 2,03 (с, 3H), 1,51–1,41 (м, 6H), 1,40 (с, 6H). HRMS (ESI) m/z: рассчитано  $C_{43}H_{57}N_8O_5S_2^+$  [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup>: 829,3888; найдено 829,3924; t<sub>R</sub>=4,67 мин.

**2,2,2-трифторацетат 3-((1-(13-оксо-17-((3aR,4R,6aS)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]имидазол-4-ил)-3,6,9-триокса-12-азагептадецил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)-2-(2-(2,3,6,7-тетрагидро-1H,5H-пиридо[3,2,1-ij]хинолин-9-ил)винил)бензо[d]тиазол-3-ия 1.1.31**

(Выход 40,4 %) <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ м.д. 8,32 (с, 1H), 8,23 (д, J=8,0 Гц, 1H), 8,12 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,95 (д, J=14,8 Гц, 1H), 7,81–7,76 (м, 1H) 7,73–7,68 (м, 2H), 7,63–7,59 (м, 1H), 7,52 (с, 2H), 6,38 (с, 1H), 6,34 (с, 1H), 6,08 (с, 2H), 4,52 (т, J=5,1 Гц, 2H), 4,32–4,28 (м, 1H), 4,14–4,10 (м, 1H), 3,78 (т, J=5,1 Гц, 2H), 3,46–3,35 (м, 14H), 3,21–3,13 (м, 2H), 3,12–3,05 (м, 1H), 2,81 (дд, J=12,4, 5,1 Гц, 1H), 2,74 (т, J=6,3 Гц, 4H), 2,58 (д, J=12,4 Гц, 1H), 2,05 (т, J=7,4 Гц, 2H), 1,94–1,88 (м, 4H), 1,65–1,40 (м, 6H). HRMS (ESI) m/z: рассчитано  $C_{42}H_{55}N_8O_5S_2^+$  [M-CF<sub>3</sub>COO]<sup>+</sup>: 815,3731; найдено 815,3768; t<sub>R</sub>=4,46 мин.

**N,N-бис(2-азидоэтил)анилин** получали по литературной методике [383]. <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ м.д. 7,27 (т, J=8,0 Гц, 2H), 6,79 (т, J=7,4 Гц, 1H), 6,74 (д, J=8,0 Гц, 2H), 3,60 (т, J=6,0 Гц, 4H), 3,49 (т, J=6,0 Гц, 4H). <sup>13</sup>C ЯМР (151 Гц, CDCl<sub>3</sub>): δ м.д. 146,1, 129,6, 117,8, 112,7, 50,8, 48,7.

**ВНQ-2** получали по литературной методике [604]. <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ м.д. 8,43 (д, J=9,0 Гц, 2H), 8,05 (д, J=9,0 Гц, 2H), 7,79 (д, J=9,2 Гц, 2H), 7,44 (с, 1H), 7,37 (с, 1H), 6,89 (д, J=9,2 Гц, 2H), 4,85 (т, J=5,3 Гц, 2H), 4,00 (с, 3H), 3,95 (с, 3H), 3,63 (дт, J=5,8 Гц, J=5,3 Гц, 4H), 3,59 (т, J=5,8 Гц, 4H). <sup>13</sup>C ЯМР (151 Гц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ м.д. 155,6, 152,9, 151,6, 150,1, 147,9, 146,0, 143,2, 141,2, 125,6, 124,9, 123,3, 111,4, 100,5, 99,8, 58,0, 56,3, 56,2, 53,2.

### **Общая методика получения ди-азидосодержащих производных ВНQ**

К соответствующей диазониевой соли (1,2 ммоль, 1,2 экв.) добавляли смесь натрийацетатного буфера (0,1 М, pH 4,0) и CH<sub>3</sub>CN (1:1, об/об, 10 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, обрабатывали ультразвуком и затем фильтровали в раствор *N,N*-бис(2-азидоэтил)анилина (1,0 ммоль, 1,0 экв.) в CH<sub>3</sub>CN (2 мл) при 0°C. После перемешивания в течение 2 ч при комнатной температуре образовавшийся осадок отделяли фильтрованием и промывали дважды смесью воды и CH<sub>3</sub>CN (1:1, об/об). Полученный в результате остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (15→25% этилацетат в гексане).

#### **Краситель 1.1.32**

Соединение получали в виде аморфного темно-фиолетового твердого остатка с выходом 59%, исходя из двойной соли Fast Corinth V хлорида цинка (содержание красителя ~90%). <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ м.д. 7,94 (д, J=9,0 Гц, 2H), 7,71 (с, 1H), 7,66 (д, J=8,2 Гц, 1H), 7,57 (с, 1H), 7,47 (д, J=8,2 Гц, 1H), 7,40 (с, 1H), 6,80 (д, J=9,0 Гц, 2H), 4,02 (с, 3H), 3,70 (т, J=5,8 Гц, 4H), 3,57 (т, J=5,8 Гц, 4H), 2,71 (с, 3H), 2,51 (с, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (151 Гц, CDCl<sub>3</sub>): δ м.д. 154,9, 151,3, 149,0, 147,4, 145,4, 144,9, 143,4, 141,6, 133,4, 132,8, 125,8, 124,3, 119,0 (2C), 111,8, 99,4, 56,3, 50,8, 48,8, 21,2, 16,6. HRMS (ESI) m/z: рассчитано C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>12</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 543,2324; найдено 543,2331.

#### **Краситель 1.1.33**

Соединение получали в виде аморфного темно-фиолетового твердого остатка с выходом 61%, исходя из соли Fast Black K гемихлорида цинка (содержание красителя ~30%). <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C спектры соответствовали литературным данным [10.1016/j.tetlet.2014.10.054]. <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ м.д. 8,37 (д, J=8,9 Гц, 2H), 8,05 (д, J=8,9 Гц, 2H), 7,96 (д, J=9,1 Гц, 2H), 7,50 (с, 1H), 7,45 (с, 1H), 6,81 (д, J=9,1 Гц, 2H), 4,09 (с, 3H), 4,05 (с, 3H), 3,72 (т, J=5,8 Гц, 4H), 3,59 (т, J=5,8 Гц, 4H). <sup>13</sup>C ЯМР (151 Гц, CDCl<sub>3</sub>): δ м.д. 156,3, 153,4, 151,1, 149,4, 148,4, 146,3, 145,3, 142,4, 126,1, 124,7, 123,5, 111,9, 101,0, 100,1, 56,7, 50,7, 48,8. HRMS (ESI) m/z: рассчитано C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>N<sub>12</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 545,2116; найдено 545,2129.

### **Общая методика получения ди-аминосодержащих производных ВНQ**

К раствору ди-азидо производного **1.1.32** или **1.1.33** (0,4 ммоль, 1,0 экв.) в смеси тетрагидрофурана и воды (9:1, об/об, 2 мл) добавляли трифенилфосфин (1,0 ммоль, 2,4 экв.) при комнатной температуре, и полученный в результате раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После концентрирования продукт очищали препаративной ВЭЖХ.

#### **Краситель 1.1.34**

Соединение получали в виде аморфного темно-фиолетового твердого остатка с выходом 83%, исходя из соединения **1.1.32**.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,08 (уш с, 6H), 7,94 (с, 1H), 7,84 (д,  $J=8,9$  Гц, 2H), 7,76 (д,  $J=8,1$  Гц, 1H), 7,69 (д,  $J=8,1$  Гц, 1H), 7,52 (с, 1H), 7,30 (с, 1H), 7,05 (д,  $J=8,9$  Гц, 2H), 3,93 (с, 3H), 3,72 (т,  $J=6,7$  Гц, 4H), 3,07-3,01 (м, 4H), 2,63 (с, 3H), 2,50 (с, 3H, перекрывается с ДМСО).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (151 Гц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 158,2 (кв,  $J=34$  Гц,  $\underline{\text{C}}(\text{O})\text{-CF}_3$ ), 154,4, 150,4, 150,0, 146,3, 144,3, 144,2, 142,6, 142,1, 133,8, 131,9, 125,1, 124,1, 119,9, 118,4, 116,5 (кв,  $J=296$  Гц,  $\text{CF}_3$ ), 112,3, 99,2, 55,9, 47,6, 35,7, 20,5, 16,1. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_8\text{O}_3^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ : 491,2514; найдено 491,2507.

### **Краситель 1.1.35**

Соединение получали в виде аморфного темно-фиолетового твердого остатка с выходом 73%, исходя из соединения **1.1.33**.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,45 (д,  $J=8,4$  Гц, 2H), 8,08 (д,  $J=8,4$  Гц, 2H), 8,04-7,94 (уш с, 6H), 7,88 (д,  $J=8,8$  Гц, 2H), 7,47 (с, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,05 (д,  $J=8,8$  Гц, 2H), 4,01 (с, 3H), 3,96 (с, 3H), 3,71 (т,  $J=6,9$  Гц, 4H), 3,08-3,01 (м, 4H),  $^{13}\text{C}$  ЯМР (151 Гц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 158,4 (кв,  $J=32$  Гц,  $\underline{\text{C}}(\text{O})\text{-CF}_3$ ), 156,1, 153,3, 151,0, 150,8, 148,7, 146,1, 144,9, 142,3, 125,9, 125,6, 124,0, 118,0 (кв,  $J=272$  Гц,  $\text{CF}_3$ ), 112,9, 101,3, 100,7, 57,0, 56,9, 48,2, 36,3. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_8\text{O}_4^+ [\text{M-CF}_3\text{COOH-CF}_3\text{COO}]^+$ : 493,2306; найдено 493,2289.

### **Краситель гуанидино 1.1.35**

К раствору красителя **1.1.35** (37 мг, 0,05 ммоль) в ДМСО (2 мл) добавляли *N,N*-диизопропилэтиламин (56 мкл, 0,30 ммоль) с последующим добавлением гидрохлорида 1H-пиразол-1-карбоксамидина (22 мг, 0,15 ммоль). Реакционную смесь нагревали в течение 4 часов при 60°C, концентрировали в вакууме и очищали препаративной ВЭЖХ, получая краситель **гуанидино 1.1.35** в виде аморфного темно-фиолетового твердого остатка (22 мг, 0,027 ммоль, 54%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,45 (д,  $J=9,0$  Гц, 2H), 8,07 (д,  $J=9,0$  Гц, 2H), 7,84 (д,  $J=9,2$  Гц, 2H), 7,75 (т,  $J=6,0$  Гц, 2H), 7,58-7,01 (м, 8H), 7,46 (с, 1H), 7,38 (с, 1H), 6,97 (д,  $J=9,2$  Гц, 2H), 4,01 (с, 3H), 3,96 (с, 3H), 3,63 (т,  $J=6,5$  Гц, 4H), 3,39 (кв,  $J=6,5$  Гц, 4H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (151 Гц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 158,2 (кв,  $J=33$  Гц,  $\underline{\text{C}}(\text{O})\text{-CF}_3$ ), 156,7, 155,5, 152,8, 150,6, 150,3, 148,1, 145,7, 143,9, 141,5, 125,5, 125,0, 123,4, 116,3 (кв,  $J=295$  Гц,  $\text{CF}_3$ ), 111,7, 100,6, 100,0, 56,4, 56,3, 48,5, 38,0. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_{12}\text{O}_4^+ [\text{M-CF}_3\text{COOH-CF}_3\text{COO}]^+$ : 577,2742; найдено 577,2756.

### **1-(3-азидопропил)-5-бромурацил 1.1.37**

Смесь 1-(3-бромпропил)-5-бромурацила **1.1.36** [428] (2,71 г, 8,70 ммоль) и  $\text{NaN}_3$  (0,68 г, 10,5 ммоль) в ДМФА (20 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем, смесь выливали в воду (30 мл), и продукт экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3  $\times$  20 мл). Органические слои концентрировали и упаривали с толуолом (2  $\times$  20 мл). Остаток очищали

колоночной хроматографией на силикагеле (0-2%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), получая **1.1.37** (2,12 г, 7,80 ммоль, 89 %) в виде грязно-белого твердого остатка.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 11,71 (уш с, 1H), 8,20 (с, 1H), 3,74 (т,  $J=6,9$  Гц, 2H), 3,39 (т,  $J=6,7$  Гц, 2H), 1,85 (дд,  $J=6,7$ ,  $J=6,9$  Гц, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 159,6, 150,3, 145,2, 94,6, 47,9, 45,6, 27,4. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_7\text{H}_9\text{BrN}_5\text{O}_2^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ : 273,9934; найдено 273,9939.

#### **4-((5-(3-азидопропокси)-2-гидроксифенил)-1-(3-азидопропил)-5-бромцитозин 1.1.38**

К суспензии 1,2,4-триазола (2,55 г, 36,9 ммоль) в сухом  $\text{CH}_3\text{CN}$  (80 мл) добавляли  $\text{POCl}_3$  (0,75 мл, 8,20 ммоль) при  $0^\circ\text{C}$  с последующим добавлением холодного триэтиламина (8,61 мл, 61,5 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 мин при  $0^\circ\text{C}$  и добавляли к раствору **1.1.37** (1,12 г, 4,10 ммоль) в сухом  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10 мл). Смесь перемешивали в течение 4 ч и концентрировали в вакууме. Остаток распределяли между  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 мл) и насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (100 мл). Органический слой промывали водой (2x100 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме, получая триазольное промежуточное соединение в виде оранжевого твердого остатка (1,24 г). Остаток растворяли в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 мл) и добавляли к 4-(3-бромпропокси)-2-аминофенолу [10.1093/nar/gky121] (1,62 г, 6,60 ммоль) с последующим добавлением ДИПЭА (1,2 мл, 6,60 ммоль). После перемешивания в течение ночи при комнатной температуре органический слой последовательно промывали 2% водным раствором лимонной кислоты (30 мл), насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (30 мл) и водой ( $2 \times 30$  мл) и концентрировали в вакууме. Полученную пену растворяли в ДМФА (15 мл) и добавляли  $\text{NaN}_3$  (0,4 г, 6,20 ммоль). После перемешивания в течение ночи при комнатной температуре, смесь выливали в воду (30 мл), и продукт экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 20$  мл). Органические слои концентрировали и упаривали с толуолом ( $2 \times 20$  мл). Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-1%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), получая **1.1.38** (1,03 г, 2,21 ммоль, 54 %) в виде коричневого твердого остатка.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 9,83 (уш с, 1H), 8,29 (с, 1H), 8,20 (уш с, 1H), 8,04 (д,  $J=3,0$  Гц, 1H), 6,82 (д,  $J=8,7$  Гц, 1H), 6,59 (дд,  $J=3,0$  Гц,  $J=8,7$  Гц, 1H), 3,95 (т,  $J=6,1$  Гц, 2H), 3,80 (т,  $J=7,0$  Гц, 2H), 3,51 (т,  $J=6,7$  Гц, 2H), 3,40 (т,  $J=6,7$  Гц, 2H), 1,97 (дд,  $J=6,1$ ,  $J=6,7$  Гц, 2H), 1,90 (дд,  $J=6,7$ ,  $J=7,0$  Гц, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 156,8, 153,8, 151,0, 146,9, 141,1, 126,7, 114,8, 109,1, 108,5, 86,6, 64,9, 48,1, 47,7, 47,00, 28,1, 27,5. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{BrN}_9\text{O}_3^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ : 464,0789; найдено 464,0790.

#### **8-(3-азидопропокси)-3-(3-азидопропил)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.39**

Цитозиновое производное **1.1.38** (1,01 г, 2,18 ммоль) растворяли в смеси абсолютного  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (30 мл) и ТЭА (5,8 мл) и кипятили с обратным холодильником в атмосфере  $\text{N}_2$  в течение 48 часов. После концентрирования в вакууме, остаток очищали

колоночной хроматографией на силикагеле (0-2%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), получая **1.1.39** (0,27 г, 0,70 ммоль, 32 %) в виде желтого твердого остатка.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 10,39 (уш с, 1H), 7,38 (уш с, 1H), 6,71 (д,  $J=8,6$  Гц, 1H), 6,42-6,37 (м, 2H), 3,93 (т,  $J=6,1$  Гц, 2H), 3,64 (т,  $J=6,9$  Гц, 2H), 3,48 (т,  $J=6,7$  Гц, 2H), 3,38 (т,  $J=6,7$  Гц, 2H), 1,93 (дд,  $J=6,1$ ,  $J=6,7$  Гц, 2H), 1,84 (дд,  $J=6,7$ ,  $J=6,9$  Гц, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 154,3, 153,5, 136,0, 130,9, 128,4, 127,4, 126,5, 115,3, 108,1, 103,6, 64,9, 48,00, 47,6, 46,1, 28,00, 27,4. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_9\text{O}_3^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 384,1527; найдено 384,1532.

### ***3-(3-азидопропил)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.41***

К суспензии 1,2,4-триазола (2,18 г, 31,5 ммоль) в сухом  $\text{CH}_3\text{CN}$  (70 мл) добавляли  $\text{POCl}_3$  (0,64 мл, 7,0 ммоль) при  $0^\circ\text{C}$  с последующим добавлением холодного триэтиламина (7,35 мл, 52,5 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 мин при  $0^\circ\text{C}$  и добавляли к **1.1.37** (0,88 г, 3,5 ммоль). Смесь перемешивали в течение 4 ч и концентрировали в вакууме. Остаток распределяли между  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 мл) и насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (100 мл). Органический слой промывали водой (2x100 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме, получая триазольное промежуточное соединение в виде оранжевого твердого остатка (0,95 г). Остаток растворяли в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (35 мл) и добавляли к 2-аминофенолу (0,62 г, 5,6 ммоль) с последующим добавлением ДИПЭА (1,0 мл, 5,6 ммоль). После перемешивания в течение ночи при комнатной температуре, органический слой последовательно промывали 2% водным раствором лимонной кислоты (30 мл), насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (30 мл) и водой ( $2 \times 30$  мл) и концентрировали в вакууме. Полученную пену растворяли в смеси абсолютного  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (25 мл) и ТЭА (4,9 мл) и кипятили с обратным холодильником в атмосфере  $\text{N}_2$  в течение 48 часов. После концентрирования в вакууме, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-2%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), получая **1.1.41** (0,19 г, 0,67 ммоль, 19 %) в виде светло-коричневого твердого остатка.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 10,41 (уш с, 1H), 7,39 (с, 1H), 6,88-6,81 (м, 2H), 6,80-6,76 (м, 2H), 3,65 (т,  $J=6,9$  Гц, 2H), 3,38 (т,  $J=6,7$  Гц, 2H), 1,84 (дд,  $J=6,7$ ,  $J=6,9$  Гц, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 153,5, 153,2, 142,1, 127,8, 126,6, 126,4, 123,5, 123,4, 116,7, 114,9, 48,00, 46,1, 27,4. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_6\text{O}_2^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 285,1095; найдено 285,1098.

### ***10-(2-((2-аминоэтил)амино)-2-оксоэтил)-3-(3-азидопропил)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.43***

К раствору **1.1.41** (0,13 г, 0,46 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 мл) добавляли ДБУ (0,15 мл, 1,00 ммоль) при комнатной температуре. Затем, добавляли метил 2-бромацетат (0,88 мл, 0,92 ммоль) одной порцией, и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и затем выливали в 5% водный раствор лимонной кислоты (10 мл).

Органические вещества экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 15$  мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученную пену растворяли в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (10 мл) и добавляли этан-1,2-диамин (0,3 мл, 4,6 ммоль). Раствор нагревали при  $50^\circ\text{C}$  в течение 48 часов, концентрировали и упаривали с толуолом ( $2 \times 10$  мл) в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-5%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), получая **1.1.43** (0,13 г, 0,34 ммоль, 73 %) в виде светло-коричневого твердого остатка.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 7,55 (уш т, 1H), 7,55 (с, 1H), 6,95-6,90 (м, 2H), 6,86-6,83 (м, 1H), 6,80-6,76 (м, 1H), 4,57 (с, 2H), 3,71 (т,  $J=7,0$  Гц, 2H), 3,39 (т,  $J=6,8$  Гц, 2H), 3,14-3,08 (м, 2H), 2,61 (т,  $J=6,2$  Гц, 2H), 1,84 (дд,  $J=7,0$ ,  $J=6,8$  Гц, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 166,1, 153,3, 153,3, 142,4, 127,9, 127,8, 126,3, 123,6, 123,1, 115,00, 114,4, 47,9, 46,2, 43,5, 41,9, 40,8, 27,3. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_8\text{O}_3^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 385,1731; найдено 385,1737.

### Общая методика каталитического гидрирования

Суспензию соответствующего азиды (1 экв.) и 10% Pd/C (30 мг/ммоль) в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (5 мл/ммоль) перемешивали в течение 3 часов в атмосфере водорода. Катализатор отфильтровывали, и раствор концентрировали в вакууме. Остаток растирали с  $\text{CH}_3\text{CN}$ , получая соответствующий амин:

### **8-(3-аминопропокси)-3-(3-аминопропил)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.40**

Соединение **1.1.40** (190 мг, 0,57 ммоль, 84 %) получали в виде желтого твердого остатка, исходя из **1.1.39**.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 7,40 (с, 1H), 6,70 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 6,41-6,35 (м, 2H), 3,92 (т,  $J=6,0$  Гц, 2H), 3,65 (т,  $J=6,5$ , 2H), 2,72 (т,  $J=6,2$  Гц, 2H), 2,57 (т,  $J=6,6$  Гц, 2H), 1,82-1,75 (м, 2H), 1,72-1,66 (м, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 154,4, 153,3, 135,9, 128,4, 126,4, 126,2, 126,2, 115,0, 108,1, 103,6, 65,5, 45,7, 37,4, 37,4, 30,5, 30,2. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_3^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 332,1717; найдено 332,1722.

### **3-(3-аминопропил)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.42**

Соединение **1.1.42** (41 мг, 0,16 ммоль, 78 %) получали в виде бежевого твердого остатка, исходя из **1.1.41**.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 7,42 (с, 1H), 6,87-6,80 (м, 2H), 6,80-6,74 (м, 2H), 3,64 (т,  $J=6,8$  Гц, 2H), 2,56 (т,  $J=6,7$  Гц, 2H), 1,68 (дд,  $J=6,7$ ,  $J=6,8$  Гц, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 153,5, 153,5, 142,1, 127,8, 126,7, 126,3, 123,4 (2C), 116,7, 114,9, 45,9, 37,7, 30,9. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 259,1190; найдено 259,1193.

### **10-(2-((2-аминоэтил)амино)-2-оксоэтил)-3-(3-аминопропил)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.44**

Соединение **1.1.44** (93 мг, 0,26 ммоль, 80 %) получали в виде бежевого твердого остатка, исходя из **1.1.43**.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,36 (т,  $J=5,2$  Гц, 1H), 7,66 (с, 1H), 6,96-6,89 (м, 2H), 6,87-6,83 (м, 1H), 6,83-6,79 (м, 1H), 4,58 (с, 2H), 3,72 (т,  $J=6,6$  Гц, 2H),



3,19-3,13 (м, 2H), 2,69-2,63 (м, 4H), 1,81 (дд, J=6,8, J=6,6 Гц, 2H),  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ):  $\delta$  м.д. 166,3, 153,6, 153,3, 142,4, 127,9, 127,9, 126,4, 123,7, 123,2, 115,00, 114,5, 45,8, 43,5, 40,4, 40,1, 36,9, 28,8. HRMS (ESI) m/z: рассчитано  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_3^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ : 359,1826; найдено 359,1833.

**9-(2-(Бензилоксикарбонил)аминоэтокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.47**

К раствору **1.1.45** (120 мг, 0,24 ммоль) в  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (10 мл) добавляли концентрированную водную  $\text{HCl}$  (0,8 мл) одной порцией при комнатной температуре, и реакционную смесь нагревали при  $40^\circ\text{C}$  в течение 24 часов. Раствор концентрировали в вакууме и упаривали с толуолом (3 x 10 мл). Остаток растворяли в 10%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 мл), промывали соляным раствором (2 x 25 мл) и концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-3%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), получая **1.1.47** в виде желто-зеленого твердого остатка (80 мг, 0,20 ммоль, 84%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ):  $\delta$  м.д. 10,51 (уш с, 1H), 7,74-7,68 (м, 1H), 7,38-7,33 (м, 4H), 7,33-7,28 (м, 1H), 7,21-7,15 (м, 1H), 6,80 (дд, J=8,4 Гц, J=8,2 Гц, 1H), 6,61 (д, J=8,4 Гц, 1H), 6,42 (д, J=8,2 Гц, 1H), 5,05 (с, 2H), 3,94 (т, J=5,0 Гц, 2H), 3,44-3,40 (м, 2H). HRMS (ESI) m/z: рассчитано  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{NaO}_5^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$ : 417,1169; найдено 417,1169.

**3-(2-Метокси-2-оксоэтил)-9-(2-(бензилоксикарбонил)аминоэтокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.48**

К раствору **1.1.47** (75 мг, 0,19 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) добавляли при комнатной температуре ДБУ (86 мкл, 0,57 ммоль), с последующим добавлением метил 2-бромацетата (36 мкл, 0,38 ммоль). Затем, реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и выливали в 5% водный раствор лимонной кислоты (10 мл). Органический слой отделяли, органические вещества из водного слоя экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 15 мл). Объединенные органические слои сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-2%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), получая **1.1.48** в виде желтого твердого остатка (65 мг, 0,14 ммоль, 73%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ):  $\delta$  м.д. 9,80 (уш с, 1H), 7,76-7,70 (м, 1H), 7,53-7,47 (м, 1H), 7,37-7,33 (м, 4H), 7,32-7,29 (м, 1H), 6,81 (дд, J=8,3 Гц, J=8,2 Гц, 1H), 6,62 (д, J=8,3 Гц, 1H), 6,47 (д, J=8,2 Гц, 1H), 5,05 (с, 2H), 4,42 (с, 2H), 4,00-3,93 (м, 2H), 3,68 (с, 3H), 3,44-3,41 (м, 2H). HRMS (ESI) m/z: рассчитано  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{NaO}_7^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$ : 489,1381; найдено 489,1371.

**3-(2-((2-Аминоэтил)амино)-2-оксоэтил)-9-(2-аминоэтокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.49**

К раствору **1.1.48** (60 мг, 0,13 ммоль) в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (10 мл) добавляли этан-1,2-диамин (87 мкл, 1,3 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали при  $50^\circ\text{C}$  в течение 48 часов, концентрировали и упаривали с толуолом (3 x 10 мл) в вакууме. Остаток

растворяли в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (10 мл), добавляли к нему 10%  $\text{Pd/C}$  (10 мг/ммоль), и суспензию перемешивали в течение 12 часов в атмосфере водорода. Катализатор отфильтровывали, и раствор концентрировали в вакууме. Остаток растирали с теплым  $\text{CH}_3\text{CN}$  (3 x 5 мл), получая **1.1.49** в виде желто-зеленого твердого остатка (29 мг, 0,08 ммоль, 62%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,13-8,09 (м, 1H), 7,39 (с, 1H), 6,88 (дд,  $J=8,3$  Гц,  $J=8,2$  Гц, 1H), 6,62 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 6,45 (д,  $J=8,2$  Гц, 1H), 4,24 (с, 2H), 3,94 (т,  $J=4,6$  Гц, 2H), 3,13-3,08 (м, 2H), 2,93 (т,  $J=4,6$  Гц, 2H), 2,61 (т,  $J=6,2$  Гц, 2H). HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_4^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 361,1619; найдено 361,1606.

**3-(2-((2-(Гуанидино)этил)амино)-2-оксоэтил)-9-(2-(гуанидино)этокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.50**

К раствору **1.1.49** (6,0 мг, 0,017 ммоль) в  $\text{DMSO}$  (0,5 мл) добавляли ДИПЭА (12 мкл, 0,068 ммоль) с последующим добавлением гидрохлорида 1H-пиразол-1-карбоксамидина (7,5 мг, 0,051 ммоль). Реакционную смесь нагревали в течение 2 часов при  $60^\circ\text{C}$ , охлаждали до комнатной температуры, разбавляли водой (2,5 мл) и очищали препаративной ВЭЖХ (элюировали в линейном градиенте вода- $\text{CH}_3\text{CN}$  (12-35%  $\text{CH}_3\text{CN}$  в течение 25 мин) с 0,1% трифторуксусной кислотой при скорости потока 50 мл/мин), получая **1.1.50** в виде желто-зеленой твердой бис(трифторацетатной) соли (3,6 мг, 0,005 ммоль, 31%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 9,76 (уш с, 1H), 8,27 (т,  $J=5,1$  Гц, 1H), 7,75 (уш с, 1H), 7,52 (уш с, 1H), 7,18 (уш с, 1H), 7,11 (уш с, 1H), 7,04 (уш с, 1H), 6,83 (дд,  $J=8,3$  Гц,  $J=8,1$  Гц, 1H), 6,63 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 6,50 (д,  $J=8,1$  Гц, 1H), 4,27 (с, 2H), 4,02 (т,  $J=4,8$  Гц, 2H), 3,58-3,54 (м, 2H), 3,24-3,18 (м, 4H). HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_{10}\text{O}_4^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 445,2055; найдено 445,2087.

**3-(2-((2-(Диметиламино)этил)амино)-2-оксоэтил)-9-(2-(диметиламино)этокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.51**

К раствору **1.1.49** (9,1 мг, 0,025 ммоль),  $\text{HOAc}$  (30 мкл) и 37% водного  $\text{CH}_2\text{O}$  (10 мкл, 0,125 ммоль) в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (2 мл) добавляли небольшими порциями  $\text{NaCNBH}_3$  (9,5 мг, 0,15 ммоль) при интенсивном перемешивании при  $0^\circ\text{C}$ . Затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, и  $\text{CH}_3\text{OH}$  отгоняли на ротаторном испарителе. Остаток разбавляли водой (4 мл) и очищали препаративной ВЭЖХ (элюировали в линейном градиенте вода- $\text{CH}_3\text{CN}$  (12-35%  $\text{CH}_3\text{CN}$  в течение 25 мин) с 0,1% трифторуксусной кислотой при скорости потока 50 мл/мин), получая **1.1.51** в виде бледно-желтой твердой бис(трифторацетатной) соли (5,3 мг, 0,008 ммоль, 33%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 9,73 (уш с, 1H), 9,44 (уш с, 1H), 9,35 (уш с, 1H), 8,35 (т,  $J=5,6$  Гц, 1H), 7,48 (уш с, 1H), 6,87 (дд,  $J=8,6$  Гц,  $J=8,0$  Гц, 1H), 6,72 (д,  $J=8,6$  Гц, 1H), 6,53 (д,  $J=8,0$  Гц, 1H), 4,30 (т,  $J=5,0$  Гц, 2H), 4,28 (с, 2H), 3,57-3,50 (м, 2H), 3,46-3,41 (м, 2H), 3,16-3,11 (м, 2H), 2,91 (с, 6H), 2,81 (с, 6H). HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_4^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 417,2245; найдено 417,2254.

**3-(β-D-Рибофуранозил)-9-(2-(гуанидино)этокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.52**

Данное производное получали в виде трифторацетатной соли, исходя из **1.1.46** и следуя способу получения **1.1.50**. Выход 72%. <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ м.д. 7,75 (уш с, 2H), 7,16 (с, 1H), 6,63 (дд, J=7,9 Гц, J=8,1 Гц, 1H), 6,55 (дд, J=1,4 Гц, J=8,1 Гц, 1H), 6,40 (дд, J=1,3 Гц, J=7,9 Гц, 1H), 5,74 (д, 1H, J=4,5 Hz), 3,99 (т, J=4,6 Гц, 2H), 3,98-3,92 (м, 2H), 3,79-3,75 (м, 1H), 3,63 (дд, J=3,1 Гц, J=11,9 Гц, 1H), 3,54 (дд, J=3,1 Гц, J=12,0 Гц, 1H), 3,39 (т, J=4,6 Гц, 2H). HRMS (ESI) m/z: рассчитано C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 435,1623; найдено 435,1639.

**3-(β-D-Рибофуранозил)-9-(2-(диметиламино)этокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.53**

Данное производное получали в виде трифторацетатной соли, исходя из **1.1.46** и следуя способу получения **1.1.51**. Выход 67%. <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ м.д. 7,58 (с, 1H), 6,81 (дд, J=8,1 Гц, J=8,3 Гц, 1H), 6,68 (дд, J=1,3 Гц, J=8,3 Гц, 1H), 6,48 (дд, J=1,2 Гц, J=8,1 Гц, 1H), 5,75 (д, 1H, J=4,0 Hz), 4,04 (т, J=5,7 Гц, 2H), 4,00-3,95 (м, 2H), 3,85-3,81 (м, 1H), 3,67 (дд, J=2,9 Гц, J=12,0 Гц, 1H), 3,57 (дд, J=3,1 Гц, J=12,0 Гц, 1H), 2,64 (т, J=5,7 Гц, 2H), 2,26 (с, 6H). HRMS (ESI) m/z: рассчитано C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 421,1718; найдено 421,1732.

**трет-бутил (Z)-(2-(4-(4-гидрокси-3,5-диметоксибензилиден)-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)этил)карбамат 1.1.66**

К раствору 4-гидрокси-3,5-диметоксибензальдегида **1.1.65** (1,82 г, 10 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/изопропанол (50 мл, об/об 10:1) добавляли трет-бутил(2-аминоэтил)карбамат (2,40 г, 15 ммоль) и безводный Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 г). Смесь перемешивали в течение 48 ч при комнатной температуре, фильтровали и сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель упаривали при пониженном давлении, и к остатку добавляли этил-2-((1-метоксиэтилиден)амино)ацетат (3,18 г, 20 ммоль) с последующим добавлением метанола (10 мл). Смесь перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре, растворители упаривали, и продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-1% MeOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), получая **1.1.66** в виде желтого твердого аморфного остатка (2,93 г, 72 %); <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ м.д. 7,50 (с, 2H), 6,99 (с, 1H), 5,92 (с, 1H), 4,91-4,82 (м, 1H), 3,94 (с, 6H), 3,75 (т, J=6,2 Гц, 2H), 3,38-3,32 (м, 2H), 2,38 (с, 3H), 1,42 (с, 9H); <sup>13</sup>C ЯМР (150 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ м.д. 170,9, 161,2, 156,0, 147,0, 137,5, 136,7, 128,0, 125,7, 109,4, 79,8, 56,3, 40,3, 39,5, 28,3, 15,6. HRMS (ESI) m/z: рассчитано C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup>: 406,1973; найдено 406,1971.

**трет-бутил (2-(2-((E)-3,5-дибром-4-гидроксистирил)-4-((Z)-4-гидрокси-3,5-диметоксибензилиден)-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)этил)карбамат 1.1.67**

К раствору **1.1.66** (405 мг, 1 ммоль) в диоксане (5 мл) добавляли безводный хлорид цинка (30 мг, 0,22 ммоль) и 3,5-дибром-4-гидроксибензальдегид (340 мг, 1,2 ммоль). Смесь

кипятили с обратным холодильником в течение 4 часов, и растворитель упаривали. Смесь растворяли в EtOAc (50 мл), промывали раствором ЭДТА (0,5%, 10 мл), водой (3×10 мл) и соляным раствором (1×10 мл) с последующей сушкой безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель упаривали, и продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-2% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), получая **1.1.67** в виде оранжевого твердого остатка (148 мг, 22 %); <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ м.д. 10,42 (уш с, 1H), 9,16 (с, 1H), 8,05 (с, 2H), 7,79 (д, *J*=15,7 Гц, 1H), 7,71 (с, 2H), 7,14 (д, *J*=15,7 Гц, 1H), 6,97 (т, *J*=5,7 Гц, 1H), 6,94 (с, 1H), 3,86 (с, 6 H), 3,78 (т, *J*=5,5 Гц, 2H), 3,16-3,10 (м, 2H), 1,29 (с, 9H). <sup>13</sup>C ЯМР (150 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ м.д. 169,6, 158,0, 155,6, 152,2, 147,7, 138,4, 137,0, 136,2, 131,8, 129,6, 125,8, 124,9, 113,4, 112,2, 109,9, 77,7, 55,9 (2×C перекрываются с DMSO), 28,0. HRMS (ESI) *m/z*: рассчитано C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup>: 666,0445; найдено 666,0442.

**Хлорид** *2-((E)-3,5-дибром-4-гидрокситирил)-4-((Z)-4-гидрокси-3,5-диметоксибензилиден)-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)этан-1-аминия 1.1.68*

К раствору **1.1.67** (120 мг, 0,18 ммоль) в смеси CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH (10 мл, об/об 10:1) добавляли 6N HCl в диоксане (0,5 мл), и смесь перемешивали в течение 48 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок фильтровали, промывали холодным CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 5 мл) и сушили в вакууме, получая **1.1.68** в виде красного аморфного остатка (85 мг, 83%); <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ м.д. 10,47 (уш с, 1H), 9,22 (с, 1H), 8,12 (с, 2H), 8,09-7,99 (м, 3H), 7,83 (д, *J*=15,4 Гц, 1H), 7,74 (с, 2H), 7,21 (д, *J*=15,4 Гц, 1H), 7,00 (с, 1H), 4,05 (т, *J*=5,4 Гц, 2H), 3,87 (с, 6 H), 3,12-3,03 (м, 2 H). <sup>13</sup>C ЯМР (150 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ м.д. 170,1, 157,5, 152,0, 147,8, 138,7, 137,0, 136,7, 132,2, 129,9, 126,4, 124,9, 113,4, 112,1, 110,0, 55,9, 40,1, 38,0. HRMS (ESI) *m/z*: рассчитано C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>, [M-Cl]<sup>+</sup>: 565,9921; найдено 565,9918.

**Общая методика синтеза 5-(Z)-бензилиден-2-метил-3-алкил/арил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов**

При синтезе соединений следовали описанной в литературе методике [605]. Соответствующий ароматический альдегид **1.1.69** (10 ммоль) растворяли в CHCl<sub>3</sub> (50 мл) и смешивали с 40% водным раствором метиламина (2,5 мл), пирролидином (7 мг, 0,1 ммоль) и безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 г). Смесь перемешивали в течение 48 ч при комнатной температуре, фильтровали и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель упаривали и добавляли к остатку соответствующий этил((метокси)амино)ацетат (20 ммоль) (в некоторых случаях добавляли 5-10 мл метанола для обеспечения однородного перемешивания). Смесь перемешивали в течение 24 часов при комнатной температуре, растворители упаривали, и продукт очищали колоночной хроматографией (градиент C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH в CHCl<sub>3</sub>).

**(Z)-5-(4-гидрокси-3,5-диметоксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он 1.1.70**

Соединение получено по литературной методике [245].  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  м.д. 9,15 (уш с, 1H), 7,63 (с, 2H), 6,90 (с, 1H), 3,79 (с, 6H), 3,08 (с, 3H), 2,33 (с, 3H).

**(Z)-5-(2,3,4-триметоксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он 1.1.71**

Желтый твердый остаток (1,86 г, 64%);  $T_{\text{пл}}=192-195\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  м.д. 8,53 (д,  $J=9,0$  Гц, 1H), 7,13 (с, 1H), 6,95 (д,  $J=9,0$  Гц, 1H), 3,88-3,85 (м, 6H), 3,77 (с, 3H), 3,09 (с, 3H), 2,34 (с, 3H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  м.д. 169,9, 163,5, 155,4, 153,3, 141,4, 137,6, 127,6, 120,4, 118,0, 108,4, 61,7, 60,5, 56,0, 26,3, 15,4. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 291,1339; найдено 291,1337.

**(Z)-5-(4-гидрокси-2,3-диметоксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он 1.1.72 и (Z)-5-(2,4-дигидрокси-3-метоксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он 1.1.73**

К раствору (Z)-5-(2,3,4-триметоксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она **1.1.71** (5 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 мл) добавляли трибромид бора в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1M, 5 мл, 5 ммоль). Смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре в инертной атмосфере. Смесь разбавляли  $\text{CHCl}_3$  (100 мл), промывали водой (2x50 мл) и соляным раствором (2 x 50 мл) и сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворитель упаривали, и смесь продуктов разделяли колоночной хроматографией ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  в  $\text{CHCl}_3$ , 49:1, об/об).

**(Z)-5-(4-гидрокси-2,3-диметоксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он 1.1.72**

Желтый твердый остаток (0,41 г, 30%);  $T_{\text{пл}}=193-196\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  м.д. 12,44 (уш с, 1H), 7,75 (д,  $J=8,9$  Гц, 1H), 7,15 (с, 1H), 6,64 (д,  $J=9,0$  Гц, 1H), 3,83 (с, 3H), 3,67 (с, 3H), 3,12 (с, 3H), 2,37 (с, 3H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  м.д. 168,1, 160,3, 156,2, 151,9, 136,7, 133,0, 130,4, 124,5, 115,1, 104,1, 59,8, 55,9, 26,4, 15,1. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 277,1183; найдено 277,1178.

**(Z)-5-(2,4-дигидрокси-3-метоксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он 1.1.73**

Оранжевый твердый остаток (0,46 г, 35%);  $T_{\text{пл}}=231-234\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  м.д. 12,71 (уш с, 1H), 8,41 (уш с, 1H), 7,37 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 7,12 (с, 1H), 6,58 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 3,81 (с, 3H), 3,12 (с, 3H), 2,36 (с, 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  м.д. 167,9, 159,6, 151,3, 146,7, 134,6, 132,3, 125,9, 125,7, 114,4, 104,1, 55,8, 26,4, 15,1. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4^+$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 263,1026; найдено 263,1024.

**Общая методика синтеза 5-(Z)-бензилиден-2-(E)-арилвинил-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-онов**

К раствору (Z)-5-(4-гидрокси-3,5-диметоксибензилиден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она **1.1.70** или (Z)-5-(4-гидрокси-2,3-диметоксибензилиден)-2,3-диметил-

3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она **1.1.72** (1 ммоль) в диоксане (5 мл) добавляли безводный хлорид цинка (30 мг, 0.22 ммоль) и соответствующий альдегид (1,2 ммоль). Смесь кипятили с обратным холодильником в течение 1-6 часов, и растворитель упаривали. Смесь растворяли в EtOAc (50 мл) и промывали раствором ЭДТА (0,5%, 10 мл), водой (3×10 мл) и соляным раствором (1×10 мл). Смесь сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель упаривали, и продукт очищали колоночной хроматографией (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>ОН в CHCl<sub>3</sub>, обычно 19:1, об/об).

**5-((*Z*)-4-гидрокси-3,5-диметоксибензилиден)-2-((*E*)-4-гидрокси-3,5-диметоксистирил)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он 1.1.74**

Красный твердый остаток (62 мг, 39%); Т<sub>пл</sub>=235-238 °С; <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ м.д. 9,13 (с, 1H), 9,01 (с, 1H), 7,89 (д, *J*=15,6 Гц, 1H), 7,74 (с, 2H), 7,10 (с, 2H), 7,06 (д, *J*=15,6 Гц, 1H), 6,92 (с, 1H), 3,87 (с, 6H), 3,85 (с, 6H), 3,29 (с, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (150 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ м.д. 170,0, 159,1, 148,1, 147,9, 140,6, 138,5, 138,5, 137,4, 125,7, 125,2, 125,1, 110,9, 110,1, 106,5, 56,2, 56,0, 26,4. HRMS (ESI) *m/z*: рассчитано C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 439,1511; найдено 439,1516.

**5-((*Z*)-4-гидрокси-3,5-диметоксибензилиден)-3-метил-2-((*E*)-2-(хинолин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он 1.1.75**

Темно-красный твердый остаток (95 мг, 23%); Т<sub>пл</sub>=273-276 °С; <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ м.д. 9,30 (уш с, 1H), 9,01 (д, *J*=4,6 Гц, 1H), 8,77 (д, *J*=15,6 Гц, 1H), 8,28 (д, *J*=8,4 Гц, 1H), 8,09-8,13 (м, 2H), 7,81-7,89 (м, 3H), 7,74 (т, *J*=7,4 Гц, 1H), 7,60 (д, *J*=15,6 Гц, 1H), 7,10 (с, 1H), 3,92 (с, 6 H), 3,34 (с, 3 H). <sup>13</sup>C ЯМР (201 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ м.д. 169,7, 158,1, 150,2, 148,3, 147,8, 139,3, 139,0, 137,0, 132,4, 129,8, 129,6, 127,6, 127,2, 125,4, 124,9, 122,7, 120,2, 118,0, 110,4, 55,7, 26,3. HRMS (ESI) *m/z*: рассчитано C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup>: 414,1459; найдено 414,1463.

**2-((1*E*,3*E*)-4-(4-(диметиламино)фенил)бута-1,3-диен-1-ил)-5-((*Z*)-4-гидрокси-3,5-диметоксибензилиден)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он 1.1.76**

Темно-красный твердый остаток (52 мг, 12%); Т<sub>пл</sub>~200 °С с разложением; <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ м.д. 9,12 (уш с, 1H), 7,69-7,74 (м, 3H), 7,45 (д, *J*=8,8 Гц, 2H), 6,97-7,06 (м, 2H), 6,89 (с, 1H), 6,74 (д, *J*=9,0 Гц, 2H), 6,55 (д, *J*=14,7 Гц, 1H), 3,86 (с, 6 H), 3,19 (с, 3H), 2,98 (с, 6 H). <sup>13</sup>C ЯМР (201 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ м.д. 169,7, 158,8, 150,8, 147,8, 141,3, 140,5, 138,4, 137,6, 128,6, 125,2, 124,6, 123,8, 123,0, 113,7, 112,0, 110,0, 56,0, 40,0, 26,1. HRMS (ESI) *m/z*: рассчитано C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup>: 434,2074; найдено 434,2066.

**5-((*Z*)-4-гидрокси-2,3-диметоксибензилиден)-3-метил-2-((*E*)-2-(хинолин-4-ил)винил)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-он 1.1.77**

Красный твердый остаток (104 мг, 69%);  $T_{пл}$ =216-219 °C;  $^1H$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  м.д. 11,75 (уш с, 1H), 9,01 (д,  $J$ =4,6 Гц, 1H), 8,59 (д,  $J$ =15,8 Гц, 1H), 8,36 (д,  $J$ =8,4 Гц, 1H), 8,16 (д,  $J$ =8,8 Гц, 1H), 8,12 (д,  $J$ =8,4 Гц, 1H), 8,08 (д,  $J$ =4,4 Гц, 1H), 7,86 (т,  $J$ =7,5 Гц, 1H), 7,6 (т,  $J$ =7,6 Гц, 1H), 7,56 (д,  $J$ =15,6 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 6,74 (д,  $J$ =9,0 Гц, 1H), 3,88 (с, 3H), 3,74 (с, 3H), 3,36 (с, 3H).  $^{13}C$  ЯМР (150 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  м.д. 168,5, 156,3, 156,2, 152,0, 150,3, 148,3, 139,5, 136,5, 134,4, 133,0, 130,2, 129,8, 129,7, 127,4, 125,3, 123,2, 120,2, 118,4, 115,7, 104,6, 59,9, 55,9, 26,7. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{24}H_{22}N_3O_4^+$ ,  $[M+H]^+$ : 416,1605; найдено 416,1601.

***2-((E)-2-(2,6-дихлорпиридин-4-ил)винил)-5-((Z)-4-гидрокси-2,3-диметоксибензилиден)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он 1.1.78***

Красный твердый остаток (94 мг, 60%);  $T_{пл}$  ~260 °C с разложением;  $^1H$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  м.д. 8,18 (д,  $J$ =8,8 Гц, 1H), 8,10 (с, 2H), 7,80 (д,  $J$ =16,0 Гц, 1H), 7,67 (д,  $J$ =16,0 Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 6,68 (д,  $J$ =9,0 Гц, 1H), 3,87 (с, 3H), 3,72 (с, 3H), 3,31 (с, 3H).  $^{13}C$  ЯМР (150 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  м.д. 168,6, 156,3, 155,9, 152,0, 149,9, 148,8, 136,3, 134,7, 133,8, 130,0, 121,7, 121,3, 115,7, 104,5, 60,0, 55,9, 26,7. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{20}H_{16}Cl_2N_3O_4^-$ ,  $[M-H]^-$ : 432,0523; найдено 432,0530.

***2-((E)-3,5-дибром-4-гидрокситирил)-5-((Z)-4-гидрокси-2,3-диметоксибензилиден)-3-метил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он 1.1.79***

Красный твердый остаток (101 мг, 52%);  $T_{пл}$  ~250 °C с разложением;  $^1H$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  м.д. 8,14 (с, 2H), 8,00 (д,  $J$ =9,3 Гц, 1H), 7,73 (д,  $J$ =15,4 Гц, 1H), 7,21-7,26 (м, 2H), 6,67 (д,  $J$ =9,2 Гц, 1H), 3,86 (с, 3H), 3,72 (с, 3H), 3,30 (с, 3H).  $^{13}C$  ЯМР (150 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  м.д. 168,5, 156,5, 156,1, 152,2, 151,8, 137,2, 137,2, 136,5, 134,3, 132,2, 130,2, 129,7, 115,8, 113,3, 112,2, 104,4, 59,9, 55,8, 26,6. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{21}H_{17}Br_2N_2O_5^-$ ,  $[M-H]^-$ : 534,9510; найдено 534,9524.

***4-(2-Бромэтокси)-2-нитрофенол 1.1.81***

4-(2-Бромэтокси)фенол **1.1.80** [487] (10,85 г, 50 ммоль) растворяли в бензоле (500 мл), и раствор охлаждали до 0 °C. Затем, добавляли одной порцией 56% водный раствор азотной кислоты (3 мл, 64 ммоль) при интенсивном перемешивании. Через 2 мин при 0 °C смесь промывали водой (100 мл), сушили над  $Na_2SO_4$  и концентрировали в вакууме до коричневого масла. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (35%  $CHCl_3$  в гексане) с последующей перекристаллизацией из смеси этилацетат/гексан (1/2, об/об), получая **1.1.81** в виде желтого твердого остатка (5,50 г, 21 ммоль, 42%).  $T_{пл}$  86–88 °C.  $^1H$  ЯМР (600 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  м.д. 10,33 (с, 1H), 7,53 (д,  $J$ =3,1 Гц, 1H), 7,28 (дд,  $J$ =3,1 Гц,  $J$ =9,3 Гц, 1H), 7,12 (д,  $J$ =9,3 Гц, 1H), 4,31 (т,  $J$ =6,0 Гц, 2H), 3,67 (т,  $J$ =6,0 Гц, 2H),  $^{13}C$  ЯМР

(150 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ м.д. 150,9, 150,3, 132,8, 127,5, 121,0, 107,2, 68,7, 28,5. HRMS (ESI) m/z: рассчитано C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>BrNO<sub>4</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 259,9564; найдено 259,9561.

### **3',5'-О-Ацетил-N4-(1,2,4-триазол-1-ил)-5-бром-2'-дезоксцитидин 1.1.84**

К суспензии 1,2,4-триазола (6,7 г, 99 ммоль) в сухом CH<sub>3</sub>CN (80 мл) при 0 °С в атмосфере азота добавляли POCl<sub>3</sub> (2,0 мл, 22 ммоль) с последующим добавлением холодного триэтиламина (22,7 мл, 163 ммоль), и смесь перемешивали в течение 30 мин при 0 °С. Добавляли по каплям раствор 3',5'-О-ацетил-5-бром-2'-дезоксидеуридина **1.1.83** [606] (4,30 г, 11,0 ммоль) в сухом CH<sub>3</sub>CN (40 мл). Смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре и концентрировали в вакууме. Полученный оранжевый твердый остаток распределяли между CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 мл) и 5% водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (300 мл). Органический слой промывали водой (2 × 100 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0–1% CH<sub>3</sub>OH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), получая **1.1.84** в виде желтой пены (4,32 г, 9,78 ммоль, 89%). <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ м.д. 9,11 (с, 1H), 8,48 (с, 1H), 8,13 (с, 1H), 6,20 (т, J=6,5 Гц, 1H), 5,23–5,19 (м, 1H), 4,43–4,35 (м, 3H), 2,90–2,84 (м, 1H), 2,25–2,17 (м, 1H), 2,11 (с, 3H), 2,08 (с, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (150 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ м.д. 170,1, 169,9, 155,7, 153,3, 151,9, 148,6, 145,1, 88,2, 86,7, 83,6, 73,4, 63,1, 39,1, 20,7, 20,6. HRMS (ESI) m/z: рассчитано C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 440,0211; найдено 440,0218. MALDI m/z: рассчитано C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 442,0; найдено 442,1.

### **3',5'-О-Ацетил-4-N-(5-(2-бромэтоксифенил)-2-гидроксифенил)-5-бром-2'-дезоксцитидин 1.1.85**

Суспензию **1.1.81** (3,54 г, 13,5 ммоль) и 10% Pd/C (0,15 мг) в CH<sub>3</sub>OH (100 мл) дегазировали и перемешивали в течение ночи в атмосфере водорода. Катализатор отфильтровали, и раствор концентрировали в вакууме и упаривали с CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, получая 2-амино-4-(2-бромэтоксифенол) **1.1.82** в виде коричневого твердого остатка. К суспензии **1.1.82** в сухом CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 мл) в атмосфере азота добавляли **1.1.84** (4,0 г, 9,0 ммоль) и ДИПЭА (2,45 мл, 14 ммоль). Раствор перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0–20% EtOAc в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), получая **1.1.85** в виде бежевой пены (3,92 г, 6,48 ммоль, 72% (относительно **1.1.84**)). <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ м.д. 8,89 (с, 1H), 7,95 (с, 1H), 7,90 (с, 1H), 7,48 (д, J=2,9 Гц, 1H), 6,93 (д, J=8,7 Гц, 1H), 6,60 (дд, J=2,9 Гц, J=8,7 Гц, 1H), 6,26 (дд, J=7,3 Гц, J=6,0 Гц, 1H), 5,23–5,18 (м, 1H), 4,37 (д, J=3,2 Гц, 2H), 4,33–4,30 (м, 1H), 4,15 (т, J=6,1 Гц, 2H), 3,51 (т, J=6,1 Гц, 2H), 2,73–2,70 (м, 1H), 2,17–2,11 (м, 4H), 2,09 (с, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (150 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ м.д. 170,5, 170,3, 157,1, 153,8, 151,8, 142,9, 140,4, 126,3, 118,8, 113,5, 109,4, 89,1, 87,1, 83,0, 74,0, 68,9, 63,8, 39,0, 29,7, 21,0, 21,0. HRMS



(ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{21}H_{22}Br_2N_3O_8^-$   $[M-H]^-$ : 601,9779; найдено 601,9768. MALDI  $m/z$ : рассчитано  $C_{21}H_{24}Br_2N_3O_8^+$   $[M+H]^+$ : 604,0; найдено 604,1.

**4-N-(5-(2-Азидоэтокси)-2-гидроксифенил)-5-бром-2'-дезоксцитидин 1.1.86**

К раствору **1.1.85** (3,64 г, 6,0 ммоль) в сухом ДМФА (25 мл) добавляли  $NaN_3$  (0,52 г, 8 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Смесь распределяли между EtOAc (100 мл) и водой (100 мл). Органический слой промывали водой (50 мл), сушили над  $Na_2SO_4$  и концентрировали в вакууме. Полученное масло растворяли в  $CH_3OH$  (25 мл) и обрабатывали 28% водным раствором  $NH_3$  (5 мл). После выдерживания в течении 12 ч при комнатной температуре смесь концентрировали в вакууме, и неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (5–12%  $CH_3OH$  в  $CH_2Cl_2$ ), получая **1.1.86** в виде коричневого твердого остатка (2,21 г, 4,57 ммоль, 76%).  $^1H$  ЯМР (600 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 9,88 (с, 1H), 8,47 (с, 1H), 8,30 (с, 1H), 8,02 (д,  $J=3,1$  Гц, 1H), 6,84 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 6,63 (дд,  $J=3,1$  Гц,  $J=8,8$  Гц, 1H), 6,10 (т,  $J=6,3$  Гц, 1H), 5,22 (д,  $J=4,4$  Гц, 1H), 5,16 (т,  $J=5,0$  Гц, 1H), 4,26–4,22 (м, 1H), 4,07 (т,  $J=5,0$  Гц, 2H), 3,84–3,82 (м, 1H), 3,69–3,63 (м, 3H), 3,61–3,57 (м, 1H), 2,25–2,20 (м, 1H), 2,11–2,06 (м, 1H).  $^{13}C$  ЯМР (150 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 156,6, 152,9, 150,5, 141,9, 141,6, 126,5, 114,8, 109,5, 108,8, 87,4, 87,4, 85,7, 69,5, 67,0, 60,5, 49,5, 40,7. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{17}H_{18}BrN_6O_6^-$   $[M-H]^-$ : 481,0477; найдено 481,0482. MALDI  $m/z$ : рассчитано  $C_{17}H_{19}BrN_6NaO_6^+$   $[M+Na]^+$ : 505,0; найдено 504,9.

**3-( $\beta$ -D-2-Дезоксирибофуранозил)-8-(2-азидоэтокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.87**

Раствор **1.1.86** (2,00 г, 4,13 ммоль) и ТЭА (40 мл) в абсолютном EtOH (80 мл) перемешивали при 80 °С в течение 72 ч в атмосфере аргона. Реакционную смесь концентрировали, и остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (7–12%  $CH_3OH$  в  $CH_2Cl_2$ ), получая **1.1.87** в виде коричневого твердого остатка (0,85 г, 2,10 ммоль, 51%).  $^1H$  ЯМР (600 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 10,58 (уш с, 1H), 7,54 (с, 1H), 6,74 (д,  $J=8,6$  Гц, 1H), 6,44 (дд,  $J=2,7$  Гц,  $J=8,6$  Гц, 1H), 6,41 (д,  $J=2,7$  Гц, 1H), 6,12 (т,  $J=6,8$  Гц, 1H), 5,19 (д,  $J=4,1$  Гц, 1H), 5,07 (т,  $J=5,1$  Гц, 1H), 4,24–4,19 (м, 1H), 4,07 (т,  $J=4,8$  Гц, 2H), 3,79–3,75 (м, 1H), 3,64–3,52 (м, 2H), 3,60 (т,  $J=4,8$  Гц, 2H), 2,12–1,96 (м, 2H). HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{17}H_{17}N_6O_6^-$   $[M-H]^-$ : 401,1215; найдено 401,1216. MALDI  $m/z$ : рассчитано  $C_{17}H_{18}N_6NaO_6^+$   $[M+Na]^+$ : 425,1; найдено 425,0.

**3-(5'-О-Диметокситритил- $\beta$ -D-2-дезоксирiboфуранозил)-8-(2-азидоэтокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.88**

Соединение **1.1.87** (0,81 г, 2,00 ммоль) упаривали с безводным пиридином (2 × 15 мл), растворяли в безводном пиридине (20 мл), и к полученному в результате раствору добавляли 4,4'-диметокситритилхлорид (0,78 г, 2,2 ммоль). После выдерживания в течение

3 ч при комнатной температуре органический раствор разбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 мл) и промывали 5% водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (50 мл) и соляным раствором (50 мл). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , концентрировали и упаривали с толуолом ( $3 \times 25$  мл). Очистку проводили хроматографией на силикагеле (25–100%  $\text{EtOAc}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с 0,1% ТЭА), получая **1.1.88** в виде желтой пены (1,16 г, 1,65 ммоль, 83%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 10,63 (уш с, 1H), 7,43–6,87 (м, 14H), 6,52 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 6,45 (дд,  $J=8,8$  Гц,  $J=2,9$  Гц, 1H), 6,42 (д,  $J=2,9$  Гц, 1H), 6,11 (т,  $J=6,6$  Гц, 1H), 5,28 (д,  $J=4,5$  Гц, 1H), 4,29–4,25 (м, 1H), 4,07 (т,  $J=4,8$  Гц, 2H), 3,91–3,87 (м, 1H), 3,72 (с, 3H), 3,71 (с, 3H), 3,60 (т,  $J=5,3$  Гц,  $J=4,8$  Гц, 2H), 3,26 (дд,  $J=10,4$  Гц,  $J=5,3$  Гц, 1H), 3,12 (дд,  $J=10,4$  Гц,  $J=2,9$  Гц, 1H), 2,19–2,10 (м, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 157,9, 153,8, 144,5, 136,4, 135,4, 135,2, 131,4, 129,6, 129,5, 128,5, 127,7, 127,5, 126,9, 126,5, 115,0, 113,1, 113,0, 108,3, 85,7, 85,3, 84,7, 70,1, 67,1, 63,5, 54,8, 49,3, 39,8. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{38}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_8^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 703,2522; найдено 703,2546. MALDI  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{NaO}_8^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 727,3; найдено 727,2.

**3-(5'-О-Диметокситритил-β-D-2-дезоксирибофуранозил)-8-(2-трифторацетамидоэтоксид)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.89**

Соединение **1.1.88** (1,06 г, 1,50 ммоль) растворяли в  $\text{EtOAc}$  (40 мл), и к полученному в результате раствору добавляли ТЭА (1,5 мл) с последующим добавлением 10%  $\text{Pd/C}$  (50 мг). Полученную в результате суспензию перемешивали в течение 12 ч в атмосфере водорода. Катализатор отфильтровывали, промывали  $\text{CH}_3\text{OH}$  (30 мл), и фильтрат концентрировали. Промежуточное аминосодержащее соединение растворяли в пиридине (15 мл), охлаждали до 0 °С, и к раствору добавляли по каплям этилтрифторацетат (0,36 мл, 3 ммоль). Раствор перемешивали в течение ночи, концентрировали, и неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (50–100%  $\text{EtOAc}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с 0,1% ТЭА), получая **1.1.89** в виде желтой пены (0,84 г, 1,05 ммоль, 70%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 10,61 (уш с, 1H), 9,62 (т,  $J=5,3$  Гц, 1H), 7,43–6,86 (м, 14H), 6,50 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 6,42 (дд,  $J=2,7$  Гц,  $J=8,8$  Гц, 1H), 6,39 (д,  $J=2,7$  Гц, 1H), 6,11 (т,  $J=6,7$  Гц, 1H), 5,29 (д,  $J=4,3$  Гц, 1H), 4,30–4,24 (м, 1H), 3,99 (т,  $J=5,4$  Гц, 2H), 3,91–3,87 (м, 1H), 3,71 (с, 3H), 3,71 (с, 3H), 3,53 (дт,  $J=5,3$  Гц,  $J=5,4$  Гц, 2H), 3,26 (дд,  $J=10,4$  Гц,  $J=5,3$  Гц, 1H), 3,11 (дд,  $J=10,4$  Гц,  $J=2,5$  Гц, 1H), 2,18–2,12 (м, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 157,9, 156,2, 153,5, 152,9, 145,9, 144,5, 142,2, 136,9, 135,5, 135,2, 129,6, 129,5, 128,2, 127,7, 127,6, 126,5, 123,0, 122,3, 116,8, 115,5, 114,9, 113,1, 113,0, 107,7, 106,9, 85,7, 85,5, 84,9, 70,2, 66,7, 63,5, 54,8, 40,0, 38,5.  $^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ):  $\delta$  м.д. -74,4. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_9^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 773,2440; найдено 773,2433. MALDI  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{40}\text{H}_{37}\text{F}_3\text{N}_4\text{NaO}_9^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 797,2; найдено 797,3.

**3-(3'-О-β-цианоэтил-N,N-диизопропилфосфорамидил-5'-О-диметокситритил-β-D-2-дезоксирибофуранозил)-8-(2-трифторацетамидоэтокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.90**

Соединение **1.1.89** (0,77 г, 1,00 ммоль) упаривали с сухим  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 × 15 мл) и растворяли в смеси сухого  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 мл) и ДИПЭА (0,70 мл, 4,00 ммоль). К раствору при 0 °С в атмосфере аргона добавляли 2-цианоэтилдиизопропилхлорфосфорамидит (0,33 мл, 1,50 ммоль). После выдерживания в течении 30 мин при комнатной температуре реакцию прекращали добавлением  $\text{CH}_3\text{OH}$  (0,5 мл), и органический раствор разбавляли добавлением этилацетата (25 мл). Затем, раствор промывали 5% водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (25 мл) и соляным раствором (25 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :EtOAc:ТЭА 45:45:10, об/об/об), получая **1.1.90** в виде бледно-желтой пены (0,77 г; 0,79 ммоль; 79%).  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ): δ м.д. 150,51, 147,62.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ): δ м.д. 10,64 (уш с, 1H), 9,61 (т,  $J=5,1$  Гц, 1H), 7,44–6,84 (м, 14H), 6,54; 6,51 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 6,47–6,37 (м, 2H), 6,14; 6,11 (т,  $J=6,5$  Гц, 1H), 4,56–4,46 (м, 1H), 4,09–3,95 (м, 1H), 3,99 (т,  $J=5,1$  Гц, 2H), 3,80–3,45 (м, 12H), 3,36–3,14 (м, 2H), 2,76, 2,66 (т,  $J=5,9$  Гц, 2H), 2,38–2,25 (м, 2H), 1,20–0,98 (м, 12H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ): δ м.д. 158,0, 156,1, 153,5, 152,9, 145,8, 144,4, 144,4, 142,2, 136,8, 135,3, 135,1, 129,6, 129,5, 128,2, 127,7, 127,5, 127,5, 126,5, 123,1, 122,3, 118,7, 118,5, 116,7, 115,4, 114,8, 113,0, 113,0, 107,7, 106,9, 85,9, 85,8, 84,8, 84,4, 84,1, 72,9, 72,8, 72,5, 72,4, 67,8, 66,7, 65,3, 63,1, 62,8, 58,2, 58,1, 54,8, 54,7, 44,4, 44,3, 42,5, 42,4, 38,5, 24,2, 24,1, 24,0, 24,0, 22,4, 19,7, 19,6, 19,6.  $^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц,  $\text{DMCO}-d_6$ ): δ м.д. -74,4. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{49}\text{H}_{53}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_{10}\text{P}^-$  [M-H] $^-$ : 973,3518; найдено 973,3496. MALDI  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{49}\text{H}_{54}\text{F}_3\text{N}_6\text{NaO}_{10}\text{P}^+$  [M+Na] $^+$ : 997,4; найдено 997,1.

**4-(3-бромпропокси)-2-нитрофенол 1.1.92**

К раствору 4-(3-бромпропокси)фенола **1.1.91** [487] (12,48 г, 54,0 ммоль) в бензоле (300 мл) при 0 °С добавляли одной порцией 56% водный раствор азотной кислоты (4,6 мл, 54,0 ммоль) при интенсивном перемешивании. После выдерживания в течение 5 минут при 0 °С смесь промывали водой (100 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме до коричневого масла. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (35%  $\text{CHCl}_3$  в гексане) с последующей перекристаллизацией из смеси этилацетат/гексан (1/4, об/об), получая **1.1.92** в виде желтого твердого остатка (7,17 г, 26,0 ммоль, 48%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): δ м.д. 10,31 (с, 1H), 7,53 (д,  $J=3,1$  Гц, 1H), 7,22 (дд,  $J=3,1$  Гц,  $J=9,2$  Гц, 1H), 7,09 (д,  $J=9,2$  Гц, 1H), 4,11 (т,  $J=5,9$  Гц, 2H), 3,59 (т,  $J=6,6$  Гц, 2H), 2,33 (тт,  $J=6,6$  Гц,  $J=5,9$  Гц, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): δ м.д. 151,6, 150,1, 132,9, 127,3,

120,8, 106,8, 66,3, 32,0, 29,4. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_9H_9BrNO_4^-$   $[M-H]^-$ : 273,9720; найдено 273,9713.

**3',5'-О-ацетил-4-*N*-(5-(3-бромпропокси)-2-гидроксифенил)-5-бром-2'-дезоксцитидин**

**1.1.93**

Суспензию **1.1.92** (3,31 г, 12,0 ммоль) и 10% Pd/C (0,12 г) в  $CH_3OH$  (80 мл) перемешивали в течение ночи в атмосфере водорода. Катализатор отфильтровывали, и раствор концентрировали в вакууме, получая промежуточный-2-амино-4-(3-бромпропокси)фенол в виде коричневого твердого остатка. Затем его растворяли в сухом  $CH_2Cl_2$  (80 мл) и добавляли 3',5'-О-ацетил-4-*N*-(1,2,4-триазол-1-ил)-5-бром-2'-дезоксцитидин **1.1.84** (3,54 г, 8,0 ммоль) и ДИПЭА (2,10 мл, 12,0 ммоль) в атмосфере азота. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-1%  $CH_3OH$  в  $CH_2Cl_2$ ), получая **1.1.93** в виде бежевой пены (4,30 г, 6,94 ммоль, 58% (относительно **1.1.92**)).  $^1H$  ЯМР (600 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  м.д. 8,59 (с, 1H), 7,96 (с, 1H), 7,65 (с, 1H), 7,13 (д,  $J=2,8$  Гц, 1H), 6,95 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 6,68 (дд,  $J=2,8$  Гц,  $J=8,8$  Гц, 1H), 6,26 (дд,  $J=6,1$  Гц,  $J=7,1$  Гц, 1H), 5,23-5,19 (м, 1H), 4,39-4,37 (м, 2H), 4,34-4,31 (м, 1H), 4,02 (т,  $J=6,0$  Гц, 2H), 3,56 (т,  $J=6,5$  Гц, 2H), 2,75-2,69 (м, 1H), 2,25 (тт,  $J=6,0$  Гц,  $J=6,5$  Гц, 2H), 2,18-2,09 (м, 7H).  $^{13}C$  ЯМР (150 МГц,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  м.д. 170,3, 170,1, 156,9, 153,0, 152,5, 142,8, 140,5, 126,0, 120,0, 113,5, 109,0, 88,3, 86,9, 82,8, 73,9, 66,1, 63,6, 38,9, 32,3, 30,0, 20,8, 20,8. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{22}H_{24}Br_2N_3O_8^-$   $[M-H]^-$ : 615,9936; найдено 615,9942.

**4-*N*-(5-(3-азидпропокси)-2-гидроксифенил)-5-бром-2'-дезоксцитидин 1.1.94**

К раствору **1.1.93** (4,03 г, 6,5 ммоль) в сухом ДМФА (30 мл) добавляли  $NaN_3$  (0,85 г, 13,0 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Смесь распределяли между EtOAc (100 мл) и водой (100 мл). Органический слой отделяли, промывали водой (2x50 мл), сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученное масло растворяли в  $CH_3OH$  (25 мл) и обрабатывали 28% водным раствором  $NH_3$  (5 мл). Через 12 часов при комнатной температуре смесь концентрировали в вакууме, и неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (4-10%  $CH_3OH$  в  $CH_2Cl_2$ ), получая **1.1.94** в виде коричневой пены (2,39 г, 4,81 ммоль, 74%).  $^1H$  ЯМР (600 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 9,83 (с, 1H), 8,47 (с, 1H), 8,29 (с, 1H), 8,01 (д,  $J=2,9$  Гц, 1H), 6,83 (д,  $J=8,7$  Гц, 1H), 6,60 (дд,  $J=2,9$  Гц,  $J=8,7$  Гц, 1H), 6,11 (т,  $J=6,4$  Гц, 1H), 5,25-5,19 (м, 1H), 5,18-5,12 (м, 1H), 4,27-4,21 (м, 1H), 3,95 (т,  $J=6,1$  Гц, 2H), 3,85-3,81 (м, 1H), 3,70-3,63 (м, 1H), 3,63-3,56 (м, 1H), 3,51 (т,  $J=6,8$  Гц, 2H), 2,26-2,19 (м, 1H), 2,12-2,05 (м, 1H), 1,97 (тт,  $J=6,1$  Гц,  $J=6,8$  Гц, 2H).  $^{13}C$  ЯМР (150 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 156,6, 152,9, 150,9, 141,8, 141,3, 126,5, 114,8, 109,4, 108,6, 87,4, 85,7, 69,5,

64,9, 60,5, 54,7, 47,6, 40,7, 28,1. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{18}H_{20}BrN_6O_6^-$   $[M-H]^-$ : 495,0633; найдено 495,0626.

**3-( $\beta$ -D-2-дезоксирибофуранозил)-8-(3-азидопропокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.95**

Раствор **1.1.94** (2,25 г, 4,52 ммоль) в смеси ТЭА (10 мл) и абсолютного EtOH (70 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 72 часов в атмосфере аргона. Реакционную смесь концентрировали до пены, и остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (6-10%  $CH_3OH$  в  $CH_2Cl_2$ ), получая **1.1.95** в виде коричневой пены (0,79 г, 1,89 ммоль, 42%).  $^1H$  ЯМР (600 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 7,55 (с, 1H), 6,72 (д,  $J=9,1$  Гц, 1H), 6,45-6,39 (м, 2H), 6,12 (т,  $J=6,6$  Гц, 1H), 5,63-4,71 (м, 3H), 4,24-4,19 (м, 1H), 3,92 (т,  $J=6,0$  Гц, 2H), 3,80-3,74 (м, 1H), 3,63-3,52 (м, 2H), 3,47 (т,  $J=6,6$  Гц, 2H), 2,12-2,04 (м, 1H), 2,04-1,97 (м, 1H), 1,93 (тт,  $J=6,0$  Гц,  $J=6,6$  Гц, 2H).  $^{13}C$  ЯМР (150 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 154,2, 153,0, 152,2, 136,1, 128,2, 127,0, 120,9, 115,2, 108,4, 103,8, 87,2, 84,8, 70,2, 64,9, 61,1, 47,6, 39,9, 28,0. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{18}H_{19}N_6O_6^-$   $[M-H]^-$ : 415,1372; найдено 415,1371.

**3-(5'-О-диметокситритил- $\beta$ -D-2-дезоксирибофуранозил)-8-(3-азидопропокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.96**

К раствору **1.1.95** (0,67 г, 1,61 ммоль) в сухом пиридине (20 мл) добавляли 4,4'-диметокситритилхлорид (0,82 г, 2,42 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакцию прекращали добавлением 5% водного раствора  $NaHCO_3$  (50 мл), и органические вещества экстрагировали  $CH_2Cl_2$  (2×40 мл). Объединенные органические слои сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали, концентрировали и упаривали с толуолом (3 × 15 мл). Очистку проводили колоночной хроматографией на силикагеле (25-100% EtOAc в  $CH_2Cl_2$  с 0,1% ТЭА), получая **1.1.96** в виде желтой пены (0,89 г, 1,24 ммоль, 77%).  $^1H$  ЯМР (600 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 10,63 (уш с, 1H), 7,43-7,40 (м, 2H), 7,34-7,26 (м, 7H), 7,23-7,20 (м, 1H), 6,91-6,87 (м, 4H), 6,50 (д,  $J=8,6$  Гц, 1H), 6,42 (дд,  $J=2,9$  Гц,  $J=8,6$  Гц, 1H), 6,40 (д,  $J=2,9$  Гц, 1H), 6,12 (т,  $J=6,6$  Гц, 1H), 5,29 (д,  $J=4,5$  Гц, 1H), 4,30-4,26 (м, 1H), 3,93 (т,  $J=6,1$  Гц, 2H), 3,91-3,88 (м, 1H), 3,71 (с, 3H), 3,70 (с, 3H), 3,48 (т,  $J=6,8$  Гц, 2H), 3,28-3,24 (м, 1H), 3,14-3,11 (м, 1H), 2,19-2,13 (м, 2H), 1,93 (тт,  $J=6,8$  Гц,  $J=6,1$  Гц, 2H).  $^{13}C$  ЯМР (150 МГц,  $DMCO-d_6$ ):  $\delta$  м.д. 157,9, 154,2, 153,1, 152,2, 144,5, 136,1, 135,4, 135,2, 129,6, 129,5, 127,7, 127,5, 127,0, 126,5, 115,0, 113,1, 113,0, 108,3, 85,7, 85,3, 84,7, 70,1, 64,9, 63,5, 54,8, 47,5, 39,9, 27,9. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{39}H_{37}N_6O_8^-$   $[M-H]^-$ : 717,2678; найдено 717,2662.

**3-(5'-О-диметокситритил- $\beta$ -D-2-дезоксирибофуранозил)-8-(3-трифторацетамидопропокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.97**

Соединение **1.1.96** (0,80 г, 1,11 ммоль) растворяли в  $CH_3OH$  (40 мл) и добавляли к раствору ТЭА (2,0 мл) с последующим добавлением 10% Pd/C (30 мг). Полученную в

результате суспензию перемешивали в течение 12 часов в атмосфере водорода и добавляли этилтрифторацетат (0,26 мл, 2,20 ммоль) при 0°C. После перемешивания в течение 1 часа при комнатной температуры катализатор отфильтровывали, промывали CH<sub>3</sub>OH, и фильтрат концентрировали досуха. Остаток растворяли в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 мл) и промывали 5% водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (25 мл) и соляным раствором (25 мл). После концентрирования полученный неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (50-100% EtOAc в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> с 0,1% ТЭА), получая **1.1.97** в виде желтой пены (0,65 г, 0,82 ммоль, 74%). <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ м.д. 10,60 (уш с, 1H), 9,46 (т, *J*=5,4 Гц, 1H), 7,43-7,40 (м, 2H), 7,34-7,27 (м, 7H), 7,23-7,20 (м, 1H), 6,91-6,87 (м, 4H), 6,51 (д, *J*=9,2 Гц, 1H), 6,42-6,39 (м, 2H), 6,12 (т, *J*=6,7 Гц, 1H), 5,29 (д, *J*=4,6 Гц, 1H), 4,30-4,26 (м, 1H), 3,91-3,87 (м, 3H), 3,72 (с, 3H), 3,71 (с, 3H), 3,34 (dt, *J*=6,3 Гц, *J*=5,4 Гц, 2H), 3,28-3,24 (м, 1H), 3,15-3,11 (м, 1H), 2,20-2,12 (м, 2H), 1,90 (тт, *J*=6,3 Гц, *J*=6,1 Гц, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (150 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ м.д. 157,9, 156,4 (кв, *J*=36 Hz), 154,3, 153,1, 152,3, 144,5, 136,0, 135,4, 135,2, 129,6, 129,5, 127,7, 127,6, 127,0, 126,5, 115,9 (кв, *J*=289 Hz), 115,0, 113,1, 113,0, 112,9, 108,3, 85,7, 85,3, 84,7, 70,1, 65,2, 63,5, 54,8, 39,9, 36,3, 27,8. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ м.д. -74,4. HRMS (ESI) *m/z*: рассчитано C<sub>41</sub>H<sub>38</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 787,2596; найдено 787,2552.

**3-(3'-О-β-цианоэтил-N,N-диизопропилфосфорамидил-5'-О-диметокситритил-β-D-2-дезоксирибофуранозил)-8-(3-трифторацетамидопропокси)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.98**

Соединение **1.1.97** (0,62 г, 0,79 ммоль) упаривали с сухим CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 15 мл) и растворяли в сухом CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 мл) с последующим добавлением ДИПЭА (0,28 мл, 1,58 ммоль). К раствору при 0 °C в атмосфере аргона добавляли 2-цианоэтил диизопропилхлорфосфорамидит (0,26 мл, 1,19 ммоль). После перемешивания в течение 1 часа при комнатной температуре реакцию прекращали добавлением CH<sub>3</sub>OH (0,5 мл), и реакционную смесь разбавляли этилацетатом (25 мл). Затем, раствор промывали 5% водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (25 мл) и соляным раствором (25 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc:ТЭА 45:45:10, об/об/об), получая **1.1.98** в виде светло-желтой пены (0,60 г; 0,60 ммоль; 77%). <sup>31</sup>P ЯМР (243 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ м.д. 147,6, 147,2. <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ м.д. 10,55 (уш с, 1H), 9,48 (т, *J*=5,4 Гц, 1H), 7,44-7,37 (м, 2H), 7,34-7,25 (м, 7H), 7,24-7,20 (м, 1H), 6,92-6,84 (м, 4H), 6,54 и 6,51 (д, *J*=8,8 Гц, 1H, диастереомеры), 6,42-6,36 (м, 2H), 6,14 и 6,11 (т, *J*=6,6 Гц, 1H, диастереомеры), 4,54-4,46 (м, 1H), 4,07-4,02 и 4,01-3,97 (м, 1H, диастереомеры), 3,88 (т, *J*=5,9 Гц, 2H), 3,76-3,47 (м, 10H), 3,33 (т, *J*=6,4 Гц, 2H), 3,35-3,25 (м, 1H), 3,23-3,16 (м, 1H), 2,76 и 2,65 (т, *J*=5,9 Гц, 2H, диастереомеры), 2,33-2,36 (м, 2H), 1,89 (тт, *J*=6,5 Гц, *J*=6,1 Гц, 2H), 1,16-1,08 (м, 12H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 158,6, 156,7 (кв,  $J=36$  Hz), 154,9, 145,1, 145,0, 135,9, 135,7, 130,2, 130,1, 128,3, 128,1, 128,1, 127,2, 119,4, 119,2, 116,4 (кв,  $J=289$  Hz), 113,7, 113,6, 86,4, 86,3, 84,9, 73,4, 73,4, 73,0, 72,9, 65,8, 63,7, 63,4, 58,8, 58,8, 58,7, 58,7, 55,4, 43,1, 43,0, 40,3, 36,8, 28,4, 24,8, 24,7, 24,7, 24,6, 24,6, 20,3, 20,2, 20,2.  $^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. -74,4. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{50}\text{H}_{55}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_{10}\text{P}^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 987,3675; найдено 987,3558.

### **2-Амино-4-(фенилдиазенил)фенол 1.1.100**

К перемешиваемому раствору анилина **1.1.99** (0,93 г, 10,0 ммоль) в ТГФ/вода (1:1, об/об, 40 мл) добавляли 12 М водный раствор HCl (2 мл) с последующим добавлением по каплям 1 М водного раствора  $\text{NaNO}_2$  (15 мл) при 0°C. После выдерживания в течении 40 мин при 0°C, добавляли по каплям к реакционной смеси 1,5 М водный раствор  $\text{AcONa}$  (20 мл), с последующим добавлением 0,5 М раствора 2,2,2-трифтор-N-(2-гидроксифенил)ацетамида [607] в ТГФ (20 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, ТГФ отгоняли на роторном испарителе, и образовавшийся темно-коричневый твердый остаток фильтровали и промывали водой (2  $\times$  20 мл). Остаток на фильтре промывали горячей смесью гексан/EtOAc (5:1, об/об, 2  $\times$  30 мл) и сушили в вакууме. Остаток растворяли в  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (30 мл) и добавляли 1 М водный раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (18 мл). Реакционную смесь перемешивали при 70°C в течение 4 часов, pH доводили до 8 добавлением уксусной кислоты и выливали в EtOAc (30 мл) и воду (50 мл). Органический слой отделяли, и продукт дополнительно экстрагировали из водного слоя EtOAc (2  $\times$  30 мл). Объединенные органические слои сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали в вакууме. Очистка колоночной хроматографией на силикагеле (0  $\rightarrow$  4 %  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) давала **1.1.100** в виде коричневого твердого остатка (1,72 г, 8,1 ммоль, 81 %).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 10,01 (уш с, 1H), 7,77 (д,  $J=7,5$  Гц, 2H), 7,54 (т,  $J=7,7$  Гц, 2H), 7,46 (т,  $J=7,3$  Гц, 1H), 7,19 (д,  $J=2,2$  Гц, 1H), 7,14 (дд,  $J=8,2$  Гц,  $J=2,2$  Гц, 1H), 6,83 (д,  $J=8,2$  Гц, 1H), 4,91 (уш с, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 152,2, 148,3, 145,8, 137,4, 129,9, 129,1, 121,8, 117,3, 113,6, 103,7. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 214,0975; найдено 214,0980.

### **3',5'-О-Ацетил-4-N-(2-гидрокси-5-фенилдиазенилфенил)-5-бром-2'-дезокситидин 1.1.102**

К раствору триазилил-замещенного производного **1.1.101** (2,87 г, 6,5 ммоль) в сухом  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (60 мл) в атмосфере азота добавляли замещенный аминафенол **1.1.100** (1,66 г, 7,8 ммоль), и полученную в результате реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Раствор промывали водой (50 мл) и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0–2%  $\text{CH}_3\text{OH}$

в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), получая **1.1.102** в виде оранжевой пены (3,15 г, 5,40 ммоль, 83%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  м.д. 11,19 (уш с, 1H), 8,73 (с, 1H), 8,50 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,83 (д,  $J=7,0$  Гц, 2H), 7,68 (д,  $J=7,7$  Гц, 1H), 7,61-7,54 (м, 2H), 7,55-7,48 (м, 1H), 7,12 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 6,16 (т,  $J=6,7$  Гц, 1H), 5,24-5,18 (м, 1H), 4,34-4,27 (м, 3H), 2,50-2,39 (м, 2H), 2,09 (с, 3H), 2,07 (с, 3H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  м.д. 170,0, 169,9, 157,4, 152,9, 151,9, 151,8, 144,9, 141,8, 130,6, 129,3, 126,3, 122,1, 120,8, 117,2, 115,1, 88,0, 86,2, 81,7, 73,9, 63,5, 36,7, 20,6, 20,5. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{BrN}_5\text{NaO}_7^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$ : 608,0751; найдено 608,0755.

### **3-( $\beta$ -D-2-Дезоксирибофуранозил)-8-фенил diaзенил-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.103**

Раствор **1.1.102** (2,99 г, 5,10 ммоль) и ТЭА (7,2 мл, 10 экв.) в абсолютном  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (100 мл) кипятили с обратным холодильником при перемешивании в течение 72 часов в атмосфере аргона. Затем, добавляли к реакционной смеси 28% водный раствор  $\text{NH}_3$  (10 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, концентрировали в вакууме и упаривали с  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $2 \times 20$  мл). Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0–7%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), получая **1.1.103** в виде коричневого аморфного твердого остатка (0,98 г, 2,34 ммоль, 46 %).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  м.д. 10,81 (уш с, 1H), 7,83 (д,  $J=7,2$  Гц, 2H), 7,67 (уш с, 1H), 7,58 (т,  $J=7,3$  Гц, 2H), 7,54 (т,  $J=7,2$  Гц, 1H), 7,50 (дд,  $J=2,3$  Гц,  $J=8,5$  Гц, 1H), 7,33 (д,  $J=2,3$  Гц, 1H), 7,01 (д,  $J=8,5$  Гц, 1H), 6,13 (т,  $J=6,7$  Гц, 1H), 5,20 (д,  $J=4,2$  Гц, 1H), 5,09 (т,  $J=5,0$  Гц, 1H), 4,25-4,22 (м, 1H), 3,81-3,78 (м, 1H), 3,64-3,31 (м, 2H), 2,13-2,09 (м, 1H), 2,05-2,01 (м, 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  м.д. 152,7, 151,7, 147,9, 145,1, 131,1, 129,3, 126,6, 122,3, 121,7, 115,4, 87,3, 84,9, 70,2, 61,1, 39,4 (перекрывается с  $\text{DMSO}$ ). HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_5^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ : 422,1459; найдено 422,1464.

### **3-(5'-О-Диметокситритил- $\beta$ -D-2-дезоксирибофуранозил)-8-фенил diaзенил-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.104**

Фенил diaзенил-замещенный 1,3-диаза-2-оксофеноксазиновый нуклеозид **1.1.103** (0,89 г, 2,12 ммоль) упаривали с безводным пиридином ( $2 \times 15$  мл), растворяли в безводном пиridине (20 мл), и к полученному в результате раствору добавляли 4,4'-диметокситритилхлорид (0,86 г, 2,54 ммоль). После выдерживания в течение 3 часов при комнатной температуре, реакционную смесь разбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 мл) и промывали 5% водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (50 мл) и соляным раствором (50 мл). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , концентрировали в вакууме и упаривали с толуолом ( $3 \times 30$  мл). Очистку осуществляли колоночной хроматографией на силикагеле (0–3%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с 0,1% ТЭА), получая **1.1.104** в виде коричневой пены (1,36 г, 1,88 ммоль, 89%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  м.д. 10,68 (уш с, 1H), 7,83 (д,  $J=7,2$  Гц, 2H), 7,66 (уш с, 1H), 7,58 (т,  $J=7,3$  Гц, 2H), 7,54 (т,  $J=7,2$  Гц, 1H), 7,50 (дд,  $J=2,3$  Гц,  $J=8,5$  Гц, 1H), 7,33 (д,  $J=2,3$  Гц, 1H),



7,28 (т,  $J=7,4$  Гц, 2H), 7,23-7,18 (м, 3H), 7,10-7,06 (м, 4H), 7,01 (д,  $J=8,5$  Гц, 1H), 6,85-6,82 (м, 4H), 6,13 (т,  $J=6,5$  Гц, 1H), 4,25-4,23 (м, 1H), 3,81-3,78 (м, 1H), 3,73 (с, 6H), 3,64-3,57 (м, 2H), 2,14-2,08 (м, 1H), 2,06-2,00 (м, 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 157,7, 152,7, 151,7, 148,2, 147,9, 145,1, 140,1, 131,1, 129,3, 128,8, 127,5, 127,3, 126,6, 126,3, 125,5, 122,3, 121,7, 115,4, 112,6, 87,3, 84,9, 79,8, 70,2, 61,1, 54,9, 39,4 (перекрывается с ДМСО). HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{42}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{NaO}_7^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 746,2585; найдено 746,2586.

**3-(3'-О-β-цианоэтил-N,N-диизопропилфосфорамидил-5'-О-диметокситритил-β-D-2-дезоксирибофуранозил)-8-фенилдиазенил-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.105**

Соединение **1.1.104** (1,26 г, 1,74 ммоль) упаривали с безводным  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 15$  мл) и растворяли в смеси безводного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 мл) и ДИПЭА (1,29 мл, 6,96 ммоль). К полученному в результате раствору добавляли 2-цианоэтил диизопропилхлорфосфорамидит (0,62 г, 2,61 ммоль) при 0 °С в атмосфере аргона. После выдерживания в течение 1 часа при комнатной температуре, реакцию прекращали добавлением  $\text{CH}_3\text{OH}$  (1,0 мл), реакционную смесь разбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 мл) и промывали 5% водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (40 мл) и затем соляным раствором (40 мл). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0→50% ацетона в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с 1,0 % ТЭА), получая **1.1.105** в виде коричневой пены (1,13 г; 1,22 ммоль; 70%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 10,84 (уш с, 1H), 7,83 (д,  $J=7,5$  Гц, 2H), 7,60-7,53 (м, 3H), 7,51-7,49 (м, 1H), 7,44-7,40 (м, 2H), 7,35-7,27 (м, 8H), 7,26-7,22 (м, 1H), 6,92-6,88 (м, 4H), 6,79 и 6,75 (д,  $J=8,5$  Гц, 1H, диастереомеры), 6,14 и 6,11 (д,  $J=6,6$  Гц, 1H, диастереомеры), 4,58-4,50 (м, 1H), 3,72 и 3,72 (с, 3H, диастереомеры), 3,71 (с, 3H), 3,71-3,62 (м, 2H), 3,59-3,50 (м, 2H), 3,34-3,28 (м, 1H, перекрывается с HDO), 3,25-3,18 (м, 1H), 2,77 и 2,66 (т,  $J=5,9$  Гц, 2H, диастереомеры), 2,53-2,51 (м, 1H), 2,39-2,30 (м, 2H), 1,16-1,00 (м, 12H).  $^{31}\text{P}$  ЯМР (243 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 147,7, 147,3. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{51}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{NaO}_8\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 946,3664; найдено 946,3662.

**1-(2-азидоэтил)-5-бромурацил 1.1.107**

Смесь 1-(2-бромэтил)-5-бромурацила **1.1.106** [563] (2,14 г, 7,2 ммоль) и  $\text{NaN}_3$  (0,56 г, 8,6 ммоль) в ДМФА (20 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем, смесь выливали в воду (30 мл), и продукт экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 20$  мл). Реакционную смесь концентрировали и упаривали с толуолом ( $2 \times 20$  мл). Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-2%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), получая **1.1.107** (1,55 г, 6,00 ммоль, 83 %) в виде грязно-белого твердого остатка.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 11,81 (уш с, 1H), 8,21 (с, 1H), 3,87 (т,  $J=5,8$  Гц, 2H), 3,60 (т,  $J=5,8$  Гц, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР

(150 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 159,4, 150,1, 145,1, 94,6, 48,7, 46,8. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_6H_7BrN_5O_2^+$   $[M+H]^+$ : 259,9778; найдено 259,9783.

### ***3-(2-азидоэтил)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.108***

К суспензии 1,2,4-триазола (1,87 г, 27,0 ммоль) в сухом  $CH_3CN$  (60 мл) добавляли  $POCl_3$  (0,55 мл, 6,0 ммоль) при  $0^\circ C$  с последующим добавлением охлажденного триэтиламина (6,30 мл, 45,0 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 минут при  $0^\circ C$  и добавляли к ней **1.1.107** (0,88 г, 3,0 ммоль). Затем, реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч и концентрировали в вакууме. Остаток распределяли между  $CH_2Cl_2$  (80 мл) и 5% водным раствором  $NaHCO_3$  (80 мл). Органический слой промывали водой ( $2 \times 80$  мл), сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме, получая триазольное промежуточное соединение в виде оранжевого твердого остатка (0,80 г). Остаток растворяли в  $CH_2Cl_2$  (30 мл) и добавляли к нему 2-аминофенол (0,53 г, 4,8 ммоль), с последующим добавлением ДИПЭА (0,84 мл, 4,8 ммоль). После перемешивания в течение ночи при комнатной температуре, органический слой последовательно промывали 2% водным раствором лимонной кислоты (25 мл), 5% водным раствором  $NaHCO_3$  (25 мл) и водой ( $2 \times 25$  мл) и концентрировали в вакууме. Полученную пену растворяли в смеси абсолютного  $C_2H_5OH$  (25 мл) и ТЭА (4,2 мл) и кипятили с обратным холодильником в атмосфере азота в течение 48 часов. После концентрирования в вакууме, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-2%  $CH_3OH$  в  $CH_2Cl_2$ ), получая **1.1.108** (0,15 г, 0,57 ммоль, 19 %) в виде бежевого твердого остатка.  $^1H$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 10,49 (уш с, 1H), 7,43 (с, 1H), 6,89-6,82 (м, 2H), 6,81-6,77 (м, 2H), 3,78 (т,  $J=5,8$  Гц, 2H), 3,58 (т,  $J=5,8$  Гц, 2H).  $^{13}C$  ЯМР (150 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 153,8, 153,3, 142,0, 127,5, 126,9, 126,4, 123,6, 123,5, 116,6, 115,0, 48,8, 47,7. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $C_{12}H_{11}N_6O_2^+$   $[M+H]^+$ : 271,0938; найдено 271,0942.

### ***10-(2-((2-аминоэтил)амино)-2-оксоэтил)-3-(2-азидоэтил)-1,3-диаза-2-оксофеноксазин 1.1.109***

К раствору **1.1.108** (0,12 г, 0,44 ммоль) в  $CH_2Cl_2$  (5 мл) добавляли ДБУ (0,15 мл, 1,00 ммоль) при комнатной температуре. Затем, добавляли одной порцией метил 2-бромацетат (0,84 мл, 0,88 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и затем выливали в 5% водный раствор лимонной кислоты (10 мл). Органические вещества экстрагировали  $CH_2Cl_2$  ( $2 \times 15$  мл), сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученную пену растворяли в  $CH_3OH$  (10 мл) и добавляли этан-1,2-диамин (0,3 мл, 4,4 ммоль). Раствор нагревали при  $50^\circ C$  в течение 48 часов, концентрировали и упаривали с толуолом ( $2 \times 10$  мл) в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-5%  $CH_3OH$  в  $CH_2Cl_2$ ), получая **1.1.109** (0,12

г, 0,32 ммоль, 72 %) в виде бежевого твердого остатка.  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 8,32 (т,  $J=5,3$  Гц, 1H), 7,60 (с, 1H), 6,96-6,92 (м, 2H), 6,89-6,85 (м, 1H), 6,83-6,79 (м, 1H), 4,58 (с, 2H), 3,83 (т,  $J=5,8$  Гц, 2H), 3,61 (т,  $J=5,8$  Гц, 2H), 3,18-3,14 (м, 2H), 2,66 (т,  $J=6,3$  Гц, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 166,3, 153,5, 153,4, 142,4, 128,1, 127,8, 126,3, 123,9, 123,3, 115,1, 114,7, 48,6, 47,7, 43,6, 40,5, 40,2. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_8\text{O}_3^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 371,1575; найдено 371,1579.

#### **2'-дезоксидеокси-7,8-дигидро-8-оксо-1, $N^6$ -этенoadенозин 1.1.112**

К 2'-дезоксидеокси-7,8-дигидро-8-оксоаденозину **1.1.111** (0,54 г, 2,0 ммоль) добавляли водный натрийацетатный буфер г (20 мл), содержащий NaOAc (0,52 г, 6,3 ммоль) и  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (0,78 мл, 13,7 ммоль). К перемешиваемой смеси добавляли 50 % по массе водный раствор хлорацетальдегида (0,8 мл, 5,0 ммоль), и перемешивание продолжали при 25°C в течение 24 часов. Затем, добавляли дополнительное количество 50 % по массе водного раствора хлорацетальдегида (0,8 мл, 5,0 ммоль), и смесь перемешивали при 25°C в течение дополнительных 24 часов и концентрировали в вакууме досуха. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (4-10%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), получая **1.1.112** в виде грязно-белого порошка (0,49 г, 1,67 ммоль, 84%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 12,02 (уш с, 1H), 9,16 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,57 (с, 1H), 6,26 (т,  $J=7,3$  Гц, 1H), 5,20 (д,  $J=4,0$  Гц, 1H), 4,74 (т,  $J=5,7$  Гц, 1H), 4,45-4,41 (м, 1H), 3,82-3,77 (м, 1H), 3,65-3,60 (м, 1H), 3,50-3,45 (м, 1H), 3,12-3,06 (м, 1H), 2,10-2,04 (м, 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 151,9, 134,9, 134,1, 133,8, 132,7, 111,1, 107,7, 87,1, 81,4, 71,1, 62,1, 35,7. HRMS (ESI)  $m/z$ : рассчитано  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_4^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 290,0895; найдено 290,0894.

#### **5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксидеокси-7,8-дигидро-8-оксо-1, $N^6$ -этенoadенозин 1.1.113**

Соединение **1.1.112** (0,45 г, 1,54 ммоль) упаривали с безводным пиридином (2 x 5 мл), растворяли в безводном пиридине (15 мл), и к полученному в результате раствору добавляли 4,4'-диметокситритилхлорид (0,64 г, 1,9 ммоль). После выдерживания в течение 3 часов при комнатной температуре, реакционную смесь разбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 мл) и промывали 5% водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (50 мл) и соляным раствором (50 мл). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , концентрировали и упаривали с толуолом (3 x 25 мл). Очистку осуществляли колоночной хроматографией на силикагеле (0-3%  $\text{CH}_3\text{OH}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с 0,1% ТЭА), получая **1.1.113** в виде желтой пены (0,72 г, 1,22 ммоль, 79%).  $^1\text{H}$  ЯМР (600 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  м.д. 12,01 (уш с, 1H), 8,96 (с, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,57 (с, 1H), 7,36-7,32 (м, 2H), 7,24-7,14 (м, 6H), 7,11-7,07 (м, 1H), 6,80-6,75 (м, 2H), 6,75-6,71 (м, 2H), 6,27 (т,  $J=6,8$  Гц, 1H), 5,24 (д,  $J=4,6$  Гц, 1H), 4,53-4,48 (м, 1H), 3,96-3,91 (м, 1H), 3,68 (с, 3H), 3,64 (с, 3H), 3,24-3,19 (м, 1H), 3,16-3,12 (м, 1H), 3,10-3,04 (м, 1H), 2,17-2,12 (м, 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (150 МГц,

ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ м.д. 157,8, 157,7, 151,9, 144,8, 135,6, 135,6, 134,9 (C6), 133,8, 133,7, 132,6, 129,5, 129,4, 127,6, 127,3, 126,2, 112,8, 112,7, 111,0, 107,8, 85,1, 85,0, 81,0, 70,9, 64,2, 54,8, 54,7, 35,9. HRMS (ESI) m/z: рассчитано C<sub>33</sub>H<sub>30</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 592,2202; найдено 592,2196.

**7,8-дигидро-8-оксо-1,N<sup>6</sup>-этенoadенин-N<sup>9</sup>-β-[2'-дезокси-3'-O-(2-цианоэтил)-N,N-диизопропилфосфорамидит-5'-O-(4,4'-диметокситритил)рибонуклеозид] 1.1.114**

Соединение **1.1.113** (0,65 г, 1,10 ммоль) упаривали с безводным CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 10 мл) и растворяли в безводном CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 мл) и диизопропилэтиламине (0,77 мл, 4,40 ммоль). К раствору добавляли 2-цианоэтилдиизопропилхлорфосфорамидит (0,40 г, 1,70 ммоль) при 0 °C в атмосфере аргона. После перемешивания в течение 30 минут при комнатной температуре, реакцию прекращали добавлением CH<sub>3</sub>OH (0,5 мл), и реакционную смесь разбавляли этилацетатом (25 мл). Затем, реакционную смесь промывали 5% водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (25 мл) и соляным раствором (25 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc:ТЭА 45:45:10, об/об/об), получая **1.1.114** в виде желтой пены (0,71 г, 0,89 ммоль, 81%). <sup>31</sup>P ЯМР (243 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ м.д. 147,5, 146,9. <sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ м.д. 12,03 (уш с, 1H), 9,00 (с, 1H), 8,05 и 8,04 (д, J=1,3 Гц, 1H), 7,58 (д, J=1,3 Гц, 1H), 7,36-7,30 (м, 2H), 7,24-7,13 (м, 6H), 7,12-7,08 (м, 1H), 6,79-6,75 (м, 2H), 6,74-6,70 (м, 2H), 6,31-6,25 (м, 1H), 4,91-4,85 & 4,84-4,78 (м, 1H), 4,09-4,03 (м, 1H), 3,79-3,60 (м, 8H), 3,60-3,47 (м, 2H), 3,28-3,12 (м, 3H), 2,76 и 2,66 (т, J=5,9 Гц, 2H), 2,43-2,37 & 2,37-2,31 (м, 1H), 1,15-1,00 (м, 12H). <sup>13</sup>C ЯМР (150 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>): δ м.д. 157,9, 157,8, 157,8, 151,8, 151,8, 144,7, 144,7, 135,6, 135,5, 135,4, 134,8, 133,8, 133,8, 133,7, 132,5, 132,5, 129,5, 129,5, 129,4, 129,4, 127,6, 127,5, 127,3, 126,3, 118,7, 118,5, 112,8, 112,7, 111,1, 107,9, 107,9, 85,2, 85,2, 83,8 (д, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub>=4,4 Гц), 83,7 (д, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub>=5,8 Гц), 80,8, 80,7, 73,3 (д, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub>=17,6 Гц), 72,5 (д, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub>=16,2 Гц), 63,7, 63,4, 58,4 (д, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub>=18,0 Гц), 58,3 (д, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub>=18,0 Гц), 54,8, 54,8, 54,7, 42,4, 42,4, 35,2, 35,0, 24,2, 24,2, 24,2, 24,1, 24,1, 24,0, 24,0, 19,7 (д, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub>=7,0 Гц), 19,6 (д, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub>=7,0 Гц). HRMS (ESI) m/z: рассчитано C<sub>42</sub>H<sub>47</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>P<sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 792,3280; найдено 792,3278.

*Очистка красителей ТО1-биотин, 1.1.28-1.1.31, 1.1.34, 1.1.35 и гуанидино 1.1.35 с помощью препаративной ВЭЖХ*

Очистку **ТО1-биотин** и **1.1.28-1.1.31** осуществляли на системе Gilson HPLC (насос 331/332 с жидкостным манипулятором GX-271), используя колонку Luna C18(2) (100×21.20 мм, 5 мкм). В качестве элюентов использовали CH<sub>3</sub>CN (с 0,1% ТФУ) и водный 0,1% раствор ТФУ. УФ-регистрацию осуществляли при 210 нм и 280 нм. Красители очищали в линейном градиенте от 20 до 70% CH<sub>3</sub>CN в течение 45 минут при скорости потока 25 мл/мин. Фракции, содержащие целевое соединение, собирали, органический растворитель удаляли в вакууме и лиофилизовали.

Очистку красителей **1.1.34**, **1.1.35** и гуанидино **1.1.35** проводили на препаративном хроматографе PuriFlash 4250 (Interchim, Франция) на колонке VDSherp 100 C18-E 250x20 мм, 5 мкм (VDSherp, Германия). CH<sub>3</sub>CN (с 0,1% ТФУ) и 0,1% водный раствор ТФУ использовали в качестве элюентов. Детекцию красителей в УФ-видимом диапазоне осуществляли при длинах волн 205, 260, 360 и 540 нм. Краситель **1.1.34** очищали изократическим элюированием 50% CH<sub>3</sub>CN в течение 11 минут с последующей 5-минутной промывкой 95% CH<sub>3</sub>CN со скоростью 20 мл/мин. Время удерживания красителя **1.1.34** составило 4 мин. Краситель **1.1.35** очищали изократическим элюированием 35% CH<sub>3</sub>CN в течение 11 минут с последующей 5-минутной промывкой 95% CH<sub>3</sub>CN при скорости 20 мл/мин. Время удерживания красителя **1.1.35** составило 9,2 мин. Для очистки красителя гуанидино **1.1.35** использовался линейный градиент от 20 до 95% CH<sub>3</sub>CN за 17 мин с последующими 5 мин 95% CH<sub>3</sub>CN при скорости потока 20 мл/мин. Время удерживания красителя гуанидино **1.1.35** составило 10,4 мин. Фракции, содержащие целевой краситель, собирали, органический растворитель удаляли в вакууме и лиофилизовали.

*Анализ с помощью ЖХ-МС/МС красителей ТО1-биотин и 1.1.28-1.1.31*

Все эксперименты проводили на ВЭЖХ системе Dionex 3000 UltiMate, сопряженной с масс-спектрометром QExactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием ВЭЖХ колонки Macherey-Nagel Pyramid C18 Nucleodur (2,0×100 мм, 1,8 мкм). Подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в 5% водном растворе CH<sub>3</sub>CN; подвижная фаза Б: 0,1% муравьиная кислота в CH<sub>3</sub>CN. Использовался следующий градиент при скорости потока 0,5 мл/мин: 0-1,0 мин 5% Б, 1,0-10,0 мин 5-95,0% Б, 10,0-12,0 мин 95% Б, 12,0-13,0 мин 95,0-5% Б, 13,0-15,0 мин 5% Б. Вводимый объем составлял 1 мкл. Разрешающая способность составляла 35000 (при m/z=200). Напряжение распыления составляло 4,1 кВ, температура десольватирующего капилляра составляла 350°C. Уровень RF S-Leans составлял 50, а температура источника была установлена на 200°C. Все масс-спектры были получены в режиме Full MS с последующим анализом зависимости данных (DDa) в режиме регистрации положительных ионов. Время удерживания (t<sub>R</sub>) указано в соответствующих частях химических методик, связанных с характеристикой продукта.

*Химический синтез и очистка ОДН*

ОДН, меченные остатками 6-карбоксифлуоресцеина (FAM) и Black Hole Quencher 1 (BHQ1) или цианином 5 (Cy5) и Black Hole Quencher 2 (BHQ2) приобретали у компании Литех (Россия). ОДН, меченные остатками сульфоцианина 3 (sCy3) и сульфоцианина 5 (sCy5), приобретали у компании Genterra (Россия). Все ОДН имели чистоту по ВЭЖХ >95%, и их структуру подтверждали методом ЖХ-МС.

Остальные ОДН синтезировали на ДНК-синтезаторе ABI 3400 (Applied Biosystems, США) или MerMade 6/12 (BioAutomation, Германия) фосфорамидитным методом согласно рекомендациям производителей, используя коммерчески доступные и собственные фосфорамидиты. Защищенные 2'-дезоксирибонуклеозид 3'-фосфорамидиты, Unylinker-CPG (500Å) и S-этилтио-1Н-тетразол были приобретены у ChemGenes (США). Фосфорамидит d-спейсера для введения остатков 1',2'-дидезоксирибозы был приобретен у Glen Research (США). Фосфорамидит FAM-производного (для мечения по 5'-концу ОДН) и модифицирующая смола Alkyne CPG для мечения по 3'-концу были приобретены у Люмипроб (Россия). Фосфорамидит для введения в состав ОДН нуклеотида tC<sup>0</sup> был синтезирован по описанной методике [6]. Фосфорамидиты на основе этиленгликоля, 1,3-пропандиола и 1,4-бутандиола получали по описанным протоколам с небольшими модификациями [608–610]. Олигонуклеотиды отщепляли от носителя и удаляли защитные группы с использованием АМА – 1:1 (по объему) конц. водный аммиак и 40% водн. метиламина в течение 3 ч при комнатной температуре.

Постсинтетическое гуанидинирование проводили согласно литературной методике [17]: ОДН с аминопроизводным феноксазина (10 нмоль) упаривали досуха, затем добавляли 50 мкл 1М 1Н-пиразол-1-карбоксамидина в 1М карбонате натрия и выдерживали смесь в течение 3 часов при комнатной температуре.

Для функционализации ОДН путем постсинтетического азид-алкинового циклоприсоединения по 3'-концу и ацилирования по 5'-концу эфиром N-гидроксисукцинимид (NHS) использовали алкин-модифицированное стекло с контролируемым размером пор и 5'-аминоксеханолфосфорамидит (Люмипроб, Россия) соответственно. 5'-амино-3'-алкин-содержащие ОДН конъюгировали с TAMRA-азидом и FAM-NHS для получения целевых производных. Клик-реакцию проводили согласно описанной методике [611]: алкин-модифицированный олигонуклеотид (2 нмоль) растворяли в 1 М ацетате триэтиламмония (30 мкл). Затем добавляли 20 мкл раствора медного катализатора в 60% ДМСО (15 мМ ТБТА, 13 мМ сульфат меди (II)), затем 4 мкл 10 мМ производного азиды в ДМСО и 140 мкл 80% ДМСО. Раствор дегазировали, и затем добавляли дегазированный раствор аскорбиновой кислоты (0,25 М, 6 мкл). Реакционную смесь оставляли на ночь при комнатной температуре, и олигонуклеотиды осаждали 4% LiClO<sub>4</sub> в ацетоне.

ОДН выделяли хроматографически (чистота не менее 95% по данным ВЭЖХ); структура и чистота подтверждены ЖХ-МС. Раствор упаривали, и аликвоту анализировали с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем. Анализ ВЭЖХ и очистку олигонуклеотидов проводили с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1260

(Agilent, США), оснащенной автосэмплером и коллектором фракций на колонке  $4,6 \times 250$  мм Jupiter C18, 5 мкм (Phenomenex, США); буфер А: 0,05 М ацетат аммония (pH 7), 5% ацетонитрил; буфер В: 0,03 М ацетат аммония, 80% ацетонитрил, pH 7; градиент В: 0→15% (1 объем колонки), 15→50% (10 объемов колонки); скорость потока 1 мл/мин; температура 45 °С. Анализ олигонуклеотидов проводили на основе масс-спектров, полученных с использованием Thermo Scientific LCQ Fleet спектрометра (Thermo Fisher Scientific, США) с системой ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 Thermo Fisher Scientific, США). Прибор ВЭЖХ был оснащен колонкой  $2,1 \times 50$  мм Jupiter C18 (5 мкм, Phenomenex, США); буфер А: 10 мМ диизопропиламин, 15 мМ 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол; буфер В: 10 мМ диизопропиламин, 15 мМ 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол, 80% ацетонитрил. Соли вымывали буфером А (4 объема колонки), а затем 100% буфером В (2 объема колонки) со скоростью потока 0,3 мл/мин; температура 45 °С. Масс-спектральный (МС) анализ олигонуклеотидов проводился в отрицательном режиме (капиллярное напряжение 3500 В, температура 160 °С), и необработанные спектры подвергали деконволюции с использованием программного обеспечения ProMass (ENovatia, США).

### 3.2 Биофизические и биохимические методы

#### *Методы, используемые в разделе 2.1*

##### *Приготовление образцов ОДН*

Перед всеми измерениями образцы ДНК/РНК отжигали в буфере, указанном в тексте обсуждения результатов, т.е. выдерживали при 95°C в течение 5 мин, а затем резко охлаждали на льду (для оцДНК/РНК и внутримолекулярных G4/rG4 и иМ) или медленно охлаждали до комнатной температуры (для ДНК/РНК-дуплексов). В случае РНК использовали деионизированную воду, обработанную диэтилпиروкарбонатом (ДЭПК).

##### *Абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия*

Спектры поглощения и флуоресценции всех соединений, за исключением аналогов хромофора GFP, регистрировали на спектрофотометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания). Спектральные свойства красителей **ТО1-биотин** и **1.1.28-1.1.31** и их комплексов 1:1 с РНК Манго или смесей 1:1 с контрольными РНК или ДНК, а также комплекса 1:4 красителя **DFHBI** с РНК Брокколи регистрировали с использованием 5 мкМ растворов красителей. Для регистрации флуоресценции свободных красителей анализировали 50 мкМ растворы красителей, ИФ нормировали на 5 мкМ концентрацию для сравнения с комплексами краситель–РНК. Комплексы красителя **1.1.29** с РНК, полученными методом *in vitro* транскрипции, охарактеризовали с использованием 1 мкМ растворов. Фотофизические свойства аналогов хромофора GFP в несвязанном состоянии исследовали с использованием 5 мкМ растворов в воде при комнатной температуре на спектрофотометре Varian Cary 100 (Agilent Technologies, США) и флуоресцентном спектрофотометре Agilent Cary Eclipse 100 (Agilent Technologies, США). Все измерения проводили в трех повторах, спектры усреднялись.

Для первичного и вторичного скрининга библиотеки аналогов хромофора GFP изменение их ИФ при смешении с ОДН (5 мкМ, 1:1) изучали с помощью планшетного ридера Tecan Infinite 200 Pro M Nano (Tecan Group Ltd., Швейцария). Увеличение ИФ определяли как отношение ИФ раствора флуорофора в смеси с ОДН к ИФ раствора свободного флуорофора при возбуждении на длинах волн 380, 430, 480, 530 и 580 нм. Эксперименты проводили в трех повторах (вторичный скрининг) для лидерных красителей (**Таблица 2.1.6**) и в одном повторе (первичный скрининг) для остальных флуорофоров (данные не приведены).

Кривые плавления 5',3'-меченных ОДН регистрировали с использованием термоциклера QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) с отслеживанием изменения флуоресценции при поэтапном нагревании образцов до 90°C с со средней скоростью



нагрева 1,5°C/мин. Температуру плавления ( $T_{пл}$ ) определяли по максимумам первых производных кривых плавления. Влияние красителей **1.1.3-1.1.7** на термическую стабильность G4 оценивали как  $\Delta T_{пл} = T_{пл}(G4+лиганд) - T_{пл}(без\ лиганда)$  для G4 с сопоставимыми значениями  $T_{пл}$  (без лиганда). Для оценки селективности все эксперименты по плавлению повторяли в присутствии немеченой ДНК-шпильки (G4:шпилька = 1:3).

Квантовый выход флуоресценции ( $\Phi^F$ ) всех комплексов соединений с ДНК/РНК определяли сравнительным методом и рассчитывали согласно следующему уравнению (3):

$$\Phi^F = \Phi_r^F * \frac{1-10^{-Ar}}{1-10^{-A}} * \frac{F}{F_r} * \frac{n^2}{n_r^2} \quad (3)$$

где  $\Phi_r^F$  — квантовый выход эталона, A — оптическая плотность соединения при длине волны возбуждения, F — площадь под пиком эмиссии, n — показатель преломления растворителя. Индекс r обозначает соответствующее значение эталона.

В качестве эталона для комплексов краситель **1.1.6**-ДНК при возбуждении в 415 и 438 нм использовали комплекс ThT-22AG, и родамин 6G использовали в качестве эталона для комплексов краситель **1.1.6**-ДНК при возбуждении в 493 нм. В качестве эталона для комплексов краситель (**ТО1-биотин** и **1.1.28-1.1.31**)-РНК использовали квантовый выход флуоресценции эталонного красителя родамин 6G (R6G) в этаноле ( $\Phi_r^F = 0,95$ )

#### *КД-Спектроскопия и эксперименты по КД- и УФ-плавлению*

КД-спектры и кривые плавления ОДН регистрировали на спектрофотометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания), оснащенном термостатируемым держателем кювет. Кварцевые кюветы с оптическим путем 1 см использовали как для измерения КД, так и для измерения оптической плотности. В экспериментах по КД-плавлению или плавлению по изменению поглощения регистрировали значения КД/поглощения каждый 1°C в диапазоне 5–95°C. Скорость нагрева составляла 1°C/мин. Температуру плавления определяли по максимумам первых производных кривых плавления.

Молярный КД рассчитывали согласно следующему уравнению (4):

$$\Delta \epsilon = \frac{\Theta}{3.3 * 10^4 * C * l} \quad (4)$$

где  $\Theta$  — эллиптичность (мград), C — концентрация ОН (М), l — длина оптического пути (см).

#### *Тесты на связывание*

Красители **1.1.3-1.1.7** (0,5 мМ в рабочем буфере) титровали предварительно отожженными ОДН G4 и определяли изменение ИФ в специфичных для G4 максимумах эмиссии при возбуждении при 460 нм (**1.1.3** и **1.1.4**), 493 нм (**1.1.5**) или 438 нм (**1.1.6**)

(максимумы эмиссии указаны в **Таблице 2.1.2**). Зависимость нормированной ИФ от концентрации ОДН аппроксимировали уравнением (5) для оценки констант диссоциации ( $K_d$ ) комплексов G4-краситель:

$$\text{ИФ}/\text{ИФ}_{\text{макс}} = \frac{[\text{ОДН}]}{K_D + [\text{ОДН}]} \quad (5)$$

где  $[\text{ОДН}]$  – концентрация несвязанного ОДН. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Origin 8.1.

В аналогичных тестах для проверки селективности краситель **1.1.6** смешивали в соотношении 1:1 с предварительно отожденным G4 или дцДНК (конечные концентрации составляли 1 мкМ в 20 мМ Трис-HCl буфере, pH 7,8, 100 мМ KCl) и возрастающими концентрациями дцДНК или G4 соответственно. Изменения ИФ красителя **1.1.6** при 540 нм регистрировались при возбуждении при 415 или 487 нм.

Для предварительной оценки констант связывания красителя **1.1.29-Манго** 10 нМ раствор красителя **1.1.29** в рабочем буфере с добавлением 0,05% Твин-20 титровали возрастающими концентрациями РНК Манго и регистрировали интегральную флуоресценцию в микрокапиллярах с помощью прибора Monolith NT.115 (NanoTemper, Германия), оснащенного детектором для регистрации сигнала в красном/зеленом канале, в режиме регистрации флуоресценции в красном канале при 25 °С. Нормализованную флуоресценцию анализировали с использованием программного обеспечения MO. Affinity Analysis (NanoTemper, Германия), и значения  $K_D$  получали путем аппроксимации экспериментальных данных следующим уравнением (6):

$$\frac{\Delta F}{\Delta F_{\text{макс}}} = \frac{[\text{краситель}] + [\text{РНК}] + K_D - \sqrt{([\text{краситель}] + [\text{РНК}] + K_D)^2 - 4 * [\text{краситель}] * [\text{РНК}]}}{2 * [\text{краситель}]} \quad (6)$$

где  $[\text{краситель}]$  и  $[\text{РНК}]$  представляют собой общие (в комплексе и в свободном состоянии) концентрации красителя **1.1.29** и РНК Манго соответственно.

#### *Вытеснение флуоресцентного интеркалятора*

Предварительно отожденные G4 в 20 мМ Трис-HCl буфере, pH 7,8, 100 мМ KCl смешивали с 2 эквивалентами красителя **1.1.6** или ТО (конечные концентрации: 0,25 мкМ G4 и 0,5 мкМ красителя **1.1.6** или ТО). Добавляли возрастающие концентрации пиридостатина, берберина, гесперидина или даидзеина и регистрировали изменения ИФ красителя **1.1.6** в максимуме эмиссии (540 нм) при возбуждении при 415 нм или 493 нм (максимумы поглощения в комплексах с G4). ИФ ТО в максимуме эмиссии (520 нм) регистрировали при возбуждении при длине волны 493 нм. Поскольку флуоресценция ТО и красителя **1.1.6** в свободном состоянии незначительна, для оценки  $DC_{50}$  долю

вытесненного красителя оценивали как  $\Delta\text{ИФ}/\text{ИФ}_{\text{макс}}$ . Пиридогистин, берберин, гесперидин и даидзеин приобретали у компании Sigma-Aldrich (США).

*Анализ жизнеспособности клеток на мышинных макрофагах (клеточная культура RAW 264.7, ATCC® TIB-71™)*

Двукратные разведения красителей **ТО1-биотин** и **1.1.28-1.1.31** и ДМСО в качестве отрицательного контроля готовили на культуральной среде (ФГБНУ «ФНЦ НИЦ ИБП РАН им. Чумакова», Россия). Суспензии клеток добавляли в лунки с разведением соединений или контролем ДМСО ( $\sim 2 \times 10^4$  клеток/лунка). Конечная серия концентраций из восьми разведений начиналась с 50 мкМ. Клетки инкубировали при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 24 часов и 7 дней. Для оценки жизнеспособности клеток культуральную среду заменяли раствором резазурина (25 мг/мл) и клетки инкубировали при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 4 ч. Затем для остановки реакции добавляли 20 мл 10% додецилсульфата натрия и измеряли флуоресценцию с помощью системы визуализации Promega GloMax при длине волны 525 нм и длине волны 580–640 нм. В качестве дополнительного контроля использовали ту же серию клеток, обработанную соединениями или разведениями ДМСО, но без раствора резазурина для вычета фоновой флуоресценции; среду с раствором резазурина использовали для установления минимального значения невозстановленного резазурина. Все экспериментальные процедуры проводились в двух биологических и трех технических повторах. Был проведен статистический анализ, построены кривые флуоресценции с использованием MS Excel 2013 и рассчитана 50%-ная цитотоксическая концентрация (CC<sub>50</sub>) (концентрация соединения, необходимая для индукции цитопатического эффекта в 50% клеток в монослое).

*Анализ цитотоксичности на M. Smegmatis*

Цитотоксическое действие красителя **1.1.29** на бактерии оценивали по изменению мутности суспензии MSmeg в присутствии красителя в различных концентрациях [612]. Предварительно культивированный штамм MSmeg, несущий пустой вектор pAMYC [613], разводили в соотношении 1:100 свежей средой Лурия-Бертани (ЛБ), содержащей хлорамфеникол (34 г/мл), Твин 80 (0,05%) и краситель **1.1.29** в концентрации 400 нМ, 1 мкМ или без красителя (положительный контроль), и выращивали при 37°C при встряхивании со скоростью 200 об/мин. Затем измеряли оптическую плотность культуры (OD<sub>600</sub>) до стационарной фазы роста (**Рисунок 2.1.10Б**).

*Транскрипция in vitro*

Модульную РНК ds\_Mango II\_MTS1338, метку ds\_Mango II и аптамер Брокколи синтезировали с использованием системы для быстрого крупномасштабного синтеза РНК

T7 RiboMAX™ в соответствии с рекомендациями производителя (Promega, США). ДНК-матрицы для синтеза РНК получали методом ПЦР с использованием соответствующих новых и описанных экспрессирующих плазмид [358], и олигонуклеотидных праймеров T7MngII F/1338 R, T7MngII F/MngII R, T7Broc F/Broc R (**Таблица 2.1.10**).

#### *Бактериальные штаммы и условия роста*

*Mycobacterium smegmatis* mc(2)155 (MSmeg), полученную из бактериальной коллекции Института биохимии Баха (НИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия), предварительно культивировали в течение 24 ч при 37°C на орбитальном шейкере (200 об/мин) в 40 мл среды ЛБ, дополненной 0,05% Твин-80 (для предотвращения слипания клеток), и использовали в качестве инокулятов для дальнейших экспериментов. Рекомбинантные штаммы MSmeg выращивали в среде ЛБ с добавлением 34 г/мл хлорамфеникола.

#### *Создание рекомбинантных штаммов MSmeg*

Плазмиды, экспрессирующие модульную РНК ds\_Mango II\_MTS1338 или метку ds\_Mango II, были сконструированы путем встраивания синтезированных коммерческих ДНК-фрагментов ds\_Mango II MTS1338 и ds\_Mango II (Евроген, Россия) по сайту HindIII рАМУС (Cm<sup>r</sup>), между микобактериальным промотором *rrnB* MSmeg и терминатором *rrnB*-T1 [363]. Последовательности генетических конструкций приведены в **Таблице 2.1.10**. Плазмиды амплифицировали в *Escherichia coli* DH5, выращенной в бульоне ЛБ и агаре ЛБ с добавлением хлорамфеникола (34 г/мл). Клетки MSmeg трансформировали методом электропорации сконструированными плазмидами и пустым вектором рАМУС (отрицательный контроль), и рекомбинантные штаммы отбирали на агаре ЛБ, содержащем 34 г/мл хлорамфеникола.

#### *Получение макрофагов, инфицированных экспрессирующими ds\_Mango II MTS1338 и ds\_Mango II MSmeg, и визуализация ds\_Mango II MTS1338/ds\_Mango II методом конфокальной микроскопии*

Рекомбинантные штаммы MSmeg выращивали до логарифмической фазы роста (OD<sub>600</sub> 0,8). Клетки осаждали центрифугированием при 3000×g в течение 15 минут, дважды промывали PBS и либо инкубировали в течение 30 минут в буфере для визуализации (10 mM Трис-HCl, pH 7,5, 140 mM KCl, 300 нМ Хехст 33258, 400 нМ красителя), либо ресуспендировали в среде RPMI-1640 (Gibco Europe, Великобритания) для заражения макрофагов. *M. smegmatis*, трансформированную рАМУС без вставки, использовали в качестве штамма отрицательного контроля. Для заражения клетки RAW 264.7, культивированные в RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) (Gibco), высевали в ту же среду на покровные стекла (покровные стекла Menzel Glaser

размером  $18 \times 18$  мм, Thermo Fisher Scientific, США), помещенные в 6-луночные культуральные планшеты (Costar, США). Через 24 часа клетки ( $5 \times 10^4$  клеток/стекло) инфицировали штаммами ds\_Mango II\_MTS1338, ds\_Mango II или pAMYC при множественности заражения (MOI) 10:1 в течение 1 часа. Через 1 час после заражения среду удаляли, инфицированные макрофаги трижды промывали PBS и инкубировали в течение 30 минут в буфере для визуализации. Затем образцы анализировали с помощью конфокального микроскопа Eclipse TE2000 (Nikon, Япония). Конструкции ds\_Mango II\_MTS1338 и ds\_Mango II в микобактериях отслеживали в зеленом канале (возб. 488/эм. 590 нм) для красителя **TO1-биотин** и в красном канале (возб. 543/эм. 650 нм) для красителя **1.1.29**, тогда как ядра клеток, окрашенные Хехст 33258, визуализировались в синем канале (возб. 408/эм. 515 нм). Поскольку флуоресцентный сигнал от комплексов модульной РНК с красителем был четко виден после 30 мин инкубации в буфере для визуализации, этого времени было достаточно для того, чтобы краситель диффундировал в макрофаги и фагоцитируемые бактерии и взаимодействовал с РНК-аптамером. Таким образом, время отклика системы составляет <30 мин. Флуоресцентный сигнал от комплексов модульной РНК с красителем детектируется в течение не менее 2–3 ч, что позволяет предположить, что РНК метка и краситель относительно стабильны в клеточной среде.

*Методы, используемые в разделе 2.2*

*Ферментативный синтез РНК-псевдоузла*

Чтобы выбрать оптимальные сайты-мишени в ПУ SARS-CoV-2, гомологию между фрагментами ПУ и фрагментами РНК хозяина (человека) анализировали с использованием программного пакета NCBI blast и базы данных РНК RefSeq. Ожидаемую стабильность предполагаемых дуплексов ПУ-АС ОН (200 нМ) при ионной силе физиологического раствора (150 мМ) рассчитывали с помощью ТМ-калькулятора Р. Пенчовского [614].

дцДНК матрицы, содержащие Т7 промотор, для РНК дикого типа (ПУ) и мутантной РНК (мПУ) SARS-CoV-2 были получены из коротких синтетических ОН pk1-3 в 2 этапа ПЦР:

pk1: TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTTTAAACGGGTTTGCGGTG-TAAGTGCAGCN (ПУ, N=C; мПУ, N = G);

pk2: CGTCTTACACCGTGCGGCACAGGCACTAGTACTGATGTCGTATACANNNTTTTGAT (ПУ, NNNN = GGGC; мПУ, NNNN =CACG);

pk3: GCACGGTGTAAGACGGGCTGCACTTACACC;

прямой праймер: TAATACGACTCACTATAGGGAG;

обратный праймер: ATCAAAGCCCTGTATACGAC.

На первом этапе pk2 кинировали полинуклеотидкиназой T4 (New England Biolabs, США); далее проводили ПЦР с pk1, кинированным p2 и pk3, используя полимеразу PfuSE (Евроген, Россия). В результате получали матрицу для ПЦР второго этапа, которую проводили с использованием полимеразы Taq (Евроген, Россия).

|  |      |            |       |     |
|--|------|------------|-------|-----|
| Смысловая  | цепь | полученной | дцДНК | ПУ: |
| <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTTTAAACGGGTTTGCGGTGTAAGTG-</u>                              |      |            |       |     |
| CAGCCCGTCTTACACCGTGCGGCACAGGCACTAGTACTGATGTCGTATACAGGGCTTTTGAT (промотор Т7 подчеркнут); |      |            |       |     |

|   |      |            |       |      |
|---|------|------------|-------|------|
| Смысловая   | цепь | полученной | дцДНК | мПУ: |
| <u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTTTAAACGGGTTTGCGGTGTAAGTG-</u>                               |      |            |       |      |
| CAGCGCGTCTTACACCGTGCGGCACAGGCACTAGTACTGATGTCGTATACACACGTTTTTGAT (промотор Т7 подчеркнут). |      |            |       |      |

Для получения РНК ПУ и мПУ, 2-3 мкг ДНК использовали для транскрипции *in vitro* с помощью набора HiScribe™ Т7 в соответствии с протоколом производителя. Реакционную смесь обрабатывали ДНКазой I, не содержащей РНКазы, и РНК ПУ/мПУ осаждали из холодного этанола.

*Эксперименты по FRET-плавлению и КД-спектроскопия*

КД-эксперименты проводили на спектрофотометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания) с кварцевой кюветой с оптическим путем 1 см. Перед проведением тестов с FRET-плавлением для 1,3-диаза-2-оксофеноксазиновых производных, вторичные структуры меченых ОДН были подтверждены методом КД-спектроскопии. Для КД-спектроскопии раствор ОДН (3,5 мкМ) нагревали до 95°C и быстро охлаждали на льду для облегчения внутримолекулярного сворачивания перед всеми измерениями. Эллиптичность регистрировали с шагом 1 нм, время накопления сигнала в каждой точке составляло 0,5 с, ширина полосы пропускания – 1 нм. Каждый спектр был получен путем усреднения двух сканирований с последующим вычитанием базовой линии и сглаживанием с использованием метода скользящего среднего с окном 3.

Эксперименты с FRET-плавлением для 1,3-диаза-2-оксофеноксазиновых производных проводили с использованием предварительно отоженных растворов ОДН, меченных 6-карбоксифлуоресцеином (FAM) и Black Hole Quencher 1 (BHQ1) на 5'- и 3'-концах соответственно при концентрации 0,5 мкМ или смесей ОДН-лиганд 1:20. Кривые плавления получали с помощью термоциклера QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США). Изменения флуоресценции FAM при 520 нм регистрировали каждые 0,3°C при ступенчатом нагревании образцов со средней скоростью 1,5°C/мин. Температуру плавления определяли по максимумам первых производных кривых плавления. Для анализа концентрационной зависимости эксперименты по FRET-плавлению повторяли со смесями ОДН:лиганд 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 и 1:20 в буфере 1 (концентрация ОДН составляла 1 мкМ).

Эксперименты с FRET-плавлением для лигандов-аналогов хромофора GFP проводили с использованием предварительно отоженных растворов ОДН, меченных 6-карбоксифлуоресцеином (FAM) и 6-карбокситетраметилродамином (TAMRA) на 5'- и 3'-концах соответственно (0,5 мкМ) или смесей ОДН-лиганд 1:50. Для экспериментов по титрованию использовали молярные соотношения 20:1 и 2:1. Образцы анализировали с помощью системы qPCR DTprime (ДНК-Технологии, Россия). Флуоресценцию FAM на длине волны 520 нм регистрировали при возбуждении на длине волны 495 нм в диапазоне температур 30–95 °C с градиентом 1°C/мин.  $T_{пл}$  определяли с использованием программного обеспечения прибора и рассчитывали  $\Delta T_{пл}$  относительно ОДН  $T_{пл}$  в буферном растворе, содержащем 0,25% (об./об.) ДМСО. Первичный и вторичный скрининг проводили в одном и трех повторах соответственно.

Возможное влияние лигандов **1.1.45**, **1.1.46** и **1.1.49-1.1.53** на вторичные структуры ОДН было проверено в серии экспериментов по титрованию. Каждый лиганд добавляли к предварительно отоженному раствору ОДН при концентрации 2 мкМ до конечной

концентрации 0,5-6 мкМ и отслеживали КД-изменения в специфичных для G4 максимумах (265 или 295 нм). Эксперименты по КД-плавлению проводили для дополнения и проверки данных по FRET-плавлению. Растворы ОДН (2 мкМ) или смеси лиганд:ОДН 1:1/2:1 нагревали или охлаждали со скоростью 1°C/мин в диапазоне 15-95 °C и регистрировали КД-амплитуду при специфических для G4/дуплекса максимумах. Температуру плавления/отжига оценивали по первым производным кривых плавления. КД-спектры и кривые КД-плавления/отжига регистрировали на спектрофотометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания).

Для анализа селективности в случае с-Мус были изменены буферные условия, чтобы отрегулировать его термическую стабильность в отсутствие лигандов. Меченые ОДН, образующие G4, смешивали с предварительно отоженной немеченной шпилькой HAIIR или ds26 (концентрации G4 и шпильки: 0,5 мкМ и 10 мкМ соответственно), что давало соотношение G4:шпилька 1:20; затем добавляли лиганд до конечной концентрации 10 мкМ и повторяли все эксперименты по плавлению. Контрольные лиганды для анализа FRET-плавления: N-метилмезопорфирин IX (NMM), BRACO-19 и PDS были приобретены у Sigma-Aldrich (США).

Для проверки вторичной структуры РНК ПУ и мПУ соответствующие растворы с концентрацией 1 мкМ быстро (нагревали до 90°C и затем резко охлаждали на льду) или медленно (нагревали до 90°C и затем постепенно охлаждается до комнатной температуры) отжигали и регистрировали КД-спектры при комнатной температуре. Эксперименты по плавлению/отжигу также проводили с использованием спектрофотометра Chirascan со скоростью нагрева/охлаждения 1°C/мин.

Для тестов с титрованием и отслеживанием изменений в КД-спектрах АС ОН, нацеленные на ПУ, добавляли к раствору 1 мкМ ПУ до конечной концентрации 0-1,5 мкМ. Результаты КД-спектроскопии чистых АС ОН, а именно значения молярной эллиптичности при 260 и 272 нм, использовали для расчета теоретических КД-амплитуд несвязанных смесей АС ОН-ПУ.

#### *Тест с применением микромасштабного термофореза (МСТ)*

Предварительно отоженный раствор HEX-22AG (HEX-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG) при концентрации 100 нМ в буфере 1 (20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,4 и 10 мМ KCl) смешивали 1:1 с 0-20 мкМ растворами лигандов **1.1.40**, **1.1.42** и **1.1.44** в буфере 1, дополненном 5% ДМСО, смеси инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин перед МСТ измерениями. Кривые МСТ регистрировали с использованием Monolith NT.115 (Германия) и стандартных капилляров



(NanoTemper, Германия) при 22°C с отслеживанием флуоресценции HEX в зеленом канале флуоресценции. Зависимость нормированной флуоресценции HEX после термодиффузии от концентрации лиганда анализировали с помощью программы MO.Affinity Analysis (NanoTemper, Германия). Для получения значений констант диссоциации экспериментальные данные были аппроксимированы моделью Хилла.

#### *Тест на вытеснение флуоресцентного интеркалятора (ВФИ)*

Для оценки сродства лигандов к G4-образующим ОДН были проведены тест на ВФИ с известным интеркалятором - тиазоловым оранжевым (ТО). Перед ВФИ экспериментами были измерены поглощение и флуоресценцию лигандов **1.1.45**, **1.1.46** и **1.1.49-1.1.53**, чтобы убедиться, что они не перекрываются с флуоресценцией ТО. Спектры эмиссии флуоресценции регистрировали при возбуждении при максимуме поглощения (360 нм), а спектры возбуждения флуоресценции регистрировали при максимуме эмиссии (460 нм). Для ВФИ анализов предварительно отоженные G4-образующие ОДН (22AG или 22СТА) смешивали с 2 экв. ТО до конечной концентрации G4 0,25 мкМ и конечной концентрации ТО 0,5 мкМ. Затем добавляли возрастающие концентрации лигандов **1.1.45**, **1.1.46** и **1.1.49-1.1.53** и отслеживали изменения эмиссии флуоресценции ТО при 540 нм при возбуждении в 493 нм. Поскольку свободная флуоресценция ТО была незначительной, и спектры 1,3-диаза-2-оксофеноксазиновых производных не перекрывались с ТО, долю комплекса ТО-G4 рассчитывали как нормированную ИФ при 540 нм ( $\text{ИФ} / \text{ИФ}_{\text{ТО}}^{\text{макс}}$ ). Для получения значений константы вытеснения ( $K_D$ ) экспериментальные данные были аппроксимированы уравнением (7)

$$\text{ТО} * \text{доля G4} = 1 - \frac{\text{ИФ}_{\text{ТО}}^{\text{мин}}}{\text{ИФ}_{\text{ТО}}^{\text{макс}}} * \frac{C_{\text{лиг.}} + C_{\text{мишень}} + K - \sqrt{(C_{\text{лиг.}} + C_{\text{мишень}} + K)^2 - 4 * C_{\text{лиг.}} * C_{\text{мишень.}}}}{2 * C_{\text{мишень.}}} \quad (7)$$

где  $C_{\text{лиг.}}$  и  $C_{\text{мишень}}$  представляют собой суммарные концентрации лиганда, вытесняющего ТО, и комплекса ТО-G4 соответственно. Все измерения флуоресценции проводили с использованием спектрофотометра Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания).

#### *Тест на изменение электрофоретической подвижности (ТИЭП)*

Для ТИЭП растворы РНК при конечной концентрации 0,5 мкМ смешивали с АС ОН (конечные концентрации: 0–5 мкМ), инкубировали в течение 15 минут и анализировали подвижность РНК в 10% неденатурирующем полиакриламидном геле. Гель элюировали стандартным буфером 1×TBE и окрашивали SYBR Green II. Относительные интенсивности полос, соответствующих свернутому и развернутому ПУ, измеряли с помощью программного обеспечения ImageJ и использовали для оценки значений  $K_d$  путем аппроксимации экспериментальной зависимости фракции свернутого ПУ от концентрации

АС ОН уравнением (5), где вместо отношения ИФ/ИФ<sub>макс</sub> использовали долю свернутого ПУ. Для каждого АС ОН выполняли не менее 2 повторов.

#### *ЯМР-эксперименты*

ЯМР-спектры LTR-III G4 и его комплексов с лигандами **1.1.54** и **1.1.70** регистрировали на спектрометре Bruker Avance III 800 МГц (Бремен, Германия), оснащенном криодатчиком, с титрованием 50 мкМ образцов LTR-III (70 мМ KCl, 20 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,0) 2 мМ лигандами **1.1.54** и **1.1.70**, растворенными в ДМСО. 1D <sup>1</sup>H ЯМР-спектры использовали для отслеживания изменений во время титрования. <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC- и HMBSC-спектры при 35 °С использовали для переноса отнесения сигналов H6/C6 и H8/C8 из ранее полученного отнесения [334]. Чтобы идентифицировать остатки LTR-III, на которые больше всего влияет добавление лиганда **1.1.54**, сравнивали интенсивности кросс-пиков в спектрах <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, измеренных с добавленным лигандом и без него. Интенсивность перекрестных пиков H6/C6 и H8/C8 оценивали при молярном отношении LTR-III к лиганду **1.1.54** 5:1 (35°С, 0,5 мМ LTR-III G4).

#### *Клетки и вирусы*

Линии клеток человека VA13, A549', MCF7, HEK293T и HepG2 поддерживали в среде DMEM/F-12, содержащей 10% ФБС, 50 ед/мл пенициллина и 0,05 мг/мл стрептомицина (Thermo Fisher, США) при 37°С в 5% CO<sub>2</sub>. VA13 представляет собой сублинию WI38 2RA, immortalized фибробластов легких, A549' представляет собой быстрорастущую сублинию клеточной линии аденокарциномы A549, HEK293T является производным линии клеток эмбриональной почки человека, HepG2 представляет собой линию клеток рака печени человека. Культуры клеток генотипировали с помощью STR и тестировали на отсутствие микоплазмы. Линию клеток Т-клеточного лейкоза человека (MT4) поддерживали в среде RPMI-1640 (ФГАНУ "ФНЦИРИП ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН", ИНСТИТУТ ПОЛИОМИЕЛИТА, Россия) с 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС, Invitrogen, Южная Америка), L-глутамином и гентамицином. Линию клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero) поддерживали в среде 2 × Eagle MEM (ФГАНУ "ФНЦИРИП ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН", ИНСТИТУТ ПОЛИОМИЕЛИТА, Россия) с 5% ФБС с L-глутамином, пенициллином и стрептомицином. Клеточные культуры инкубировали в присутствии 5% CO<sub>2</sub> при 37°С. Штамм NL4-3 ВИЧ-1 был получен путем трансфекции клеток рNL4-33 (ARP2006, NIBSC, Великобритания).

Линия клеток HEK-293T-ACE2, экспрессирующая ACE2, полученная на основе клеток линии HEK-293T [615], и линия клеток GBM6138 (экспрессирующие ACE2 клетки мультиформной глиобластомы) [616]) были любезно предоставлены П. Чумаковым (ИМБ

РАН, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM-F12, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС), 2 mM L-аланил-L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Штамм ПИК-35 SARS-CoV-2 был любезно предоставлен сотрудниками ФГУНУ «ФНЦ НИЦ ИБП РАН» им. Чумакова, Институт полиомиелита, Москва.

#### *Тест на цитотоксичность*

Цитотоксичность лигандов **1.1.45, 1.1.46, 1.1.52, 1.1.53 и 1.1.49-1.1.51** оценивали с помощью МТТ теста с некоторыми модификациями [617]. Приблизительно 2500 клеток на лунку для клеточных линий MCF7, HEK293T, A549' и HepG2 или 4000 клеток на лунку для клеточной линии VA13 высевали в 135 мл среды DMEM-F12 (Gibco, США) в 96-луночный планшет и инкубировали в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> в течение первых 16 часов для прикрепления клеток. Клетки обрабатывали в течение 72 часов 50 нМ-100 мкМ (восемь разведений) тестируемых и эталонных соединений (каждое в трех повторах, конечная концентрация ДМСО в среде составляла 1% или менее). МТТ реагент (Панэко, Россия) добавляли к клеткам до конечной концентрации 0.5 г/л (использовали 10X исходный раствор в PBS) и инкубировали в течение 2 ч при 37°C в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>. После удаления среды осадок растворяли в ДМСО с последующей регистрацией оптической плотности при длине волны 555 нм с эталонной длиной волны 670 нм. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Graphpad и представляли в виде среднего ± стандартное отклонение (n=3) для каждой концентрации соединения и рассчитывали CC<sub>50</sub>.

Для оценки цитотоксичности лигандов-аналогов хромофора GFP двукратные разведения исследуемых соединений и ДМСО в качестве отрицательного контроля готовили в RPMI-1640 (ФГАНУ "ФНЦИРИП ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН", ИНСТИТУТ ПОЛИОМИЕЛИТА, Россия). Суспензии клеток МТ4 добавляли в лунки с разведениями соединений и контролем ДМСО (приблизительно  $2 \times 10^4$  клеток на лунку). Конечная серия концентраций из восьми разведений начиналась с 25 мкМ. После инкубации при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение девяти дней клетки анализировали с помощью микроскопии. Значения цитотоксической концентрации (CC<sub>50</sub>) (концентрация соединения, необходимая для индукции гибели 50% клеток в монослое) рассчитывали по методу Кербера [618]. Все экспериментальные процедуры проводили в двух повторах и повторяли от двух до четырех раз. Среднее значение и стандартное отклонение рассчитывали с помощью OriginPro 8 (OriginLab, США).

Для оценки жизнеспособности клеток при обработке АС ОН, нацеленными на ПУ SARS-CoV-2, клетки линии HEK-293T-ACE2 или GBM6138 высевали в 96-луночные планшеты и трансфицировали АС ОН с использованием реагента для трансфекции Attractene (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Через четыре дня после трансфекции среду заменяли на 50 мкл реагента CellTiter GLO 2.0 (Promega, США) на лунку. Затем планшеты инкубировали в темноте в течение 5 минут, после чего количественно определяли уровни люминесценции с помощью микропланшетного люминометра Triad (Dynex, США).

#### *Конфокальная и флуоресцентная микроскопия*

Клетки Vero высевали на покровные стекла в 12-луночные планшеты (полный монослой на третий день). Через 72 ч культуральную среду из клеток удаляли. Растворы лигандов-аналогов хромофора GFP с конечной концентрацией 10 мкМ в DMEM добавляли к клеткам и инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. Затем среду удаляли и в каждую лунку добавляли 5 мкМ Хехст 33342 (Sigma-Aldrich, США) в DMEM и инкубировали при 5% CO<sub>2</sub> и 37°C в течение 30 мин. Клетки промывали PBS, инкубировали с 3,7% параформальдегидом в PBS в течение 15 минут при комнатной температуре и снова промывали PBS. Покровные стекла помещали на предметные стекла с каплей 10% Mowiol в 0,1M трис-HCl, pH 8,5. Слайды анализировали с помощью конфокального микроскопа Eclipse TE2000 (Nikon, Япония) с наборами фильтров 515/30 (синий) и 590/50 (зеленый).

Для исследования внутриклеточной локализации АС ОН, нацеленных на ПУ SARS-CoV-2, использовали их аналоги, меченные FAM на 5'-конце; клетки фиксировали через 24 ч после трансфекции, ядра окрашивали ДАФИ (Thermo Fisher Scientific, США). Флуоресцентную микроскопию проводили с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония).»

#### *Репортерная система с двумя люциферазами и тест на эффективность сдвига рибосомной рамки считывания*

Три ранее описанные конструкции со встроенными генами люцифераз Renilla и Firefly, полученные на основе вектора pSGDlucV3.0 [461], были любезно предоставлены Гэри Лограном (Университетский колледж Корка, Ирландия). Конструкт дикого типа (WT) содержал последовательность генома SARS-CoV-2 дикого типа с аттенуаторной петлей, сайтом проскальзывания и ПУ между генами люцифераз Renilla и Firefly. Конструкция SS mut (отрицательный контроль) содержала мутацию, предотвращающую PCPC, в сайте проскальзывания. В контрольной конструкции IFC (с генами обеих люцифераз в единой рамке считывания) сайт проскальзывания отсутствовал.

Клетки НЕК-293Т высевали в 96-луночные планшеты в количестве около  $3 \times 10^4$  жизнеспособных клеток на лунку. На следующий день клетки трансфицировали плазмидой WT/SSmut/IFC или ее смесью с АС ОН (массовое соотношение плазмид:АС ОН – до 1:1). Трансфекционные комплексы для трансфекции в одну лунку готовили следующим образом: Attractene (0,75 мкл, Qiagen, США) добавляли к 200 нг ДНК в 50 мкл Opti-Mem (Gibco) и инкубировали в течение 15 мин. После добавления в лунки трансфекционных комплексов клетки выращивали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. Затем клетки лизировали в 15 мкл 1× буфера для пассивного лизиса (Promega, США).

Люциферазные субстраты Renilla и Firefly (50 мкл) добавляли к каждому образцу лизата. Излучение света при 480 нм (Renilla) и 560 нм (Firefly) измеряли с помощью микропланшетного ридера M200 Tecan (Tecan Group Ltd., Швейцария). Эффективность PCPC в конструкциях WT/SS mut рассчитывали как отношение активностей люциферазы Firefly и Renilla, нормированное на соответствующие значения в конструкции IFC. Все значения PCPC при наличии АС ОН показаны в процентах от PCPC при отсутствии АС ОН. Значения IC<sub>50</sub> получали путем аппроксимации экспериментальной кривой дозозависимости уравнением (8).

#### *Тест на ингибирование цитопатического эффекта*

Для оценки ингибирования цитопатического эффекта лигандами-аналогами хромофора GFP восемь двукратных разведений исходных растворов соединений в двух повторах готовили в RPMI-1640 (ФГАНУ "ФНЦИРИП ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН", ИНСТИТУТ ПОЛИОМИЕЛИТА, Россия). Разведения соединений смешивали с равными объемами суспензии вируса ВИЧ-1 (штамм NL4-3), содержащей 100 CCID<sub>50</sub> (50% инфекционная доза для культуры ткани). Контрольные клетки обрабатывали теми же ДМСО в тех же концентрациях, что и при разведении соединения. Затем к экспериментальным смесям добавляли суспензию клеток МТ4 (приблизительно  $2 \times 10^4$  клеток на лунку) в RPMI-1640, содержащей 10% ФБС (Invitrogen, Южная Америка). Конечная серия концентраций начиналась с 25 мкМ. Каждый эксперимент включал титрование дозы вируса в инокуляте для обеспечения приемлемого диапазона доз. После девятидневной инкубации (5% CO<sub>2</sub> при 37 °C) цитопатический эффект (ЦПЭ) оценивали визуально с помощью микроскопии. Значения EC<sub>50</sub> рассчитывали по методу Кербера [618]. Все экспериментальные процедуры проводили в двух повторах и повторяли от двух до четырех раз. Среднее значение и стандартное отклонение рассчитывали с помощью OriginPro 8 (OriginLab, США).

Для оценки ингибирования цитопатического эффекта АС ОН, клетки НЕК-293Т-ACE2 и GBM6138 культивировали в 96-луночных планшетах при плотности  $2 \times 10^4$  и  $5 \times 10^4$  клеток на лунку соответственно. Клетки трансфицировали АС ОН с использованием Attractene (Qiagen, США) в соответствии с инструкциями производителя. В частности, на 1 мкг АС ОН использовали 3,75 мкл Attractene, смешивали с 50 мкл бессывороточной среды; готовили серию двукратных разведений и наносили в каждую лунку в двукратных разведениях 50 мкл смеси соответствующей концентрации. Затем клетки инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  с 5%  $\text{CO}_2$  в течение 3 часов. Далее в каждую лунку добавляли по 50 мкл суспензии вируса SARS-CoV-2 (штамм ПИК-35), начиная с концентрации 0,00025х. исходного раствора ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>) с двукратными разведениями, в трех повторах. После 2-часовой инкубации в каждую лунку добавляли по 100 мкл среды, содержащей 2% ФБС. Для прямого измерения влияния АС ОН на титры вируса клетки инкубировали еще 5 дней при  $37^\circ\text{C}$  с 5%  $\text{CO}_2$  с последующей визуальной оценкой цитопатического эффекта. Для оценки скорости репликации вируса аликвоты среды собирали на третий день инкубации и использовали для заражения свежих клеток в идентичных условиях. Значения TCID<sub>50</sub> рассчитывали с использованием метода Кербера [619]. Значения EC<sub>50</sub> рассчитывали с использованием Prism 9 (GraphPad, США).

*Методы, используемые в разделе 2.3*

*Экзонуклеазная устойчивость ОДН с концевой  $G^{8AE}$ -clamp модификацией*

ОДН1 (Таблица 2.3.1) в конечной концентрации 20 мМ инкубировали с фосфодиэстеразой змеиного яда (0,005 единиц/мл) в 50 мМ трис-НСl, рН 7,5 и 8 мМ MgCl<sub>2</sub> при 37°C. Общий объем реакции составлял 50 мкл. В указанные моменты времени аликвоты (10 мкл) каждой реакционной смеси нагревали при 90°C на кипящей водяной бане в течение 2 минут. Образцы охлаждали на льду, загружали на 20% полиакриламидный гель и элюировали буфером TBE (90 мМ трис-борат (рН 8) и 20 мМ ЭДТА). Полосы ДНК визуализировали окрашиванием SYBR Gold на приборе GelDoc (Biorad, США).

*УФ, КД- и флуоресцентная спектроскопия*

Перед всеми измерениями образцы денатурировали при 95°C в течение 5 мин и медленно охлаждали до 20°C или быстро охлаждали на льду.

Спектры УФ-поглощения, КД и флуоресценции, а также кривые УФ-, КД- и флуоресцентного плавления иМ регистрировали на спектрофотометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания), оснащенном термостатируемым кюветодержателем. Спектры флуоресценции меченых ОДН также регистрировали на микропланшетном ридере Tecan (Life Sciences, Швейцария) при возбуждении в 350 нм (tC<sup>0</sup>), 370 нм (clamp), 490/495 нм (FAM), 530 нм (sCy3), 550/560 нм (TAMRA) или 630 нм (Cy5, sCy5). Флуоресцентное плавление/отжиг меченых ОДН проводили с использованием системы ПЦР в реальном времени QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Значения рН<sub>1/2</sub> определяли как точки перегиба аппроксимированных сигмоидальных кривых на графиках КД<sub>норм</sub> теоретической функцией рН:

$$Y = 1 - 1/(1 + 10^{(pH_{1/2}-x)*n}) \quad (8)$$

где Y - нормализованная эллиптичность (КД<sub>норм</sub>) при 288 нм: КД<sub>норм</sub> = (КД<sub>текущий рН</sub> – КД<sub>мин</sub>)/(КД<sub>макс</sub> – КД<sub>мин</sub>), x — текущее значение рН, рН<sub>1/2</sub> — значение рН перехода, n — коэффициент Хилла.

В случае ОДН T1Z значение рН<sub>1/2</sub> дополнительно проверяли с использованием данных по поглощению и ИФ i-clamp модификации (экспериментальные данные также аппроксимировали сигмоидальной функцией (9), Y = нормированное поглощение или ИФ). Аппроксимацию проводили с использованием программного обеспечения DataFit 9 (Oakdale Engineering, США).

ДСП получали путем вычитания спектров поглощения, полученных при 5°C, из спектров поглощения, полученных при 90°C. Температуру плавления/отжига иМ оценивали по максимуму первой производной кривых плавления. Эллиптичность при

285/288 нм регистрировали через каждые 1 °С в диапазоне температур 5–90 °С (скорость нагрева/охлаждения = 1 °С/мин). Полученные кривые аппроксимировались сигмоидальной моделью с помощью программного обеспечения Pro-Data Viewer (Applied Photophysics, Великобритания) для оценки температур плавления и отжига ( $T_{пл}$  и  $T_o$ ), их средних значений ( $T_{1/2}$ ) и гистерезиса ( $T_{пл}-T_o$ ).

Значения ИФ в максимумах эмиссии или общую ИФ аппроксимировали теоретической функцией (9):

$$\text{ИФ}_{pH_i} = \frac{C_1 \cdot (pH_i + C_2)}{1 + 10^{(pH_{1/2} - pH_i) \cdot \text{Угловой коэффициент Хилла}}} + C_3 \cdot pH_i + C_4 \quad (9),$$

где  $pH_{1/2}$  — точка pH перехода;  $pH_i$  – pH, при котором проводится измерение ИФ, и  $C_1$ – $C_4$  — параметры, определяющие относительный вклад псевдолинейной и сигмоидальной функций (**Рисунок 2.3.40**).

Изменения ИФ регистрировали каждые 0,3/0,2 °С при ступенчатом нагреве/охлаждении образцов со средней скоростью 1,5/1,0 °С/мин. Температуры плавления/отжига определяли по максимумам первых производных кривых плавления/отжига.

Для FAM/TAMRA-меченных сенсоров зависимость от pH анализировали в трех режимах: одноканальном (изменения ИФ FAM или TAMRA наблюдали при возбуждении в соответствующем максимуме поглощения), двухканальном режиме (изменения соотношения ИФ FAM/TAMRA наблюдали при возбуждении в соответствующих максимумах поглощения) и режиме FRET (изменения соотношения ИФ FAM/TAMRA наблюдаются при возбуждении FAM).

Вклад резонансной передачи энергии Форстера (FRET) в зависимость FAM/TAMRA-меченных pH-сенсоров оценивали путем анализа эмиссии FAM и TAMRA при возбуждении FAM. Эффективность (E) FRET рассчитывали на основе уравнения (10) с использованием значений ИФ FAM (донор) и TAMRA (акцептор) в максимумах эмиссии:

$$E = \frac{\text{ИФ}_{\text{акцептор}} - 0,2 \cdot \text{ИФ}_{\text{донор}}}{\text{ИФ}_{\text{акцептор}} + 0,8 \cdot \text{ИФ}_{\text{донор}}} \quad (10)$$

Коэффициенты 0,2 и 0,8 были введены для поправки на вклад FAM в канал детекции флуоресценции TAMRA. Поправочные коэффициенты были определены экспериментально путем анализа FAM-C5T и FAM-T20 в канале регистрации флуоресценции TAMRA.

Во всех экспериментах по плавлению ОДН, содержащих 3',5'-FAM/BHQ1 или внутренние петлевые вставки на основе 1,3-диаза-2-оксофеноксазина, предварительно отоженные ОДН или комплексы предварительно отоженных ОДН с митоксантроном (MTX) или BRACO-19 (Sigma-Aldrich, Великобритания) в соотношении 1:20 нагревали со



скоростью 1 °С/мин, и КД/ИФ регистрировали каждые 0,5 °С. ОДН использовали в концентрации 1-2 мкМ в анализах КД-плавления и 0,5 мкМ в анализах с плавлением по флуоресценции. КД регистрировали при 288 нм (КД-плавление); флуоресценцию FAM регистрировали при 520 нм с возбуждением в 495 нм (флуоресцентное плавление), и флуоресценцию производных феноксазина регистрировали при 450, 430 или 440 нм (свободные ОДН, комплексы ОДН с BRACO-19 или комплексы ОДН с MTX соответственно) при возбуждении с длиной волны 360 нм.

#### ЯМР-спектроскопия иМ-образующих ОДН

ОДН растворяли в 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  буфере (pH 5,8) до конечной концентрации 0,1 мМ ( $U_0$  и его производные) или 0,2 мМ ( $T_0$  и его производные), и образцы подвергали быстрому или медленному отжигу соответственно. Для стабилизации сигнала в каждый образец добавляли  $\text{D}_2\text{O}$  до 10%. Одномерные (1D)  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры с подавлением воды WATERGATE и двумерные (2D) NOESY спектры с подавлением воды WATERGATE при 300 К регистрировали для каждого образца на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III 600 МГц (Бремен, Германия), оснащенном трехканальным криодатчиком TCI Prodigy.

#### *Эксперименты с остановленным потоком с контролем по КД (ОПКД) и флуоресценции (ОПФ)*

Эксперименты с остановленным потоком с контролем по КД (ОПКД) проводили при 25°C на спектрофотометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания), оснащенном модулем для остановки потока с оптическим путем 10 мм. КД регистрировали при 288 нм, и ширину полосы пропускания устанавливали на 6 нм.

Для ОПКД-экспериментов с ОДН, содержащими гуанидино-*i*-clamp, предварительно отоженные образцы (быстрый предварительный отжиг для  $U_0$  и  $U_1Z$  и медленный предварительный отжиг для  $T_0$ ,  $M_0$ ,  $G_0$  и их производных) в 50 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  буфере быстро смешивали (1:4) с 80 мМ натрий-фосфатным буфером с другим pH (4,5 или 9,0). Было проведено четыре серии ОПКД-измерений:

1) Скачок pH 6,8  $\rightarrow$  5,7 (для  $T_0$ ,  $T_1Zg$ ,  $U_0$  и  $U_1Zg$ ). Раствор ОДН (70 мкМ для  $T_0$  и  $T_1Zg$ , 15 мкМ для  $U_0$  и  $U_1Zg$ ) в 50 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  буфере (pH 6,8) смешивали (1:4) с 80 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  буфером (pH 4,5) до конечной концентрации  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  74 мМ (pH 5,7);

2) скачок pH 5,2  $\rightarrow$  7,5 (для  $T_0$ ,  $T_1Zg$ ,  $U_0$  и  $U_1Zg$ ). Раствор ОДН (70 мкМ для  $T_0$  и  $T_1Zg$ , 15 мкМ для  $U_0$  и  $U_1Zg$ ) в 50 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  буфере (pH 5,2) смешивали (1:4) с 80 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  буфером (pH 9,0) до конечной концентрации  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  74 мМ (pH 7,5);

3) скачок pH 8,0  $\rightarrow$  6,0 (для G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>Zg, G<sub>2</sub>Zg, M<sub>0</sub>, M<sub>1</sub>Zg и M<sub>6</sub>Zg). Раствор ОДН (15 мкМ) в 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфере (pH 8,0), содержащем 90 мМ NaCl, смешивали (1:4) с 80 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфером (pH 4,5), содержащем 90 мМ NaCl, до конечной концентрации NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 74 мМ (pH 6,0);

4) скачок pH 6,7  $\rightarrow$  7,9 (для G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>Zg, G<sub>2</sub>Zg, M<sub>0</sub>, M<sub>1</sub>Zg и M<sub>6</sub>Zg). Раствор ОДН (15 мкМ) в 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфере (pH 6,7), содержащем 90 мМ NaCl, смешивали (1:4) с 80 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфером (pH 9,0), содержащем 90 мМ NaCl, до конечной концентрации NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 74 мМ (pH 7,9).

Каждый эксперимент проводился не менее трех раз; полученные кинетические кривые усредняли и аппроксимировали моноэкспонентами с использованием программного обеспечения ProData (Applied Photophysics, Великобритания).

В ОПКД-экспериментах с кандидатами в pH-сенсоры, растворы FAM/BHQ1-меченных ОДН (15 мкМ) в 10 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфере (pH 6 или 8), содержащем 130 мМ KCl и 10 мМ NaCl, смешивали (1:4) с щелочным (33,67 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 106,33 мМ KCl и 10 мМ NaCl) или кислым (15,3 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 124,7 мМ KCl и 10 мМ NaCl) раствором, получая переходы pH 6  $\rightarrow$  8 и 8  $\rightarrow$  6 соответственно без изменения ионной силы. Кинетику отклика FAM/TAMRA-меченных кандидатов в pH-сенсоры на pH скачки 6,6  $\leftrightarrow$  7,2 анализировали при смешивании предварительно отоженных растворов кандидатов с концентрацией 2 мкМ в 140 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфере (pH 6,6 или 7,2) в соотношении 1:4 с 140 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфером (pH 7,38 или 6,42) соответственно. Все эксперименты проводили в трех повторах, кривые аппроксимировались биэкспоненциальной функцией (11)

$$\frac{\Delta \text{ИФ}}{\Delta \text{ИФ}_{\text{макс}}} = 1 - A_1 \cdot \exp(-K_1 \cdot t) - A_2 \cdot \exp(-K_2 \cdot t) \quad (11)$$

где K<sub>1</sub> и K<sub>2</sub> – наблюдаемые константы скорости отклика, предположительно характеризующие переходы «быстрых» и «медленных» иМ-конформеров соответственно. Относительные вклады этих конформеров рассчитывались как A<sub>1</sub>/(A<sub>1</sub>+A<sub>2</sub>) и A<sub>2</sub>/(A<sub>1</sub>+A<sub>2</sub>).

В экспериментах ОПФ флуоресценцию FAM/BHQ1-меченных ОДН регистрировали при 520 нм с возбуждением в 495 нм, а FAM/TAMRA-меченных ОДН регистрировали при возбуждении в 480 нм с использованием отсекающего фильтра 515 нм. Кинетические кривые аппроксимировали моно- или биэкспоненциальными функциями с использованием программного обеспечения Pro-Data Viewer.

Растворы FAM/BHQ1-меченных ОДН с концентрацией 2,5 мкМ в 140 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфере (pH 6,7, 7 или 7,3), дополненном 10 мМ NaCl, смешивали (1:4) с

$K_2HPO_4/KH_2PO_4$  буфером (pH 7,1/7,5, 7,4/6,6 или 6,5/6,9), также содержащем 10 мМ NaCl, до конечного pH 7/7,3, 7,3/6,7 или 6,7/7.

#### *Циклы изменения pH и анализ зависимости от ионной силы*

Для экспериментов с циклическим изменением pH между 9,0 и 5,0 FAM-BHQ1-меченные ОДН растворяли в 10 мМ  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  буфере (pH 9,0), содержащем 100 мМ KCl, до конечной концентрации ОДН 2 мкМ, и затем для регуляции pH растворов использовали 2 М HCl или 2М NaOH. Для экспериментов с циклическим изменением pH между 6,7 и pH 7,3 FAM-BHQ1-меченные ОДН растворяли в 1 мМ  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  буфере (pH 7,3), содержащем 100 мМ KCl, до конечной концентрации 2 мкМ и использовали 1 М  $K_2HPO_4$  или 1 М  $KH_2PO_4$  для регуляции pH растворов. Для анализа зависимости образования иМ от ионной силы FAM-BHQ1-меченные ОДН растворяли в 10 мМ  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  буфере (pH 7,3 или pH 6,7) до конечной концентрации 2 мкМ, а для регуляции ионной силы растворов использовали 1 М KCl. После каждого изменения pH растворы инкубировали при 37 °C в течение 5 мин и регистрировали эмиссию флуоресценции при 520 нм с возбуждением в 495 нм.

#### *Клеточные культуры и тест на цитотоксичность*

Клетки аденокарциномы легкого человека (A549) и почки эмбриона человека (HEK293), а также immortalized кератиноциты (HaCat) и мышинные фибробласты (L929), выращивали в среде DMEM (Панэко, Россия) с добавлением 1% смеси пенициллина и стрептомицина (Панэко, Россия), 2 мМ глутамина (Панэко, Россия) и 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone GE Healthcare, США). Клетки культивировали во влажном инкубаторе с 5%  $CO_2$  при температуре 37 °C. Отсутствие контаминации микоплазмой подтверждали методом ПЦР.

Для анализа влияния меченых ОДН на жизнеспособность клеток с помощью теста PrestoBlue клетки A549 или L929 трансфицировали мечеными ОДН с использованием реагента Turbofect (Thermo Fisher Scientific, США), затем инкубировали при 37 °C в течение 24 часов и обрабатывали реагентом PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific, США), следуя протоколу производителя. После 10-минутной инкубации флуоресценцию PrestoBlue при длине волны 590 нм с возбуждением в 560 нм регистрировали при комнатной температуре на микропланшетном ридере Tecan (Life Sciences, Швейцария). Все данные нормализовали по средней флуоресценции PrestoBlue в контрольных клетках, предварительно обработанных реагентом Turbofect (Thermo Fisher Scientific, США) без меченых ОДН.

Для анализа влияния меченых ОДН на жизнеспособность клеток с помощью МТТ теста клетки A549 трансфицировали мечеными ОДН с использованием реагента

липофектамин 2000 (Thermo Fisher Scientific, США), затем инкубировали при 37 °C в течение 6 часов при 37 °C в 5% CO<sub>2</sub>. Затем среду с меченым ОДН/липофектамином 2000 удаляли, и лунки трижды промывали DMEM. В лунки добавляли DMEM (100 мкл) и инкубировали в течение 24 часов при 37 °C в 5% CO<sub>2</sub>. После замены среды на свежую DMEM в лунки добавляли 0,5 г/л МТТ (Панэко, Россия) и инкубировали 1 час. Затем раствор МТТ заменяли 100 мкл ДМСО. Измерения проводились на длине волны 570 нм с эталонной длиной волны 630 нм при комнатной температуре с помощью микропланшетного ридера Tecan (Life Sciences, Швейцария).

#### *Флуоресцентная/конфокальная микроскопия и внутриклеточная калибровка pH*

Для внутриклеточной калибровки pH клетки, трансфицированные сенсором (0,15 мкМ или 0,45 мкМ для иМ, содержащих стандартные терминальные или феноксазиновые метки, соответственно), инкубировали с 140 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> буфером с известным pH (6,0, 6,5, 7,0, 7,2, 7,5, 8,0), дополненным 10 мМ NaCl, 10 мкМ валиномицином (Sigma Aldrich, США) и 10 мкМ нигерицином (Sigma Aldrich, США), в течение 30 мин при 37°C, и затем один раз промывали тем же буфером. Фиксацию проводили с помощью 4% параформальдегида, и после фиксации клетки еще раз промывали буфером (калибровка) или DMEM, не содержащим фенолового красного (измерение нативного pH), чтобы компенсировать возможные сдвиги pH, вызванные параформальдегидом. Ядра фиксированных и живых клеток окрашивали ДАФИ (Thermo Fisher Scientific, США) или Хехст 33342 (Thermo Fisher Scientific, США) соответственно. Для визуализации гетерохроматина клетки окрашивали антителами кролика к H3K9me3 ab8898 (Abcam, Великобритания) и далее вторичными антителами козы к IgG кролика, мечеными Alexa-Fluor-555 (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве контрольных pH-индикаторов использовали низкомолекулярные соединения pHrodo Red и pHrodo Green (Thermo Fisher Scientific, США).

Флуоресцентные изображения получали через 3-72 часа с использованием микроскопа Olympus IX53 (Olympus Scientific Solutions, США) и микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония) для визуализации живых и фиксированных клеток соответственно в каналах FAM и TAMRA. Изображения объединяли и анализировали в ImageJ для расчета ИФ FAM или соотношения ИФ FAM:TAMRA при заданном pH. Эксперименты проводили в двух биологических и двух технических повторах.

Внутриклеточное распределение FAM/TAMRA-меченного pH-сенсора и его стабильность во времени анализировали с помощью конфокальной FRET-микроскопии на Eclipse Ti-E 152 микроскопе с конфокальным модулем A1 (Nikon, Япония) с

использованием CFI Plan Apo VC 20×/0,75. Флуоресценцию возбуждали при 488 нм (FAM) и детектировали в диапазоне 570–620 нм (TAMRA) через 12, 24, 48 и 72 ч после трансфекции. Динамический диапазон был настроен согласно рекомендациям производителя и оставался неизменным на протяжении всего периода наблюдения.

Для изучения колокализации pH-сенсора 1Q13Dss с лизосомами к трансфицированным клеткам добавляли LumiTracker Lyso Red (Люмипроб, Россия) до конечной концентрации 50 нМ. Изображения конфокальной микроскопии живых клеток получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия) при  $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{эм}} = 405/410\text{--}596$  нм (сенсор 1Q13Dss) и 594/561–694 нм (LumiTracker Lyso Red). Изображения анализировали в ImageJ для расчета ИФ  $tC^0$  при заданном pH. Эксперименты проводили в двух биологических и трех технических повторях.

*Методы, используемые в разделе 2.4*

*КД-, УФ- и флуоресцентная спектроскопия*

Для определения стабилизирующих дуплекс свойств и чувствительности к одонуклеотидным заменам модификации оксо-εА использовали эксперименты по УФ-плавлению. Образцы дуплекса (5 мкМ в буфере, содержащем 140 мМ KCl и 5 мМ фосфат натрия, pH 7,2) нагревали до 95°C в течение 5 мин, медленно охлаждали до комнатной температуры и инкубировали при 4°C в течение 1 ч перед экспериментами по плавлению. Кривые плавления были получены путем измерения поглощения при 260 нм каждый 1°C при нагревании образца со скоростью 0,5°C/мин. Экспериментальные данные аппроксимировали с помощью программного обеспечения ProData (Applied Photophysics, Великобритания) с использованием сигмоидального уравнения Больцмана:

$$A = A_{\min} + \left( \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + \exp\left(\frac{x_0 - x}{w}\right)} \right) \quad (12)$$

где  $A$  представляет собой поглощение,  $A_b$  и  $A_t$  представляют собой минимальное и максимальное значение соответственно,  $x$  представляет собой температуру,  $x_0$  представляет собой температуру перехода,  $w$  представляет собой подбираемый параметр.

Для оценки влияния модификации оксо-εА на структуру дуплекса регистрировали КД-спектры на спектрофотометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания) при 20°C. КД регистрировали в диапазоне от 220 до 330 нм, и молярный КД  $\Delta\epsilon$  рассчитывали в соответствии с уравнением (4).

Для определения стехиометрии комплексов оксо-εА-модифицированных дуплексов с серебром и стабилизирующих свойств оксо-εА в присутствии и отсутствии ионов серебра использовали КД-, УФ- и флуоресцентную спектроскопию.

Для экспериментов использовали водные растворы 3 мкМ дуплекса в 5 мМ MOPS (MOPS, 3-(*N*-морфолино)пропансульфоновая кислота))) буфере, содержащем 150 мМ NaClO<sub>4</sub> (pH 6,8), которые титровали AgNO<sub>3</sub> в качестве источника Ag<sup>+</sup>. Температурно-зависимое поглощение УФ при 260 нм регистрировали на приборе Cary100 Bio (Agilent, США) при нагревании образца со скоростью 1°C/мин. Поглощение нормализовали в соответствии со следующим уравнением:

$$A_{\text{норм}} = \frac{(A - A_{\min})}{(A_{\max} - A_{\min})} \quad (14)$$

Температуры плавления ( $T_{\text{пл}}$ ) определяли путем аппроксимации функцией Гаусса первой производной профиля плавления. КД-спектры регистрировали при 5°C на приборе JASCO J-815 (Япония) с последующим сглаживанием и ручной коррекцией базовой линии. Флуоресцентные спектры регистрировали на приборе Cary Eclipse (Agilent, США) с

использованием флуоресцентной кварцевой кюветы объемом 500 мкл. Перед каждым измерением флуоресценции образец нагревали до 60°C в течение 2 мин и охлаждали до комнатной температуры в течение 8 мин.

*Удлинение праймера после оксо-εА*

Специфичность вставки dAMP напротив оксо-εА и последующее удлинение праймера изучали на немодифицированной и модифицированной матрицах (**Рисунок 2.4.9А**) с помощью экспериментов по удлинению праймера с использованием праймера 5'-Cy5-TAATACGACTCACTATAGGG-3' и четырех природных dNTP. Реакции проводили путем смешивания предварительно отожденного дуплекса праймер-матрица (5 мкМ) в 1× соответствующем реакционном буфере, 750 мкМ каждого из dNTP (с или без dATP) и 2 единиц большого фрагмента ДНК полимеразы I *E. coli*, фрагмента Кленова (СибЭнзим, Россия) или ДНК полимеразы Т4 (СибЭнзим, Россия). Удлинение праймера проводили при 37°C в течение 4 ч с анализом реакционной смеси каждый час. Для остановки реакции использовали краситель, содержащий формамид, и продукты оценивали с помощью 19% денатурирующего ПААГ. Гели сканировали с помощью сканера Typhoon RGB (Amersham, Великобритания). Полосы с продуктами реакции удлинения праймера вырезали. Продукты удлинения элюировали и анализировали с помощью масс-спектрометрии (**Рисунок 2.4.9Б**).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неканонические структуры нуклеиновых кислот оказываются в фокусе внимания все возрастающего числа исследователей, занимающихся как науками о жизни, так и биоинженерными дисциплинами. Для первых они представляют интерес в качестве потенциальных регуляторов различных клеточных процессов, таких как экспрессия генов и формирование биоконденсатов, для последних – в качестве мощного инструмента тонкой настройки пространственной структуры и свойств материалов и наноустройств. Несомненный интерес представляет также не только обнаружение этих структур и установление их роли в жизнедеятельности клетки, но также и воздействие на них с целью регуляции опосредованных ими функций.

Цель настоящей работы заключалась в разработке молекулярных инструментов или их потенциальных элементов на основе неканонических структур нуклеиновых кислот. При этом опробован как подход с модификацией последовательностей, образующих неканонические структуры, так и с созданием и выявлением пар внешней сигнальной/воздействующей молекулы и неканонической структуры.

В первом случае, в рамках диссертации удалось разработать ряд нуклеотидных модификаций, позволяющих регулировать термодинамические и кинетические параметры *i*-мотивов и изменяющих свои флуоресцентные свойства в ответ на структурные перестройки. Такие модификации включают новые феноксазиновые производные (*i*-clamp и аналоги), повышающие термическую стабильность *i*-мотивов, «редуцированные» петлевые вставки (2',3'-дидезоксирибозный и алифатические линкеры), позволяющие контролировать кинетику сборки *i*-мотивов и обеспечивающие их более высокую стабильность в близких к физиологическим условиях, флуоресцентные вставки (tC<sup>0</sup> и другие 1,3-диаза-2-оксофеноксазин-содержащие вставки), чувствительные к сборке *i*-мотивов, и модификацию оксо-εА, образующую комплексы с ионами серебра. Для некоторых из них продемонстрирована применимость в создании pH-сенсоров, систем скрининга низкомолекулярных соединений, для установления сайта связывания аптамеров с мишенью и регуляции сродства аптамера к мишени. В случае pH-сенсоров, в диссертации предложены принципы подбора и дизайна нуклеотидных последовательностей, оптимизация схем мечения и подходы к выбору нуклеотидных модификаций для тонкой настройки их свойств, вместе обеспечивающие набор инструментов для широкого круга молекулярно-биологических задач. Следует отметить, что разработанные pH-сенсоры представляют собой альтернативу генетически кодируемым pH-сенсорам, применение которых может ограничиваться отсутствием или медленным делением клеток. Описанные



в диссертации системы скрининга открывают путь для надежного профилирования низкомолекулярных соединений на способность регулировать термическую стабильность i-мотивов и G-квадруплексов. Как результат, разработанные системы могут обеспечить идентификацию селективных модуляторов стабильности неканонических структур, выполняющих в клетках регуляторные функции.

Во втором случае, в рамках диссертации созданы «разгорающиеся зонды» для быстрого установления вторичной структуры фрагментов нуклеиновых кислот, разработаны пары флуорогенных красок на основе хромофора GFP и двухмодульных (G4+дуплекс) структур для нековалентного мечения ДНК, создана генетически кодируемая система с меткой минимального размера для нековалентного мечения РНК и Раман-активные красители, применимые в составе аптасенсоров на основе поверхностно-усиленной Рамановской спектроскопии. Созданные в рамках диссертации молекулы и их пары с неканоническими структурами могут найти применение в визуализации биомолекул и создании различных биосенсоров. Кроме того, проведен дизайн и апробирован *in vitro* ряд низкомолекулярных соединений и олигонуклеотидных аналогов, обеспечивающих селективную регуляцию стабильности G-квадруплексов и псевдоузла. Как результат, выявлены перспективные кандидаты для последующих исследований *in vivo*.

Таким образом, в рамках диссертационного исследования нам удалось разработать ряд оригинальных молекулярных инструментов, которые, надеемся, обогатят арсенал молекулярных биологов, биохимиков и медицинских химиков.

## ВЫВОДЫ

1. Получены флуоресцентные зонды, позволяющие дискриминировать G4 от других неканонических структур нуклеиновых кислот по изменению интенсивности сигнала флуоресценции. Полученные зонды превосходят стандартные зонды по ряду спектральных характеристик;
2. Исследована связь между интенсивностью флуоресценции аналогов хромофора GFP в комплексе с двухмодульными структурами типа G4+дуплекс и предложены способы увеличения яркости комплексов;
3. Разработан высокоэффективный метод синтеза флуорогенных красителей с высоким сродством и селективностью к аптамерам семейства Манго. Создана генетическая кодируемая система, состоящая из оптимизированной сверхкороткой метки на основе аптамера Манго II и нового флуорогенного красителя, флуоресцирующего в красной области видимого спектра. Продемонстрирована ее применимость для визуализации мнкРНК микобактерии в инфицированных макрофагах;
4. Получены Раман-активные красители на основе тушителей флуоресценции типа "черная дыра" (Black Hole Quencher, BHQ) с высоким сродством к неканоническим диадам и тетрадам из остатков гуанина. Краситель-лидер применим в качестве нековалентной спектральной метки высокочувствительных аптасенсоров на основе поверхностно-усиленной Рамановской спектроскопии;
5. Получен набор селективных и эффективных G4-лигандов с 1,3-диаза-2-оксофеноксазиновым остовом, демонстрирующих повышенную цитотоксичность для опухолевых клеток *in vitro*;
6. Разработана высокопроизводительная система скрининга соединений на способность стабилизировать уникальную двухмодульную ДНК-мишень LTR-III G4 из генома ВИЧ-1 и среди аналогов хромофора GFP выявлено высокоспецифичное соединение, способное подавлять репродукцию ВИЧ *in vitro*;
7. Получен набор антисмысловых олигонуклеотидов, модифицированных остатками G-clamp или конформационно-запертых нуклеиновых кислот (LNA), и выявлены лидеры, расплетающие псевдоузел в геномной РНК SARS-CoV-2 и проявляющие анти-SARS-CoV-2 активность *in vitro*;
8. Проведен дизайн и разработаны методы введения в олигонуклеотиды нуклеотидных модификаций, регулирующих термодинамические и кинетические параметры иМ;

9. Сконструированы рН-сенсоры на основе мономолекулярных иМ, позволяющие регистрировать небольшие изменения рН вблизи физиологических значений в различных клеточных отделах;

10. Создана и продемонстрирована применимость флуоресцентной системы скрининга низкомолекулярных соединений на их способность влиять на термическую стабильность иМ;

11. Впервые показана применимость нуклеотидной модификации  $tC^O$  в установлении сайта связывания аптамера с белковой мишенью;

12. Создан флуоресцентный нуклеотидный аналог тимидина, способный регулировать сродство к мишени в ответ на внешний стимул *in vitro*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lin K.-Y., Jones R.J., Matteucci M. Tricyclic 2'-Deoxycytidine Analogs: Syntheses and Incorporation into Oligodeoxynucleotides Which Have Enhanced Binding to Complementary RNA // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. Vol. 117, № 13. P. 3873–3874. doi: 10.1021/ja00118a026.
2. Kurchavov N.A. et al. A New Phosphoramidite Reagent for the Incorporation of Diazaphenoxazinone Nucleoside With Enhanced Base-Pairing Properties into Oligodeoxynucleotides // *Nucleosides Nucleotides*. 1997. Vol. 16, № 10–11. P. 1837–1846. doi: 10.1080/07328319708002537.
3. Matsuda A., Obi K., Miyasaka T. Reaction of uracil nucleosides with 1-methylimidazole in the presence of phosphoryl chloride: A convenient method for the synthesis of 4-substituted pyrimidin-2(1H)-one nucleosides. // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 1985. Vol. 33, № 6. P. 2575–2578. doi: 10.1248/cpb.33.2575.
4. Teppang K.L. et al. Electronic Modifications of Fluorescent Cytidine Analogues Control Photophysics and Fluorescent Responses to Base Stacking and Pairing // *Chem. – Eur. J.* 2019. Vol. 25, № 5. P. 1249–1259. doi: 10.1002/chem.201803653.
5. Ortega J.-A. et al. Binding Affinities of Oligonucleotides and PNAs Containing Phenoxazine and G-Clamp Cytosine Analogues Are Unusually Sequence-Dependent // *Org. Lett.* 2007. Vol. 9, № 22. P. 4503–4506. doi: 10.1021/ol701826x.
6. Sandin P. et al. Characterization and use of an unprecedentedly bright and structurally non-perturbing fluorescent DNA base analogue // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36, № 1. P. 157–167. doi: 10.1093/nar/gkm1006.
7. Gardarsson H., Kale A.S., Sigurdsson S.Th. Structure–Function Relationships of Phenoxazine Nucleosides for Identification of Mismatches in Duplex DNA by Fluorescence Spectroscopy // *ChemBioChem*. 2011. Vol. 12, № 4. P. 567–575. doi: 10.1002/cbic.201000478.
8. Reilly S.M. et al. Folding and Hydrodynamics of a DNA i-Motif from the c-MYC Promoter Determined by Fluorescent Cytidine Analogs // *Biophys. J.* 2014. Vol. 107, № 7. P. 1703–1711. doi: 10.1016/j.bpj.2014.08.014.
9. Flanagan W.M. et al. Cellular penetration and antisense activity by a phenoxazine-substituted heptanucleotide // *Nat. Biotechnol.* 1999. Vol. 17, № 1. P. 48–52. doi: 10.1038/5220.
10. Maier M.A. et al. Nuclease Resistance of Oligonucleotides Containing the Tricyclic Cytosine Analogues Phenoxazine and 9-(2-Aminoethoxy)-Phenoxazine (“G-clamp”) and Origins of

- Their Nuclease Resistance Properties // *Biochemistry*. 2002. Vol. 41, № 4. P. 1323–1327. doi: 10.1021/bi011725y.
11. Sandin P. et al. Highly efficient incorporation of the fluorescent nucleotide analogs tC and tCO by Klenow fragment // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37, № 12. P. 3924–3933. doi: 10.1093/nar/gkp266.
  12. Baladi T. et al. Stealth Fluorescence Labeling for Live Microscopy Imaging of mRNA Delivery // *J. Am. Chem. Soc.* 2021. Vol. 143, № 14. P. 5413–5424. doi: 10.1021/jacs.1c00014.
  13. Lin K.-Y., Matteucci M.D. A Cytosine Analogue Capable of Clamp-Like Binding to a Guanine in Helical Nucleic Acids // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. Vol. 120, № 33. P. 8531–8532. doi: 10.1021/ja981286z.
  14. Holmes S.C. Steric inhibition of human immunodeficiency virus type-1 Tat-dependent transactivation in vitro and in cells by oligonucleotides containing 2'-O-methyl G-clamp ribonucleoside analogues // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31, № 11. P. 2759–2768. doi: 10.1093/nar/gkg384.
  15. Eddy J. et al. G4 motifs correlate with promoter-proximal transcriptional pausing in human genes // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39, № 12. P. 4975–4983. doi: 10.1093/nar/gkr079.
  16. Wilds C.J. et al. Direct Observation of a Cytosine Analogue that Forms Five Hydrogen Bonds to Guanosine: Guanidino G-Clamp // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002. Vol. 41, № 1. P. 115–117. doi: 10.1002/1521-3773(20020104)41:1<115::AID-ANIE115>3.0.CO;2-R.
  17. Wilds C.J. et al. Structural Basis for Recognition of Guanosine by a Synthetic Tricyclic Cytosine Analogue: Guanidinium G-Clamp // *Helv. Chim. Acta.* 2003. Vol. 86, № 4. P. 966–978. doi: 10.1002/hlca.200390114.
  18. Flanagan W.M. et al. A cytosine analog that confers enhanced potency to antisense oligonucleotides // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. Vol. 96, № 7. P. 3513–3518. doi: 10.1073/pnas.96.7.3513.
  19. Stanton R. et al. Chemical modification study of antisense gapmers // *Nucleic Acid Ther.* 2012. Vol. 22, № 5. P. 344–359. doi: 10.1089/nat.2012.0366.
  20. Nakagawa O. et al. Specific Fluorescent Probe for 8-Oxoguanosine // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. Vol. 46, № 24. P. 4500–4503. doi: 10.1002/anie.200700671.
  21. Koga Y. et al. Optimization of fluorescence property of the 8-oxodGclamp derivative for better selectivity for 8-oxo-2'-deoxyguanosine // *Tetrahedron*. 2011. Vol. 67, № 35. P. 6746–6752. doi: 10.1016/j.tet.2011.03.111.

22. Li Z. et al. Synthesis of new derivatives of 8-oxoG-Clamp for better understanding the recognition mode and improvement of selective affinity // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. Vol. 18, № 11. P. 3992–3998. doi: 10.1016/j.bmc.2010.04.025.
23. Nakagawa O. et al. Selective Fluorescence Detection Of 8-Oxoguanosine With 8-Oxog-Clamp // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2007. Vol. 26, № 6–7. P. 645–649. doi: 10.1080/15257770701490498.
24. Fuchi Y., Fukuda T., Sasaki S. Luminescent europium sensors for specific detection of 8-oxo-dGTP by time-gated fluorescence // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. Vol. 26, № 12. P. 3254–3260. doi: 10.1016/j.bmc.2018.04.052.
25. Fuchi Y., Fukuda T., Sasaki S. Synthetic receptor molecules for selective fluorescence detection of 8-oxo-dGTP in aqueous media // *Org. Biomol. Chem.* 2016. Vol. 14, № 33. P. 7949–7955. doi: 10.1039/C6OB01485B.
26. Nasr T. et al. Selective fluorescence quenching of the 8-oxoG-clamp by 8-oxodeoxyguanosine in ODN // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009. Vol. 19, № 3. P. 727–730. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.12.036.
27. Lukina M.V., Zhdanova P.V., Koval V.V. Structural and Dynamic Features of the Recognition of 8-oxoguanosine Paired with an 8-oxoG-clamp by Human 8-oxoguanine-DNA Glycosylase // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2024. Vol. 46, № 5. P. 4119–4132. doi: 10.3390/cimb46050253.
28. Taniguchi Y., Kawaguchi R., Sasaki S. Adenosine-1,3-diazaphenoxazine Derivative for Selective Base Pair Formation with 8-Oxo-2'-deoxyguanosine in DNA // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133, № 19. P. 7272–7275. doi: 10.1021/ja200327u.
29. Taniguchi Y. et al. 2,6-Diaminopurine nucleoside derivative of 9-ethyloxy-2-oxo-1,3-diazaphenoxazine (2-amino-Adap) for recognition of 8-oxo-dG in DNA // *Bioorg. Med. Chem.* 2014. Vol. 22, № 5. P. 1634–1641. doi: 10.1016/j.bmc.2014.01.024.
30. Koga Y. et al. Recognition and detection of 8-oxo-rG in RNA using the DNA/OMeRNA chimera probes containing fluorescent adenosine-diazaphenoxazine analog // *Bioorg. Med. Chem.* 2016. Vol. 24, № 6. P. 1308–1313. doi: 10.1016/j.bmc.2016.02.001.
31. Fuchi Y., Sasaki S. Efficient Covalent Capture of 8-Nitroguanosine *via* a Multiple Hydrogen-Bonded Complex // *Org. Lett.* 2014. Vol. 16, № 6. P. 1760–1763. doi: 10.1021/ol500452r.
32. Fuchi Y., Obayashi H., Sasaki S. Development of New 1,3-Diazaphenoxazine Derivatives (ThioG-Grasp) to Covalently Capture 8-Thioguanosine // *Molecules.* 2015. Vol. 20, № 1. P. 1078–1087. doi: 10.3390/molecules20011078.

33. Fuchi Y. et al. Artificial Host Molecules to Covalently Capture 8-Nitro-cGMP in Neutral Aqueous Solutions and in Cells // *Bioconjug. Chem.* 2021. Vol. 32, № 2. P. 385–393. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00012.
34. Shen W., Hou Y., Yi Y., Li F., He C., Wang J. G-Clamp Heterocycle Modification Containing Interstrand Photo-Cross-Linker to Capture Intracellular MicroRNA Targets // *J. Am. Chem. Soc.* 2024. Vol. 146, № 18. P. 12778–12789. doi: 10.1021/jacs.4c02901.
35. Watson J.D., Crick F.H.C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid // *Nature*. 1953. Vol. 171, № 4356. P. 737–738. doi: 10.1038/171737a0.
36. Bochman M.L., Paeschke K., Zakian V.A. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures // *Nat. Rev. Genet.* 2012. Vol. 13, № 11. P. 770–780. doi: 10.1038/nrg3296.
37. Cesare Maricola F. et al. Competitive binding exchange between alkali metal ions ( $K^+$ ,  $Rb^+$ , and  $Cs^+$ ) and  $Na^+$  ions bound to the dimeric quadruplex  $[d(G_4 T_4 G_4)]_2$ : a  $^{23}Na$  and  $^1H$  NMR study // *Magn. Reson. Chem.* 2009. Vol. 47, № 12. P. 1036–1042. doi: 10.1002/mrc.2509.
38. Smirnov I.V. et al. Pb EXAFS Studies on DNA Quadruplexes: Identification of Metal Ion Binding Site // *Biochemistry*. 2002. Vol. 41, № 40. P. 12133–12139. doi: 10.1021/bi020310p.
39. Kwan I.C.M., She Y.-M., Wu G. Trivalent lanthanide metal ions promote formation of stacking G-quartets // *Chem. Commun.* 2007. № 41. P. 4286. doi: 10.1039/b710299b.
40. Pedrosa I.M. et al. Induction of parallel human telomeric G-quadruplex structures by  $Sr^{2+}$  // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 358, № 1. P. 298–303. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.126.
41. Fojtik P. The fragile X chromosome (GCC) repeat folds into a DNA tetraplex at neutral pH // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29, № 22. P. 4684–4690. doi: 10.1093/nar/29.22.4684.
42. Gurung S.P. et al. The importance of loop length on the stability of i-motif structures // *Chem. Commun.* 2015. Vol. 51, № 26. P. 5630–5632. doi: 10.1039/C4CC07279K.
43. Fleming A.M. et al.  $4n - 1$  Is a “Sweet Spot” in DNA i-Motif Folding of 2'-Deoxycytidine Homopolymers // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. Vol. 139, № 13. P. 4682–4689. doi: 10.1021/jacs.6b10117.
44. Wright E.P., Huppert J.L., Waller Z.A.E. Identification of multiple genomic DNA sequences which form i-motif structures at neutral pH // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 6. P. 2951–2959. doi: 10.1093/nar/gkx090.
45. Wright E.P. et al. Epigenetic modification of cytosines fine tunes the stability of i-motif DNA // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, № 1. P. 55–62. doi: 10.1093/nar/gkz1082.

46. Dzatko S. et al. Evaluation of the Stability of DNA i-Motifs in the Nuclei of Living Mammalian Cells // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018. Vol. 57, № 8. P. 2165–2169. doi: 10.1002/anie.201712284.
47. Víšková P. et al. In-cell NMR suggests that DNA i-motif levels are strongly depleted in living human cells // *Nat. Commun.* 2024. Vol. 15, № 1. P. 1992. doi: 10.1038/s41467-024-46221-y.
48. Bryan T.M. G-Quadruplexes at Telomeres: Friend or Foe? // *Molecules.* 2020. Vol. 25, № 16. P. 3686. doi: 10.3390/molecules25163686.
49. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1961. Vol. 25, № 3. P. 585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
50. Greider C.W., Blackburn E.H. Telomeres, Telomerase and Cancer // *Sci. Am.* 1996. Vol. 274, № 2. P. 92–97. doi: 10.1038/scientificamerican0296-92.
51. Wright W.E. et al. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end // *Genes Dev.* 1997. Vol. 11, № 21. P. 2801–2809. doi: 10.1101/gad.11.21.2801.
52. Wang Y., Patel D.J. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex // *Structure.* 1993. Vol. 1, № 4. P. 263–282. doi: 10.1016/0969-2126(93)90015-9.
53. Parkinson G.N., Lee M.P.H., Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA // *Nature.* 2002. Vol. 417, № 6891. P. 876–880. doi: 10.1038/nature755.
54. Luu K.N. et al. Structure of the Human Telomere in K<sup>+</sup> Solution: An Intramolecular (3 + 1) G-Quadruplex Scaffold // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128, № 30. P. 9963–9970. doi: 10.1021/ja062791w.
55. Dai J. et al. Structure of the intramolecular human telomeric G-quadruplex in potassium solution: a novel adenine triple formation // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 35, № 7. P. 2440–2450. doi: 10.1093/nar/gkm009.
56. Matsugami A. et al. Structure of a human telomeric DNA sequence stabilized by 8-bromoguanosine substitutions, as determined by NMR in a K<sup>+</sup> solution // *FEBS J.* 2007. Vol. 274, № 14. P. 3545–3556. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05881.x.
57. Phan A.T. et al. Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K<sup>+</sup> solution † // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 35, № 19. P. 6517–6525. doi: 10.1093/nar/gkm706.
58. Dai J. et al. Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K<sup>+</sup> solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 35, № 15. P. 4927–4940. doi: 10.1093/nar/gkm522.



59. Ray S. et al. G-quadruplex formation in telomeres enhances POT1/TPP1 protection against RPA binding // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. Vol. 111, № 8. P. 2990–2995. doi: 10.1073/pnas.1321436111.
60. Chaires J.B. et al. Human POT1 unfolds G-quadruplexes by conformational selection // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, № 9. P. 4976–4991. doi: 10.1093/nar/gkaa202.
61. Qureshi M.H. et al. Replication Protein A Unfolds G-Quadruplex Structures with Varying Degrees of Efficiency // *J. Phys. Chem. B.* 2012. Vol. 116, № 19. P. 5588–5594. doi: 10.1021/jp300546u.
62. Bhattacharjee A. et al. Dynamic DNA binding, junction recognition and G4 melting activity underlie the telomeric and genome-wide roles of human CST // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 21. P. 12311–12324. doi: 10.1093/nar/gkx878.
63. Biffi G., Tannahill D., Balasubramanian S. An Intramolecular G-Quadruplex Structure Is Required for Binding of Telomeric Repeat-Containing RNA to the Telomeric Protein TRF2 // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Vol. 134, № 29. P. 11974–11976. doi: 10.1021/ja305734x.
64. Purohit G. et al. Extratelomeric Binding of the Telomere Binding Protein TRF2 at the *PCGF3* Promoter Is G-Quadruplex Motif-Dependent // *Biochemistry.* 2018. Vol. 57, № 16. P. 2317–2324. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00019.
65. Wu W. et al. HERC2 Facilitates BLM and WRN Helicase Complex Interaction with RPA to Suppress G-Quadruplex DNA // *Cancer Res.* 2018. Vol. 78, № 22. P. 6371–6385. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1877.
66. Lin W. et al. Mammalian DNA2 helicase/nuclease cleaves G-quadruplex DNA and is required for telomere integrity // *EMBO J.* 2013. Vol. 32, № 10. P. 1425–1439. doi: 10.1038/emboj.2013.88.
67. Vannier J.-B. et al. RTEL1 Is a Replisome-Associated Helicase That Promotes Telomere and Genome-Wide Replication // *Science.* 2013. Vol. 342, № 6155. P. 239–242. doi: 10.1126/science.1241779.
68. Takahama K. et al. Regulation of Telomere Length by G-Quadruplex Telomere DNA- and TERRA-Binding Protein TLS/FUS // *Chem. Biol.* 2013. Vol. 20, № 3. P. 341–350. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.02.013.
69. Krüger A.C. et al. Interaction of hnRNP A1 with telomere DNA G-quadruplex structures studied at the single molecule level // *Eur. Biophys. J.* 2010. Vol. 39, № 9. P. 1343–1350. doi: 10.1007/s00249-010-0587-x.
70. Hudson J.S. et al. Recognition and Binding of Human Telomeric G-Quadruplex DNA by Unfolding Protein 1 // *Biochemistry.* 2014. Vol. 53, № 20. P. 3347–3356. doi: 10.1021/bi500351u.

71. Paudel B.P. et al. A mechanism for the extension and unfolding of parallel telomeric G-quadruplexes by human telomerase at single-molecule resolution // *eLife*. 2020. Vol. 9. P. e56428. doi: 10.7554/eLife.56428.
72. Hänsel-Hertsch R. et al. G-quadruplex structures mark human regulatory chromatin // *Nat. Genet.* 2016. Vol. 48, № 10. P. 1267–1272. doi: 10.1038/ng.3662.
73. Neidle S. Quadruplex Nucleic Acids as Novel Therapeutic Targets // *J. Med. Chem.* 2016. Vol. 59, № 13. P. 5987–6011. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01835.
74. Li F., Zhou J. G-quadruplexes from non-coding RNAs // *J. Mol. Med.* 2023. Vol. 101, № 6. P. 621–635. doi: 10.1007/s00109-023-02314-7.
75. Lee C.-Y. et al. 5'UTR G-quadruplex structure enhances translation in size dependent manner // *Nat. Commun.* 2024. Vol. 15, № 1. P. 3963. doi: 10.1038/s41467-024-48247-8.
76. Falabella M. et al. Potential Roles for G-Quadruplexes in Mitochondria // *Curr. Med. Chem.* 2019. Vol. 26, № 16. P. 2918–2932. doi: 10.2174/0929867325666180228165527.
77. Varshney D. et al. RNA G-quadruplex structures control ribosomal protein production // *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11, № 1. P. 22735. doi: 10.1038/s41598-021-01847-6.
78. Datta A. et al. G-Quadruplex Assembly by Ribosomal DNA: Emerging Roles in Disease Pathogenesis and Cancer Biology // *Cytogenet. Genome Res.* 2021. Vol. 161, № 6–7. P. 285–296. doi: 10.1159/000516394.
79. Kubota A. et al. Analysis of c-kit expression of human erythroleukemia cell line, HEL: Clonal variation and relationship with erythroid and megakaryocytic phenotype // *Leuk. Res.* 1995. Vol. 19, № 4. P. 283–290. doi: 10.1016/0145-2126(94)00160-C.
80. Lennartsson J., Rönnstrand L. Stem Cell Factor Receptor/c-Kit: From Basic Science to Clinical Implications // *Physiol. Rev.* 2012. Vol. 92, № 4. P. 1619–1649. doi: 10.1152/physrev.00046.2011.
81. Yamamoto K. et al. Characterization of the Promoter Region of the Human *c-kit* Proto-oncogene // *Jpn. J. Cancer Res.* 1993. Vol. 84, № 11. P. 1136–1144. doi: 10.1111/j.1349-7006.1993.tb02813.x.
82. Kotar A. et al. Two-quartet kit\* G-quadruplex is formed via double-stranded pre-folded structure // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, № 5. P. 2641–2653. doi: 10.1093/nar/gky1269.
83. Rankin S. et al. Putative DNA Quadruplex Formation within the Human *c-kit* Oncogene // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127, № 30. P. 10584–10589. doi: 10.1021/ja050823u.
84. Hsu S.-T.D. et al. A G-Rich Sequence within the *c-kit* Oncogene Promoter Forms a Parallel G-Quadruplex Having Asymmetric G-Tetrad Dynamics // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. Vol. 131, № 37. P. 13399–13409. doi: 10.1021/ja904007p.

85. Phan A.T. et al. Structure of an Unprecedented G-Quadruplex Scaffold in the Human *c-kit* Promoter // J. Am. Chem. Soc. 2007. Vol. 129, № 14. P. 4386–4392. doi: 10.1021/ja068739h.
86. Raiber E.-A. et al. A non-canonical DNA structure is a binding motif for the transcription factor SP1 in vitro // Nucleic Acids Res. 2012. Vol. 40, № 4. P. 1499–1508. doi: 10.1093/nar/gkr882.
87. Kuryavyi V., Phan A.T., Patel D.J. Solution structures of all parallel-stranded monomeric and dimeric G-quadruplex scaffolds of the human c-kit2 promoter // Nucleic Acids Res. 2010. Vol. 38, № 19. P. 6757–6773. doi: 10.1093/nar/gkq558.
88. Ducani C. et al. Interplay of Three G-Quadruplex Units in the *KIT* Promoter // J. Am. Chem. Soc. 2019. Vol. 141, № 26. P. 10205–10213. doi: 10.1021/jacs.8b12753.
89. Zorzan E. et al. Screening of candidate G-quadruplex ligands for the human *c-KIT* promotorial region and their effects in multiple *in-vitro* models // Oncotarget. 2016. Vol. 7, № 16. P. 21658–21675. doi: 10.18632/oncotarget.7808.
90. Dang C.V. et al. The c-Myc target gene network // Semin. Cancer Biol. 2006. Vol. 16, № 4. P. 253–264. doi: 10.1016/j.semcancer.2006.07.014.
91. Dang C.V. et al. Function of the c-Myc Oncogenic Transcription Factor // Exp. Cell Res. 1999. Vol. 253, № 1. P. 63–77. doi: 10.1006/excr.1999.4686.
92. Phan A.T., Modi Y.S., Patel D.J. Propeller-Type Parallel-Stranded G-Quadruplexes in the Human *c-myc* Promoter // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126, № 28. P. 8710–8716. doi: 10.1021/ja048805k.
93. Siddiqui-Jain A. et al. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-*MYC* transcription // Proc. Natl. Acad. Sci. 2002. Vol. 99, № 18. P. 11593–11598. doi: 10.1073/pnas.182256799.
94. Bahls B. et al. G-Quadruplexes in c-MYC Promoter as Targets for Cancer Therapy // Biomedicines. 2023. Vol. 11, № 3. P. 969. doi: 10.3390/biomedicines11030969.
95. González V. et al. Identification and Characterization of Nucleolin as a c-myc G-quadruplex-binding Protein // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284, № 35. P. 23622–23635. doi: 10.1074/jbc.M109.018028.
96. Thakur R.K. et al. Metastases suppressor NM23-H2 interaction with G-quadruplex DNA within c-MYC promoter nuclease hypersensitive element induces c-MYC expression // Nucleic Acids Res. 2009. Vol. 37, № 1. P. 172–183. doi: 10.1093/nar/gkn919.
97. Adams J.M., Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy // Oncogene. 2007. Vol. 26, № 9. P. 1324–1337. doi: 10.1038/sj.onc.1210220.

98. Dexheimer T.S., Sun D., Hurley L.H. Deconvoluting the Structural and Drug-Recognition Complexity of the G-Quadruplex-Forming Region Upstream of the *bcl-2* P1 Promoter // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128, № 16. P. 5404–5415. doi: 10.1021/ja0563861.
99. Dai J. et al. NMR solution structure of the major G-quadruplex structure formed in the human BCL2 promoter region // Nucleic Acids Res. 2006. Vol. 34, № 18. P. 5133–5144. doi: 10.1093/nar/gkl610.
100. Agrawal P. et al. The Major G-Quadruplex Formed in the Human BCL-2 Proximal Promoter Adopts a Parallel Structure with a 13-nt Loop in K<sup>+</sup> Solution // J. Am. Chem. Soc. 2014. Vol. 136, № 5. P. 1750–1753. doi: 10.1021/ja4118945.
101. Pandya N. et al. G-quadruplex-mediated specific recognition, stabilization and transcriptional repression of *bcl-2* by small molecule // Arch. Biochem. Biophys. 2023. Vol. 734. P. 109483. doi: 10.1016/j.abb.2022.109483.
102. Singh M. et al. BCL2 G quadruplex-binding small molecules: Current status and prospects for the development of next-generation anticancer therapeutics // Drug Discov. Today. 2022. Vol. 27, № 9. P. 2551–2561. doi: 10.1016/j.drudis.2022.06.002.
103. Masuzawa T., Oyoshi T. Roles of the RGG Domain and RNA Recognition Motif of Nucleolin in G-Quadruplex Stabilization // ACS Omega. 2020. Vol. 5, № 10. P. 5202–5208. doi: 10.1021/acsomega.9b04221.
104. Mao S.-Q. et al. DNA G-quadruplex structures mold the DNA methylome // Nat. Struct. Mol. Biol. 2018. Vol. 25, № 10. P. 951–957. doi: 10.1038/s41594-018-0131-8.
105. Saha D. et al. Epigenetic suppression of human telomerase (hTERT) is mediated by the metastasis suppressor NME2 in a G-quadruplex-dependent fashion // J. Biol. Chem. 2017. Vol. 292, № 37. P. 15205–15215. doi: 10.1074/jbc.M117.792077.
106. Georgakopoulos-Soares I. et al. High-throughput techniques enable advances in the roles of DNA and RNA secondary structures in transcriptional and post-transcriptional gene regulation // Genome Biol. 2022. Vol. 23, № 1. P. 159. doi: 10.1186/s13059-022-02727-6.
107. Hussain T. et al. Transcription regulation of CDKN1A (p21/CIP1/WAF1) by TRF2 is epigenetically controlled through the REST repressor complex // Sci. Rep. 2017. Vol. 7, № 1. P. 11541. doi: 10.1038/s41598-017-11177-1.
108. Tikhonova P. et al. DNA G-Quadruplexes Contribute to CTCF Recruitment // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 13. P. 7090. doi: 10.3390/ijms22137090.
109. Li L. et al. YY1 interacts with guanine quadruplexes to regulate DNA looping and gene expression // Nat. Chem. Biol. 2021. Vol. 17, № 2. P. 161–168. doi: 10.1038/s41589-020-00695-1.

110. Varshney D. et al. The regulation and functions of DNA and RNA G-quadruplexes // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020. Vol. 21, № 8. P. 459–474. doi: 10.1038/s41580-020-0236-x.
111. Školáková P. et al. Composite 5-methylations of cytosines modulate i-motif stability in a sequence-specific manner: Implications for DNA nanotechnology and epigenetic regulation of plant telomeric DNA // Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 2020. Vol. 1864, № 9. P. 129651. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129651.
112. Garavís M., González C., Villasante A. On the origin of the eukaryotic chromosome: the role of noncanonical DNA structures in telomere evolution // Genome Biol. Evol. 2013. Vol. 5, № 6. P. 1142–1150. doi: 10.1093/gbe/evt079.
113. Zanin I. et al. Genome-wide mapping of i-motifs reveals their association with transcription regulation in live human cells // Nucleic Acids Res. 2023. Vol. 51, № 16. P. 8309–8321. doi: 10.1093/nar/gkad626.
114. Kendrick S. et al. The Dynamic Character of the *BCL2* Promoter i-Motif Provides a Mechanism for Modulation of Gene Expression by Compounds That Bind Selectively to the Alternative DNA Hairpin Structure // J. Am. Chem. Soc. 2014. Vol. 136, № 11. P. 4161–4171. doi: 10.1021/ja410934b.
115. Kang H.-J. et al. The Transcriptional Complex Between the *BCL2* i-Motif and hnRNP LL Is a Molecular Switch for Control of Gene Expression That Can Be Modulated by Small Molecules // J. Am. Chem. Soc. 2014. Vol. 136, № 11. P. 4172–4185. doi: 10.1021/ja4109352.
116. Kaloni D. et al. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy // Apoptosis. 2023. Vol. 28, № 1–2. P. 20–38. doi: 10.1007/s10495-022-01780-7.
117. Li X. et al. Upregulation of BCL-2 by acridone derivative through gene promoter i-motif for alleviating liver damage of NAFLD/NASH // Nucleic Acids Res. 2020. Vol. 48, № 15. P. 8255–8268. doi: 10.1093/nar/gkaa615.
118. Kaiser C.E. et al. Insight into the Complexity of the i-Motif and G-Quadruplex DNA Structures Formed in the *KRAS* Promoter and Subsequent Drug-Induced Gene Repression // J. Am. Chem. Soc. 2017. Vol. 139, № 25. P. 8522–8536. doi: 10.1021/jacs.7b02046.
119. Heldin C.-H., Westermark B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor // Physiol. Rev. 1999. Vol. 79, № 4. P. 1283–1316. doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1283.
120. Wu E. et al. Comprehensive Dissection of PDGF-PDGFR Signaling Pathways in PDGFR Genetically Defined Cells // PLoS ONE / ed. Rutherford S. 2008. Vol. 3, № 11. P. e3794. doi: 10.1371/journal.pone.0003794.

121. Brown R.V. et al. The Consequences of Overlapping G-Quadruplexes and i-Motifs in the Platelet-Derived Growth Factor Receptor  $\beta$  Core Promoter Nuclease Hypersensitive Element Can Explain the Unexpected Effects of Mutations and Provide Opportunities for Selective Targeting of Both Structures by Small Molecules To Downregulate Gene Expression // J. Am. Chem. Soc. 2017. Vol. 139, № 22. P. 7456–7475. doi: 10.1021/jacs.6b10028.
122. Daubner S.C., Le T., Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis // Arch. Biochem. Biophys. 2011. Vol. 508, № 1. P. 1–12. doi: 10.1016/j.abb.2010.12.017.
123. Banerjee K. et al. Regulation of tyrosine hydroxylase transcription by hnRNP K and DNA secondary structure // Nat. Commun. 2014. Vol. 5, № 1. P. 5769. doi: 10.1038/ncomms6769.
124. Farhath M.M. et al. G-Quadruplex-Enabling Sequence within the Human Tyrosine Hydroxylase Promoter Differentially Regulates Transcription // Biochemistry. 2015. Vol. 54, № 36. P. 5533–5545. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00209.
125. Niu K. et al. BmILF and i-motif structure are involved in transcriptional regulation of BmPOUM2 in *Bombyx mori* // Nucleic Acids Res. 2018. Vol. 46, № 4. P. 1710–1723. doi: 10.1093/nar/gkx1207.
126. Levens D. How the c-myc Promoter Works and Why It Sometimes Does Not // JNCI Monogr. 2008. Vol. 2008, № 39. P. 41–43. doi: 10.1093/jncimonographs/lgn004.
127. Sutherland C. et al. A Mechanosensor Mechanism Controls the G-Quadruplex/i-Motif Molecular Switch in the *MYC* Promoter NHE III<sub>1</sub> // J. Am. Chem. Soc. 2016. Vol. 138, № 42. P. 14138–14151. doi: 10.1021/jacs.6b09196.
128. Shu B. et al. Syntheses and evaluation of new acridone derivatives for selective binding of oncogene c- *myc* promoter i-motifs in gene transcriptional regulation // Chem. Commun. 2018. Vol. 54, № 16. P. 2036–2039. doi: 10.1039/C8CC00328A.
129. Miller D.M. et al. c-Myc and Cancer Metabolism // Clin. Cancer Res. 2012. Vol. 18, № 20. P. 5546–5553. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0977.
130. Guo K. et al. Intramolecularly folded G-quadruplex and i-motif structures in the proximal promoter of the vascular endothelial growth factor gene // Nucleic Acids Res. 2008. Vol. 36, № 14. P. 4598–4608. doi: 10.1093/nar/gkn380.
131. Greco M.L., Folini M., Sissi C. Double stranded promoter region of BRAF undergoes to structural rearrangement in nearly physiological conditions // FEBS Lett. 2015. Vol. 589, № 16. P. 2117–2123. doi: 10.1016/j.febslet.2015.06.025.
132. Li H. et al. The formation and characteristics of the i-motif structure within the promoter of the c-myc proto-oncogene // J. Photochem. Photobiol. B. 2016. Vol. 162. P. 625–632. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.07.035.

133. Miglietta G. et al. GC-elements controlling HRAS transcription form i-motif structures unfolded by heterogeneous ribonucleoprotein particle A1 // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 18097. doi: 10.1038/srep18097.
134. Journey S.N. et al. Probing the *hras* -1<sup>Y</sup> i-motif with small molecules // *MedChemComm.* 2018. Vol. 9, № 12. P. 2000–2007. doi: 10.1039/C8MD00311D.
135. Rogers R.A., Fleming A.M., Burrows C.J. Unusual Isothermal Hysteresis in DNA i-Motif pH Transitions: A Study of the RAD17 Promoter Sequence // *Biophys. J.* 2018. Vol. 114, № 8. P. 1804–1815. doi: 10.1016/j.bpj.2018.03.012.
136. Rogers R.A., Fleming A.M., Burrows C.J. Rapid Screen of Potential i-Motif Forming Sequences in DNA Repair Gene Promoters // *ACS Omega.* 2018. Vol. 3, № 8. P. 9630–9635. doi: 10.1021/acsomega.8b01551.
137. Xu Y. Formation of the G-quadruplex and i-motif structures in retinoblastoma susceptibility genes (Rb) // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34, № 3. P. 949–954. doi: 10.1093/nar/gkj485.
138. Benabou S. et al. i-motif structures in long cytosine-rich sequences found upstream of the promoter region of the SMARCA4 gene // *Biochimie.* 2017. Vol. 140. P. 20–33. doi: 10.1016/j.biochi.2017.06.005.
139. Abdelhamid M.A.S., Gates A.J., Waller Z.A.E. Destabilization of i-Motif DNA at Neutral pH by G-Quadruplex Ligands // *Biochemistry.* 2019. Vol. 58, № 4. P. 245–249. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00968.
140. Chen Y. et al. Insights into the biomedical effects of carboxylated single-wall carbon nanotubes on telomerase and telomeres // *Nat. Commun.* 2012. Vol. 3, № 1. P. 1074. doi: 10.1038/ncomms2091.
141. Wolski P. et al. Interaction of Human Telomeric i-Motif DNA with Single-Walled Carbon Nanotubes: Insights from Molecular Dynamics Simulations // *J. Phys. Chem. B.* 2019. Vol. 123, № 49. P. 10343–10353. doi: 10.1021/acs.jpcc.9b07292.
142. Figueiredo J., Mergny J.-L., Cruz C. G-quadruplex ligands in cancer therapy: Progress, challenges, and clinical perspectives // *Life Sci.* 2024. Vol. 340. P. 122481. doi: 10.1016/j.lfs.2024.122481.
143. Amato R. et al. G-quadruplex Stabilization Fuels the ALT Pathway in ALT-positive Osteosarcoma Cells // *Genes.* 2020. Vol. 11, № 3. P. 304. doi: 10.3390/genes11030304.
144. Grand C.L. et al. The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo // *Mol. Cancer Ther.* 2002. Vol. 1, № 8. P. 565–573.

145. Salvati E. et al. Evidence for G-quadruplex in the promoter of vegfr-2 and its targeting to inhibit tumor angiogenesis // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42, № 5. P. 2945–2957. doi: 10.1093/nar/gkt1289.
146. Majumder P. et al. G-quadruplexes in MTOR and induction of autophagy // *Sci. Rep.* 2024. Vol. 14, № 1. P. 2525. doi: 10.1038/s41598-024-52561-y.
147. Bidzinska J. et al. G-Quadruplex Structures in the Human Genome as Novel Therapeutic Targets // *Molecules.* 2013. Vol. 18, № 10. P. 12368–12395. doi: 10.3390/molecules181012368.
148. McLuckie K.I.E. et al. G-Quadruplex DNA as a Molecular Target for Induced Synthetic Lethality in Cancer Cells // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. Vol. 135, № 26. P. 9640–9643. doi: 10.1021/ja404868t.
149. Xu H. et al. CX-5461 is a DNA G-quadruplex stabilizer with selective lethality in BRCA1/2 deficient tumours // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8, № 1. P. 14432. doi: 10.1038/ncomms14432.
150. Olivieri M. et al. A Genetic Map of the Response to DNA Damage in Human Cells // *Cell.* 2020. Vol. 182, № 2. P. 481–496.e21. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.040.
151. Bossaert M. et al. Transcription-associated topoisomerase 2 $\alpha$  (TOP2A) activity is a major effector of cytotoxicity induced by G-quadruplex ligands // *eLife.* 2021. Vol. 10. P. e65184. doi: 10.7554/eLife.65184.
152. Iachettini S., Biroccio A., Zizza P. Therapeutic Use of G4-Ligands in Cancer: State-of-the-Art and Future Perspectives // *Pharmaceuticals.* 2024. Vol. 17, № 6. P. 771. doi: 10.3390/ph17060771.
153. Manaia M.N., Chiorcea-Paquim A.-M. Cationic porphyrin TMPyP4 redox behaviour and interaction with nucleic acids: Towards a new methodology for screening porphyrin-based anticancer drugs // *Electrochimica Acta.* 2023. Vol. 462. P. 142749. doi: 10.1016/j.electacta.2023.142749.
154. Rizzo A. et al. Identification of novel RHPS4-derivative ligands with improved toxicological profiles and telomere-targeting activities // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2014. Vol. 33, № 1. P. 81. doi: 10.1186/s13046-014-0081-x.
155. Taetz S. et al. Biopharmaceutical Characterization of the Telomerase Inhibitor BRACO19 // *Pharm. Res.* 2006. Vol. 23, № 5. P. 1031–1037. doi: 10.1007/s11095-006-0026-y.
156. Chen B.-J. et al. Small Molecules Targeting c-Myc Oncogene: Promising Anti-Cancer Therapeutics // *Int. J. Biol. Sci.* 2014. Vol. 10, № 10. P. 1084–1096. doi: 10.7150/ijbs.10190.
157. Drygin D. et al. Anticancer Activity of CX-3543: A Direct Inhibitor of rRNA Biogenesis // *Cancer Res.* 2009. Vol. 69, № 19. P. 7653–7661. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1304.



158. Sanchez-Martin V., Soriano M., Garcia-Salcedo J.A. Quadruplex Ligands in Cancer Therapy // *Cancers*. 2021. Vol. 13, № 13. P. 3156. doi: 10.3390/cancers13133156.
159. Sullivan H.-J., Chen B., Wu C. Molecular Dynamics Study on the Binding of an Anticancer DNA G-Quadruplex Stabilizer, CX-5461, to Human Telomeric, c-KIT1, and c-Myc G-Quadruplexes and a DNA Duplex // *J. Chem. Inf. Model.* 2020. Vol. 60, № 10. P. 5203–5224. doi: 10.1021/acs.jcim.0c00632.
160. Drygin D. et al. Targeting RNA Polymerase I with an Oral Small Molecule CX-5461 Inhibits Ribosomal RNA Synthesis and Solid Tumor Growth // *Cancer Res.* 2011. Vol. 71, № 4. P. 1418–1430. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1728.
161. Zimmer J. et al. Targeting BRCA1 and BRCA2 Deficiencies with G-Quadruplex-Interacting Compounds // *Mol. Cell.* 2016. Vol. 61, № 3. P. 449–460. doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.004.
162. Ahmed A.A. et al. Asymmetrically Substituted Quadruplex-Binding Naphthalene Diimide Showing Potent Activity in Pancreatic Cancer Models // *ACS Med. Chem. Lett.* 2020. Vol. 11, № 8. P. 1634–1644. doi: 10.1021/acsmmedchemlett.0c00317.
163. Ahmed A.A. et al. The Potent G-Quadruplex-Binding Compound QN-302 Downregulates S100P Gene Expression in Cells and in an In Vivo Model of Pancreatic Cancer // *Molecules*. 2023. Vol. 28, № 6. P. 2452. doi: 10.3390/molecules28062452.
164. Biver T. Discriminating between Parallel, Anti-Parallel and Hybrid G-Quadruplexes: Mechanistic Details on Their Binding to Small Molecules // *Molecules*. 2022. Vol. 27, № 13. P. 4165. doi: 10.3390/molecules27134165.
165. Chen L. et al. DNA G-Quadruplex in Human Telomeres and Oncogene Promoters: Structures, Functions, and Small Molecule Targeting // *Acc. Chem. Res.* 2022. Vol. 55, № 18. P. 2628–2646. doi: 10.1021/acs.accounts.2c00337.
166. Kench T. et al. Dimeric Metal-Salphen Complexes Which Target Multimeric G-Quadruplex DNA // *Bioconj. Chem.* 2023. Vol. 34, № 5. P. 911–921. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.3c00114.
167. Cookson J.C., Heald R.A., Stevens M.F.G. Antitumor Polycyclic Acridines. 17. Synthesis and Pharmaceutical Profiles of Pentacyclic Acridinium Salts Designed To Destabilize Telomeric Integrity // *J. Med. Chem.* 2005. Vol. 48, № 23. P. 7198–7207. doi: 10.1021/jm058031y.
168. Ravichandran S. et al. The effect of hairpin loop on the structure and gene expression activity of the long-loop G-quadruplex // *Nucleic Acids Res.* 2021. Vol. 49, № 18. P. 10689–10706. doi: 10.1093/nar/gkab739.

169. Cadoni E. et al. Beyond small molecules: targeting G-quadruplex structures with oligonucleotides and their analogues // *Nucleic Acids Res.* 2021. Vol. 49, № 12. P. 6638–6659. doi: 10.1093/nar/gkab334.
170. Cadoni E. et al. A red light-triggered chemical tool for sequence-specific alkylation of G-quadruplex and I-motif DNA // *Nucleic Acids Res.* 2023. Vol. 51, № 9. P. 4112–4125. doi: 10.1093/nar/gkad189.
171. Nele V. et al. Lipid nanoparticles for RNA delivery: Self-assembling vs driven-assembling strategies // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2024. Vol. 208. P. 115291. doi: 10.1016/j.addr.2024.115291.
172. Nele V. et al. Unravelling the role of lipid composition on liposome-protein interactions // *J. Liposome Res.* 2024. Vol. 34, № 1. P. 88–96. doi: 10.1080/08982104.2023.2224449.
173. Sun D. et al. Inhibition of Human Telomerase by a G-Quadruplex-Interactive Compound // *J. Med. Chem.* 1997. Vol. 40, № 14. P. 2113–2116. doi: 10.1021/jm970199z.
174. Fedoroff O.Yu. et al. Cationic Porphyrins Promote the Formation of i-Motif DNA and Bind Peripherally by a Nonintercalative Mechanism // *Biochemistry.* 2000. Vol. 39, № 49. P. 15083–15090. doi: 10.1021/bi001528j.
175. Bialis T. et al. Transcriptional consequences of targeting the i-motif structure of the c-Myc promoter with TMPyP4 // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67, № 9\_Supplement. P. 3169–3169.
176. Pagano A. et al. Common G-Quadruplex Binding Agents Found to Interact With i-Motif-Forming DNA: Unexpected Multi-Target-Directed Compounds // *Front. Chem.* 2018. Vol. 6. P. 281. doi: 10.3389/fchem.2018.00281.
177. Yang Y. et al. Characterization of interaction between Bcl-2 oncogene promoter I-Motif DNA and flavonoids using electrospray ionization mass spectrometry and pressure-assisted capillary electrophoresis frontal analysis // *Talanta.* 2020. Vol. 215. P. 120885. doi: 10.1016/j.talanta.2020.120885.
178. Sheng Q. et al. Identification of new DNA i-motif binding ligands through a fluorescent intercalator displacement assay // *Org. Biomol. Chem.* 2017. Vol. 15, № 27. P. 5669–5673. doi: 10.1039/C7OB00710H.
179. Kuang G. et al. Syntheses and Evaluation of New Bisacridine Derivatives for Dual Binding of G-Quadruplex and i-Motif in Regulating Oncogene *c-myc* Expression // *J. Med. Chem.* 2020. Vol. 63, № 17. P. 9136–9153. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01917.
180. Alves Ferreira-Bravo I. et al. Selection of 2'-deoxy-2'-fluoroarabinonucleotide (FANA) aptamers that bind HIV-1 reverse transcriptase with picomolar affinity // *Nucleic Acids Res.* 2015. P. gkv1057. doi: 10.1093/nar/gkv1057.

181. Chen L. et al. The isolation of an RNA aptamer targeting to p53 protein with single amino acid mutation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015. Vol. 112, № 32. P. 10002–10007. doi: 10.1073/pnas.1502159112.
182. Zhou J., Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017. Vol. 16, № 3. P. 181–202. doi: 10.1038/nrd.2016.199.
183. Liu J., Lu Y. Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1, № 1. P. 246–252. doi: 10.1038/nprot.2006.38.
184. Kosuri S., Church G.M. Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications // *Nat. Methods.* 2014. Vol. 11, № 5. P. 499–507. doi: 10.1038/nmeth.2918.
185. Jazayeri M.H. et al. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies // *Sens. Bio-Sens. Res.* 2016. Vol. 9. P. 17–22. doi: 10.1016/j.sbsr.2016.04.002.
186. Crivianu-Gaita V., Thompson M. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements // *Biosens. Bioelectron.* 2016. Vol. 85. P. 32–45. doi: 10.1016/j.bios.2016.04.091.
187. Li F. et al. Aptamers Facilitating Amplified Detection of Biomolecules // *Anal. Chem.* 2015. Vol. 87, № 1. P. 274–292. doi: 10.1021/ac5037236.
188. Baird G.S. Where Are All the Aptamers? // *Am. J. Clin. Pathol.* 2010. Vol. 134, № 4. P. 529–531. doi: 10.1309/AJCPFU4CG2WGJJKS.
189. Stark B.C. et al. Ribonuclease P: an enzyme with an essential RNA component. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1978. Vol. 75, № 8. P. 3717–3721. doi: 10.1073/pnas.75.8.3717.
190. Kruger K. et al. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena // *Cell.* 1982. Vol. 31, № 1. P. 147–157. doi: 10.1016/0092-8674(82)90414-7.
191. Guerrier-Takada C. et al. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme // *Cell.* 1983. Vol. 35, № 3. P. 849–857. doi: 10.1016/0092-8674(83)90117-4.
192. Tuerk C., Gold L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase // *Science.* 1990. Vol. 249, № 4968. P. 505–510. doi: 10.1126/science.2200121.
193. Wilson C., Szostak J.W. In vitro evolution of a self-alkylating ribozyme // *Nature.* 1995. Vol. 374, № 6525. P. 777–782. doi: 10.1038/374777a0.
194. Bock L.C. et al. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin // *Nature.* 1992. Vol. 355, № 6360. P. 564–566. doi: 10.1038/355564a0.

195. Ellington A.D., Szostak J.W. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures // *Nature*. 1992. Vol. 355, № 6363. P. 850–852. doi: 10.1038/355850a0.
196. Homann M., Goring H.U. Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes // *Nucleic Acids Res.* 1999. Vol. 27, № 9. P. 2006–2014. doi: 10.1093/nar/27.9.2006.
197. DeRosa M.C. et al. In vitro selection of aptamers and their applications // *Nat. Rev. Methods Primer*. 2023. Vol. 3, № 1. P. 54. doi: 10.1038/s43586-023-00238-7.
198. Waldmann T.A. Monoclonal Antibodies in Diagnosis and Therapy // *Science*. 1991. Vol. 252, № 5013. P. 1657–1662. doi: 10.1126/science.2047874.
199. Meyer M., Scheper T., Walter J.-G. Aptamers: versatile probes for flow cytometry // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97, № 16. P. 7097–7109. doi: 10.1007/s00253-013-5070-z.
200. Bauer M. et al. The Application of Aptamers for Immunohistochemistry // *Nucleic Acid Ther.* 2016. Vol. 26, № 3. P. 120–126. doi: 10.1089/nat.2015.0569.
201. Yang L.F., Ling M., Kacharovsky N., Pun S.H. Aptamers 101: aptamer discovery and in vitro applications in biosensors and separations // *Chem. Sci.* 2023. Vol. 14. P. 4961–4978. doi: 10.1039/d3sc00439b.
- Toh S.Y. et al. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay // *Biosens. Bioelectron.* 2015. Vol. 64. P. 392–403. doi: 10.1016/j.bios.2014.09.026.
202. Bolognesi M.M. et al. Multiplex Staining by Sequential Immunostaining and Antibody Removal on Routine Tissue Sections // *J. Histochem. Cytochem.* 2017. Vol. 65, № 8. P. 431–444. doi: 10.1369/0022155417719419.
203. Gomes De Castro M.A., Höbartner C., Opazo F. Aptamers provide superior stainings of cellular receptors studied under super-resolution microscopy // *PLOS ONE* / ed. De Francis V. 2017. Vol. 12, № 2. P. e0173050. doi: 10.1371/journal.pone.0173050.
204. Gray B.P. et al. Aptamers as Reversible Sorting Ligands for Preparation of Cells in Their Native State // *Cell Chem. Biol.* 2020. Vol. 27, № 2. P. 232–244.e7. doi: 10.1016/j.chembiol.2019.12.004.
205. Mora J. et al. Next Generation Ligand Binding Assays—Review of Emerging Technologies' Capabilities to Enhance Throughput and Multiplexing // *AAPS J.* 2014. Vol. 16, № 6. P. 1175–1184. doi: 10.1208/s12248-014-9660-1.
206. Wang X. et al. Competitive Immunoassays for the Detection of Small Molecules Using Single Molecule Arrays // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. Vol. 140, № 51. P. 18132–18139. doi: 10.1021/jacs.8b11185.

207. Wu D. et al. Incorporation of Slow Off-Rate Modified Aptamers Reagents in Single Molecule Array Assays for Cytokine Detection with Ultrahigh Sensitivity // *Anal. Chem.* 2016. Vol. 88, № 17. P. 8385–8389. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02451.
208. Wu D., Milutinovic M.D., Walt D.R. Single molecule array (Simoa) assay with optimal antibody pairs for cytokine detection in human serum samples // *The Analyst.* 2015. Vol. 140, № 18. P. 6277–6282. doi: 10.1039/C5AN01238D.
209. Rabia L.A. et al. Understanding and overcoming trade-offs between antibody affinity, specificity, stability and solubility // *Biochem. Eng. J.* 2018. Vol. 137. P. 365–374. doi: 10.1016/j.bej.2018.06.003.
210. Shigdar S. et al. Aptamers as Theranostic Agents: Modifications, Serum Stability and Functionalisation // *Sensors.* 2013. Vol. 13, № 10. P. 13624–13637. doi: 10.3390/s131013624.
211. Elskens J.P., Elskens J.M., Madder A. Chemical Modification of Aptamers for Increased Binding Affinity in Diagnostic Applications: Current Status and Future Prospects // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 12. P. 4522. doi: 10.3390/ijms21124522.
212. Opazo F. et al. Aptamers as potential tools for super-resolution microscopy // *Nat. Methods.* 2012. Vol. 9, № 10. P. 938–939. doi: 10.1038/nmeth.2179.
213. Chang M. et al. Aptamer-based single-molecule imaging of insulin receptors in living cells // *J. Biomed. Opt.* 2013. Vol. 19, № 5. P. 051204. doi: 10.1117/1.JBO.19.5.051204.
214. Strauss S. et al. Modified aptamers enable quantitative sub-10-nm cellular DNA-PAINT imaging // *Nat. Methods.* 2018. Vol. 15, № 9. P. 685–688. doi: 10.1038/s41592-018-0105-0.
215. Stojanovic M.N., De Prada P., Landry D.W. Fluorescent Sensors Based on Aptamer Self-Assembly // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. Vol. 122, № 46. P. 11547–11548. doi: 10.1021/ja0022223.
216. Qi X. et al. Highly sensitive and specific detection of small molecules using advanced aptasensors based on split aptamers: A review // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2020. Vol. 133. P. 116069. doi: 10.1016/j.trac.2020.116069.
217. Bruno J.G. Potential Inherent Stimulation of the Innate Immune System by Nucleic Acid Aptamers and Possible Corrective Approaches // *Pharmaceuticals.* 2018. Vol. 11, № 3. P. 62. doi: 10.3390/ph11030062.
218. Xiang D. et al. Superior Performance of Aptamer in Tumor Penetration over Antibody: Implication of Aptamer-Based Theranostics in Solid Tumors // *Theranostics.* 2015. Vol. 5, № 10. P. 1083–1097. doi: 10.7150/thno.11711.
219. Li L. et al. Modulating Aptamer Specificity with pH-Responsive DNA Bonds // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. Vol. 140, № 41. P. 13335–13339. doi: 10.1021/jacs.8b08047.

220. Oney S. et al. Development of universal antidotes to control aptamer activity // *Nat. Med.* 2009. Vol. 15, № 10. P. 1224–1228. doi: 10.1038/nm.1990.
221. Chabata C.V. et al. Emerging applications of aptamers for anticoagulation and hemostasis // *Curr. Opin. Hematol.* 2018. Vol. 25, № 5. P. 382–388. doi: 10.1097/MOH.0000000000000452.
222. Lincoff A.M. et al. Effect of the REG1 anticoagulation system versus bivalirudin on outcomes after percutaneous coronary intervention (REGULATE-PCI): a randomised clinical trial // *The Lancet*. 2016. Vol. 387, № 10016. P. 349–356. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00515-2.
223. Greenhawt M. et al. Diagnostic accuracy of vaccine and vaccine excipient testing in the setting of allergic reactions to COVID -19 vaccines: A systematic review and meta-analysis // *Allergy*. 2023. Vol. 78, № 1. P. 71–83. doi: 10.1111/all.15571.
224. Torabi R. et al. Aptamers, the bivalent agents as probes and therapies for coronavirus infections: A systematic review // *Mol. Cell. Probes*. 2020. Vol. 53. P. 101636. doi: 10.1016/j.mcp.2020.101636.
225. Koudrina A. et al. Exploring the Unique Contrast Properties of Aptamer–Gadolinium Conjugates in Magnetic Resonance Imaging for Targeted Imaging of Thrombi // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2021. Vol. 13, № 8. P. 9412–9424. doi: 10.1021/acsami.0c16666.
226. Kichkailo A.S. et al. Development of DNA aptamers for visualization of glial brain tumors and detection of circulating tumor cells // *Mol. Ther. - Nucleic Acids*. 2023. Vol. 32. P. 267–288. doi: 10.1016/j.omtn.2023.03.015.
227. Pieve C.D., Perkins A.C., Missailidis S. Anti-MUC1 aptamers: radiolabelling with <sup>99m</sup>Tc and biodistribution in MCF-7 tumour-bearing mice // *Nucl. Med. Biol.* 2009. Vol. 36, № 6. P. 703–710. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2009.04.004.
228. Liu H.Y. et al. Co-targeting EGFR and survivin with a bivalent aptamer-dual siRNA chimera effectively suppresses prostate cancer // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 30346. doi: 10.1038/srep30346.
229. Kang H. et al. A liposome-based nanostructure for aptamer directed delivery // *Chem Commun.* 2010. Vol. 46, № 2. P. 249–251. doi: 10.1039/B916911C.
230. Shigdar S. et al. The Use of Sensitive Chemical Antibodies for Diagnosis: Detection of Low Levels of Epcam in Breast Cancer // *PLoS ONE* / ed. Lebedeva I.V. 2013. Vol. 8, № 2. P. e57613. doi: 10.1371/journal.pone.0057613.
231. Xiang D. et al. Transforming doxorubicin into a cancer stem cell killer via EpCAM aptamer-mediated delivery // *Theranostics*. 2017. Vol. 7, № 17. P. 4071–4086. doi: 10.7150/thno.20168.

232. Buxbaum A.R., Haimovich G., Singer R.H. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015. Vol. 16, № 2. P. 95–109. doi: 10.1038/nrm3918.
233. Chao J.A. et al. Structural basis for the coevolution of a viral RNA–protein complex // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008. Vol. 15, № 1. P. 103–105. doi: 10.1038/nsmb1327.
234. Rodriguez A.J. et al. Imaging mRNA movement from transcription sites to translation sites // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2007. Vol. 18, № 2. P. 202–208. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.02.002.
235. Legault P. et al. NMR Structure of the Bacteriophage  $\lambda$  N Peptide/boxB RNA Complex: Recognition of a GNRA Fold by an Arginine-Rich Motif // *Cell*. 1998. Vol. 93, № 2. P. 289–299. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81579-2.
236. Lu X., Kong K.Y. S., Unrau P.J. Harmonizing the growing fluorogenic RNA aptamer toolbox for RNA detection and imaging // *Chem. Soc. Rev.* 2023. Vol. 52. P. 4071–4098. doi: 10.1039/D3CS00030C.
237. Grabowski Z.R., Rotkiewicz K., Rettig W. Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures // *Chem. Rev.* 2003. Vol. 103, № 10. P. 3899–4032. doi: 10.1021/cr940745l.
238. Sasaki S., Drummen G.P.C., Konishi G. Recent advances in twisted intramolecular charge transfer (TICT) fluorescence and related phenomena in materials chemistry // *J. Mater. Chem. C*. 2016. Vol. 4, № 14. P. 2731–2743. doi: 10.1039/C5TC03933A.
239. Lavis L.D. Teaching Old Dyes New Tricks: Biological Probes Built from Fluoresceins and Rhodamines // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. Vol. 86, № 1. P. 825–843. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044839.
240. Marras S.A.E. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes // *Nucleic Acids Res.* 2002. Vol. 30, № 21. P. 1122e–1122. doi: 10.1093/nar/gnf121.
241. Babendure J.R., Adams S.R., Tsien R.Y. Aptamers Switch on Fluorescence of Triphenylmethane Dyes // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125, № 48. P. 14716–14717. doi: 10.1021/ja037994o.
242. Jay D.G., Keshishian H. Laser inactivation of fasciclin I disrupts axon adhesion of grasshopper pioneer neurons // *Nature*. 1990. Vol. 348, № 6301. P. 548–550. doi: 10.1038/348548a0.
243. Constantin T.P. et al. Synthesis of New Fluorogenic Cyanine Dyes and Incorporation into RNA Fluoromodules // *Org. Lett.* 2008. Vol. 10, № 8. P. 1561–1564. doi: 10.1021/ol702920e.

244. Tan X. et al. Fluoromodules Consisting of a Promiscuous RNA Aptamer and Red or Blue Fluorogenic Cyanine Dyes: Selection, Characterization, and Bioimaging // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. Vol. 139, № 26. P. 9001–9009. doi: 10.1021/jacs.7b04211.
245. Paige J.S., Wu K.Y., Jaffrey S.R. RNA Mimics of Green Fluorescent Protein // *Science*. 2011. Vol. 333, № 6042. P. 642–646. doi: 10.1126/science.1207339.
246. Huang H. et al. A G-quadruplex-containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore // *Nat. Chem. Biol.* 2014. Vol. 10, № 8. P. 686–691. doi: 10.1038/nchembio.1561.
247. Warner K.D. et al. Structural basis for activity of highly efficient RNA mimics of green fluorescent protein // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. Vol. 21, № 8. P. 658–663. doi: 10.1038/nsmb.2865.
248. Jeng S.C.Y. et al. Fluorophore ligand binding and complex stabilization of the RNA Mango and RNA Spinach aptamers // *RNA*. 2016. Vol. 22, № 12. P. 1884–1892. doi: 10.1261/rna.056226.116.
249. Filonov G.S. et al. Broccoli: Rapid Selection of an RNA Mimic of Green Fluorescent Protein by Fluorescence-Based Selection and Directed Evolution // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136, № 46. P. 16299–16308. doi: 10.1021/ja508478x.
250. Song W. et al. Plug-and-Play Fluorophores Extend the Spectral Properties of Spinach // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136, № 4. P. 1198–1201. doi: 10.1021/ja410819x.
251. Song W. et al. Imaging RNA polymerase III transcription using a photostable RNA–fluorophore complex // *Nat. Chem. Biol.* 2017. Vol. 13, № 11. P. 1187–1194. doi: 10.1038/nchembio.2477.
252. Wu J. et al. Self-Assembly of Intracellular Multivalent RNA Complexes Using Dimeric Corn and Beetroot Aptamers // *J. Am. Chem. Soc.* 2022. Vol. 144, № 12. P. 5471–5477. doi: 10.1021/jacs.1c13583.
253. Suss O., Motiei L., Margulies D. Broad Applications of Thiazole Orange in Fluorescent Sensing of Biomolecules and Ions // *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 9. P. 2828. doi: 10.3390/molecules26092828.
254. Dolgosheina E.V. et al. RNA Mango Aptamer-Fluorophore: A Bright, High-Affinity Complex for RNA Labeling and Tracking // *ACS Chem. Biol.* 2014. Vol. 9, № 10. P. 2412–2420. doi: 10.1021/cb500499x.
255. Carreon J.R., Mahon, K.P., Kelley S.O. Thiazole Orange–Peptide Conjugates: Sensitivity of DNA Binding to Chemical Structure // *Org. Lett.* 2004. Vol. 6, № 4. P. 517–519. doi: 10.1021/ol0362818.



256. Trachman R.J. et al. Structural basis for high-affinity fluorophore binding and activation by RNA Mango // *Nat. Chem. Biol.* 2017. Vol. 13, № 7. P. 807–813. doi: 10.1038/nchembio.2392.
257. Trachman R.J. et al. Structure and functional reselection of the Mango-III fluorogenic RNA aptamer // *Nat. Chem. Biol.* 2019. Vol. 15, № 5. P. 472–479. doi: 10.1038/s41589-019-0267-9.
258. Trachman R.J. et al. Crystal Structures of the Mango-II RNA Aptamer Reveal Heterogeneous Fluorophore Binding and Guide Engineering of Variants with Improved Selectivity and Brightness // *Biochemistry.* 2018. Vol. 57, № 26. P. 3544–3548. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00399.
259. Trachman R.J. et al. Structure-Guided Engineering of the Homodimeric Mango-IV Fluorescence Turn-on Aptamer Yields an RNA FRET Pair // *Structure.* 2020. Vol. 28, № 7. P. 776–785.e3. doi: 10.1016/j.str.2020.04.007.
260. Autour A. et al. Fluorogenic RNA Mango aptamers for imaging small non-coding RNAs in mammalian cells // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 656. doi: 10.1038/s41467-018-02993-8.
261. Cawte A.D., Unrau P.J., Rueda D.S. Live cell imaging of single RNA molecules with fluorogenic Mango II arrays // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 1283. doi: 10.1038/s41467-020-14932-7.
262. Kong K.Y.S. et al. RNA Peach and Mango: orthogonal two-color fluorogenic aptamers distinguish nearly identical ligands // *RNA.* 2021. Vol. 27, № 5. P. 604–615. doi: 10.1261/rna.078493.120.
263. Chen X. et al. Visualizing RNA dynamics in live cells with bright and stable fluorescent RNAs // *Nat. Biotechnol.* 2019. Vol. 37, № 11. P. 1287–1293. doi: 10.1038/s41587-019-0249-1.
264. Huang K. et al. Structure-based investigation of fluorogenic Pepper aptamer // *Nat. Chem. Biol.* 2021. Vol. 17, № 12. P. 1289–1295. doi: 10.1038/s41589-021-00884-6.
265. Liu R. et al. Optogenetic control of RNA function and metabolism using engineered light-switchable RNA-binding proteins // *Nat. Biotechnol.* 2022. Vol. 40, № 5. P. 779–786. doi: 10.1038/s41587-021-01112-1.
266. Neidle S. Quadruplex nucleic acids as targets for anticancer therapeutics // *Nat. Rev. Chem.* 2017. Vol. 1, № 5. P. 0041. doi: 10.1038/s41570-017-0041.
267. Mir B. et al. Prevalent Sequences in the Human Genome Can Form Mini i-Motif Structures at Physiological pH // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. Vol. 139, № 40. P. 13985–13988. doi: 10.1021/jacs.7b07383.

268. Zeraati M. et al. I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells // *Nat. Chem.* 2018. Vol. 10, № 6. P. 631–637. doi: 10.1038/s41557-018-0046-3.
269. Chambers V.S. et al. High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome // *Nat. Biotechnol.* 2015. Vol. 33, № 8. P. 877–881. doi: 10.1038/nbt.3295.
270. Kwok C.K. et al. rG4-seq reveals widespread formation of G-quadruplex structures in the human transcriptome // *Nat. Methods.* 2016. Vol. 13, № 10. P. 841–844. doi: 10.1038/nmeth.3965.
271. 10.1038/s41467-018-07224-8 R. et al. G-quadruplex structures mark human regulatory chromatin // *Nat. Genet.* 2016. Vol. 48, № 10. P. 1267–1272. doi: 10.1038/ng.3662.
272. Ziv O. et al. COMRADES determines in vivo RNA structures and interactions // *Nat. Methods.* 2018. Vol. 15, № 10. P. 785–788. doi: 10.1038/s41592-018-0121-0.
273. Scaria V. et al. Quadfinder: server for identification and analysis of quadruplex-forming motifs in nucleotide sequences // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34, № Web Server. P. W683–W685. doi: 10.1093/nar/gkl299.
274. Menendez C., Frees S., Bagga P.S. QGRS-H Predictor: a web server for predicting homologous quadruplex forming G-rich sequence motifs in nucleotide sequences // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, № W1. P. W96–W103. doi: 10.1093/nar/gks422.
275. Bedrat A., Lacroix L., Mergny J.-L. Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № 4. P. 1746–1759. doi: 10.1093/nar/gkw006.
276. Dhapola P., Chowdhury S. QuadBase2: web server for multiplexed guanine quadruplex mining and visualization // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № W1. P. W277–W283. doi: 10.1093/nar/gkw425.
277. Hon J. et al. pqsfinder: an exhaustive and imperfection-tolerant search tool for potential quadruplex-forming sequences in R // *Bioinformatics* / ed. Hancock J. 2017. Vol. 33, № 21. P. 3373–3379. doi: 10.1093/bioinformatics/btx413.
278. Sahakyan A.B. et al. Machine learning model for sequence-driven DNA G-quadruplex formation // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 14535. doi: 10.1038/s41598-017-14017-4.
279. Brázda V. et al. G4Hunter web application: a web server for G-quadruplex prediction // *Bioinformatics* / ed. Hancock J. 2019. Vol. 35, № 18. P. 3493–3495. doi: 10.1093/bioinformatics/btz087.
280. Bhasikuttan A.C., Mohanty J. Targeting G-quadruplex structures with extrinsic fluorogenic dyes: promising fluorescence sensors // *Chem. Commun.* 2015. Vol. 51, № 36. P. 7581–7597. doi: 10.1039/C4CC10030A.

281. Rajczak E., Pecoraro V.L., Juskowiak B.  $\text{Sm(III)}[12\text{-MC}_{\text{Ga(III)shi}}\text{-4}]$  as a luminescent probe for G-quadruplex structures // *Metallomics*. 2017. Vol. 9, № 12. P. 1735–1744. doi: 10.1039/C7MT00232G.
282. Jain A.K., Bhattacharya S. Interaction of G-Quadruplexes with Nonintercalating Duplex-DNA Minor Groove Binding Ligands // *Bioconjug. Chem.* 2011. Vol. 22, № 12. P. 2355–2368. doi: 10.1021/bc200268a.
283. Vy Thi Le T. et al. G-Quadruplex Binding Ligands: from Naturally Occurring to Rationally Designed Molecules // *Curr. Pharm. Des.* 2012. Vol. 18, № 14. P. 1948–1972. doi: 10.2174/138161212799958431.
284. Hu M.-H. et al. A new application of click chemistry in situ: development of fluorescent probe for specific G-quadruplex topology // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 17202. doi: 10.1038/srep17202.
285. Netzel T.L. et al. Base-Content Dependence of Emission Enhancements, Quantum Yields, and Lifetimes for Cyanine Dyes Bound to Double-Strand DNA: Photophysical Properties of Monomeric and Bichromophoric DNA Stains // *J. Phys. Chem.* 1995. Vol. 99, № 51. P. 17936–17947. doi: 10.1021/j100051a019.
286. Biver T. et al. Influence of cyanine dye structure on self-aggregation and interaction with nucleic acids: A kinetic approach to TO and BO binding // *Arch. Biochem. Biophys.* 2007. Vol. 465, № 1. P. 90–100. doi: 10.1016/j.abb.2007.04.034.
287. Karlsson H.J., Lincoln P., Westman G. Synthesis and DNA binding studies of a new asymmetric cyanine dye binding in the minor groove of  $[\text{poly}(\text{dA-dT})]_2$  // *Bioorg. Med. Chem.* 2003. Vol. 11, № 6. P. 1035–1040. doi: 10.1016/S0968-0896(02)00463-7.
288. Karlsson H.J. et al. Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: syntheses and characterization of the DNA-binding // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31, № 21. P. 6227–6234. doi: 10.1093/nar/gkg821.
289. Karlsson H.J. et al. Syntheses and DNA-binding studies of a series of unsymmetrical cyanine dyes: structural influence on the degree of minor groove binding to natural DNA // *Bioorg. Med. Chem.* 2004. Vol. 12, № 9. P. 2369–2384. doi: 10.1016/j.bmc.2004.02.006.
290. Monchaud D., Allain C., Teulade-Fichou M.-P. Thiazole Orange: A Useful Probe for Fluorescence Sensing of G-Quadruplex–Ligand Interactions // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2007. Vol. 26, № 10–12. P. 1585–1588. doi: 10.1080/15257770701548212.
291. Lubitz I., Zikich D., Kotlyar A. Specific High-Affinity Binding of Thiazole Orange to Triplex and G-Quadruplex DNA // *Biochemistry*. 2010. Vol. 49, № 17. P. 3567–3574. doi: 10.1021/bi1000849.

292. Xu L. et al. Thiazole Orange as a Fluorescent Light-Up Probe for the i-Motif and its Application to the Development of a Molecular Logic System // *Asian J. Org. Chem.* 2015. Vol. 4, № 12. P. 1375–1378. doi: 10.1002/ajoc.201500347.
293. Allain C., Monchaud D., Teulade-Fichou M.-P. FRET Templated by G-Quadruplex DNA: A Specific Ternary Interaction Using an Original Pair of Donor/Acceptor Partners // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128, № 36. P. 11890–11893. doi: 10.1021/ja062193h.
294. Yang P. et al. Engineering Bisquinolinium/Thiazole Orange Conjugates for Fluorescent Sensing of G-Quadruplex DNA // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. Vol. 48, № 12. P. 2188–2191. doi: 10.1002/anie.200805613.
295. Lu Y.-J. et al. A molecular fluorescent dye for specific staining and imaging of RNA in live cells: a novel ligand integration from classical thiazole orange and styryl compounds // *Chem. Commun.* 2015. Vol. 51, № 83. P. 15241–15244. doi: 10.1039/C5CC05551B.
296. Lu Y.-J. et al. Benzothiazole-substituted benzofuroquinolinium dyes as new fluorescent probes for G-quadruplex DNA // *Dyes Pigments.* 2015. Vol. 122. P. 94–102. doi: 10.1016/j.dyepig.2015.06.018.
297. Guo R.-J. et al. A simple structural modification to thiazole orange to improve the selective detection of G-quadruplexes // *Dyes Pigments.* 2016. Vol. 126. P. 76–85. doi: 10.1016/j.dyepig.2015.11.010.
298. Hu M.-H. et al. Development of an engineered carbazole/thiazole orange conjugating probe for G-quadruplexes // *Dyes Pigments.* 2017. Vol. 137. P. 191–199. doi: 10.1016/j.dyepig.2016.10.022.
299. Wang Y.-Q. et al. Tuning the selectivity of a commercial cyanine nucleic acid dye for preferential sensing of hybrid telomeric G-quadruplex DNA // *Sens. Actuators B Chem.* 2018. Vol. 266. P. 187–194. doi: 10.1016/j.snb.2018.03.125.
300. Largy E. et al. Visualizing the quadruplex: from fluorescent ligands to light-up probes // *Top. Curr. Chem.* 2013. Vol. 330. P. 111–177. doi: 10.1007/128\_2012\_346.
301. Ma D.-L. et al. Recent Developments in G-Quadruplex Probes // *Chem. Biol.* 2015. Vol. 22, № 7. P. 812–828. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.06.016.
302. Ma D.-L. et al. Recent Development of G-Quadruplex Probes for Cellular Imaging // *Curr. Top. Med. Chem.* 2015. Vol. 15, № 19. P. 1957–1963. doi: 10.2174/1568026615666150515150106.
303. Xie X. et al. Topology-Selective, Fluorescent “Light-Up” Probes for G-Quadruplex DNA Based on Photoinduced Electron Transfer // *Chem. – Eur. J.* 2018. Vol. 24, № 48. P. 12638–12651. doi: 10.1002/chem.201801701.

304. Shivalingam A. et al. The interactions between a small molecule and G-quadruplexes are visualized by fluorescence lifetime imaging microscopy // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6, № 1. P. 8178. doi: 10.1038/ncomms9178.
305. Mohanty J. et al. Thioflavin T as an Efficient Inducer and Selective Fluorescent Sensor for the Human Telomeric G-Quadruplex DNA // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. Vol. 135, № 1. P. 367–376. doi: 10.1021/ja309588h.
306. Liu S. et al. Thioflavin T binds dimeric parallel-stranded GA-containing non-G-quadruplex DNAs: a general approach to lighting up double-stranded scaffolds // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 21. P. 12080–12089. doi: 10.1093/nar/gkx942.
307. Renaud De La Faverie A. et al. Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42, № 8. P. e65–e65. doi: 10.1093/nar/gku111.
308. Luo D., Mu Y. All-Atomic Simulations on Human Telomeric G-Quadruplex DNA Binding with Thioflavin T // *J. Phys. Chem. B.* 2015. Vol. 119, № 15. P. 4955–4967. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b01107.
309. Takasu K. et al. Rhodacyanine Dyes as Antimalarials. 1. Preliminary Evaluation of Their Activity and Toxicity // *J. Med. Chem.* 2002. Vol. 45, № 5. P. 995–998. doi: 10.1021/jm0155704.
310. Deligeorgiev T.G. et al. A novel method for the preparation of monomethine cyanine dyes // *Dyes Pigments.* 1999. Vol. 41, № 1–2. P. 49–54. doi: 10.1016/S0143-7208(98)00061-8.
311. Brooker L.G.S., Smith L.A. Studies in the Cyanine Dye Series. VII. New Dyes Containing Three Heterocyclic Nuclei // *J. Am. Chem. Soc.* 1937. Vol. 59, № 1. P. 67–74. doi: 10.1021/ja01280a016.
312. Lim K.W. et al. Sequence variant (CTAGGG)<sub>n</sub> in the human telomere favors a G-quadruplex structure containing a G·C·G·C tetrad // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37, № 18. P. 6239–6248. doi: 10.1093/nar/gkp630.
313. Membrino A. et al. G4-DNA Formation in the HRAS Promoter and Rational Design of Decoy Oligonucleotides for Cancer Therapy // *PLoS ONE* / ed. Isalan M. 2011. Vol. 6, № 9. P. e24421. doi: 10.1371/journal.pone.0024421.
314. Macaya R.F. et al. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993. Vol. 90, № 8. P. 3745–3749. doi: 10.1073/pnas.90.8.3745.
315. Tateishi-Karimata H., Isono N., Sugimoto N. New Insights into Transcription Fidelity: Thermal Stability of Non-Canonical Structures in Template DNA Regulates Transcriptional Arrest, Pause, and Slippage // *PLoS ONE* / ed. Schönbach C. 2014. Vol. 9, № 3. P. e90580. doi: 10.1371/journal.pone.0090580.

316. Varizhuk A. et al. The expanding repertoire of G4 DNA structures // *Biochimie*. 2017. Vol. 135. P. 54–62. doi: 10.1016/j.biochi.2017.01.003.
317. G P. Cpg Methylation in G-Quadruplex and IMotif DNA Structures // *Significances Bioeng. Biosci.* 2018. Vol. 1, № 3. doi: 10.31031/SBB.2018.01.000514.
318. Dolinnaya N.G. et al. Coexistence of G-quadruplex and duplex domains within the secondary structure of 31-mer DNA thrombin-binding aptamer // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2012. Vol. 30, № 5. P. 524–531. doi: 10.1080/07391102.2012.687518.
319. Protopopova A.D. et al. The structural diversity of C-rich DNA aggregates: unusual self-assembly of beetle-like nanostructures // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. Vol. 20, № 5. P. 3543–3553. doi: 10.1039/C7CP05380K.
320. Kypr J. et al. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37, № 6. P. 1713–1725. doi: 10.1093/nar/gkp026.
321. Tran P.L.T. et al. Fluorescence intercalator displacement assay for screening G4 ligands towards a variety of G-quadruplex structures // *Biochimie*. 2011. Vol. 93, № 8. P. 1288–1296. doi: 10.1016/j.biochi.2011.05.011.
322. Rodriguez R. et al. A Novel Small Molecule That Alters Shelterin Integrity and Triggers a DNA-Damage Response at Telomeres // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130, № 47. P. 15758–15759. doi: 10.1021/ja805615w.
323. Rodriguez R. et al. Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes // *Nat. Chem. Biol.* 2012. Vol. 8, № 3. P. 301–310. doi: 10.1038/nchembio.780.
324. Patel D.J., Phan A.T., Kuryavyi V. Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 35, № 22. P. 7429–7455. doi: 10.1093/nar/gkm711.
325. Franceschin M. et al. Natural and synthetic G-quadruplex interactive berberine derivatives // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006. Vol. 16, № 6. P. 1707–1711. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.12.001.
326. Arora A. et al. Binding of berberine to human telomeric quadruplex – spectroscopic, calorimetric and molecular modeling studies // *FEBS J.* 2008. Vol. 275, № 15. P. 3971–3983. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06541.x.
327. Tawani A., Mishra S.K., Kumar A. Structural insight for the recognition of G-quadruplex structure at human c-myc promoter sequence by flavonoid Quercetin // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 3600. doi: 10.1038/s41598-017-03906-3.

328. Hawkins C.A. Structural analysis of the binding modes of minor groove ligands comprised of disubstituted benzenes // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29, № 4. P. 936–942. doi: 10.1093/nar/29.4.936.
329. Nelson H.C.M. et al. The structure of an oligo(dA)·oligo(dT) tract and its biological implications // *Nature.* 1987. Vol. 330, № 6145. P. 221–226. doi: 10.1038/330221a0.
330. You M. et al. Programmable and Multiparameter DNA-Based Logic Platform For Cancer Recognition and Targeted Therapy // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. Vol. 137, № 2. P. 667–674. doi: 10.1021/ja509263k.
331. Feng G. et al. DNA mimics of red fluorescent proteins (RFP) based on G-quadruplex-confined synthetic RFP chromophores // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 18. P. 10380–10392. doi: 10.1093/nar/gkx803.
332. Wang S. et al. A duplex connection can further illuminate G-quadruplex/crystal violet complex // *Chem. Commun.* 2019. Vol. 55, № 13. P. 1911–1914. doi: 10.1039/C8CC09940E.
333. Kato T. et al. Light-up fluorophore–DNA aptamer pair for label-free turn-on aptamer sensors // *Chem. Commun.* 2016. Vol. 52, № 21. P. 4041–4044. doi: 10.1039/C5CC08816J.
334. Butovskaya E. et al. Major G-Quadruplex Form of HIV-1 LTR Reveals a (3 + 1) Folding Topology Containing a Stem-Loop // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. Vol. 140, № 42. P. 13654–13662. doi: 10.1021/jacs.8b05332.
335. Ambrus A. et al. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34, № 9. P. 2723–2735. doi: 10.1093/nar/gkl348.
336. Jepsen M.D.E. et al. Development of a genetically encodable FRET system using fluorescent RNA aptamers // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 18. doi: 10.1038/s41467-017-02435-x.
337. Dou C.-X. et al. Genetically Encoded Dual-Color Light-Up RNA Sensor Enabled Ratiometric Imaging of MicroRNA // *Anal. Chem.* 2021. Vol. 93, № 4. P. 2534–2540. doi: 10.1021/acs.analchem.0c04588.
338. Dou C.-X. et al. Genetically Encoded Light-Up RNA Amplifier Dissecting MicroRNA Activity in Live Cells // *Anal. Chem.* 2022. Vol. 94, № 44. P. 15481–15488. doi: 10.1021/acs.analchem.2c03643.
339. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2001. Vol. 40, № 11. P. 2004–2021. doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.
340. Rostovtsev V.V. et al. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2002.

- Vol. 41, № 14. P. 2596–2599. doi: 10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4.
341. Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides // *J. Org. Chem.* 2002. Vol. 67, № 9. P. 3057–3064. doi: 10.1021/jo011148j.
  342. Pasini D. The Click Reaction as an Efficient Tool for the Construction of Macrocyclic Structures // *Molecules*. 2013. Vol. 18, № 8. P. 9512–9530. doi: 10.3390/molecules18089512.
  343. Sahu A. et al. Bio-isosteric replacement of amide group with 1,2,3-triazole in phenacetin improves the toxicology and efficacy of phenacetin-triazole conjugates (PhTCs) // *Life Sci.* 2019. Vol. 228. P. 176–188. doi: 10.1016/j.lfs.2019.05.004.
  344. Bi F. et al. Substitution of terminal amide with 1 H -1,2,3-triazole: Identification of unexpected class of potent antibacterial agents // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018. Vol. 28, № 5. P. 884–891. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.02.001.
  345. Mohammed I. et al. 1,2,3-Triazoles as Amide Bioisosteres: Discovery of a New Class of Potent HIV-1 Vif Antagonists // *J. Med. Chem.* 2016. Vol. 59, № 16. P. 7677–7682. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00247.
  346. Agouram N., El Hadrami E.M., Bentama A. 1,2,3-Triazoles as Biomimetics in Peptide Science // *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 10. P. 2937. doi: 10.3390/molecules26102937.
  347. Ditmangklo B. et al. Clickable styryl dyes for fluorescence labeling of pyrrolidiny PNA probes for the detection of base mutations in DNA // *Org. Biomol. Chem.* 2019. Vol. 17, № 45. P. 9712–9725. doi: 10.1039/C9OB01492F.
  348. Doak B.C., Scanlon M.J., Simpson J.S. Synthesis of Unsymmetrical 1,1'-Disubstituted Bis(1,2,3-triazole)s Using Monosilylbutadiynes // *Org. Lett.* 2011. Vol. 13, № 3. P. 537–539. doi: 10.1021/ol102852z.
  349. Sun X.-L. et al. Carbohydrate and Protein Immobilization onto Solid Surfaces by Sequential Diels–Alder and Azide–Alkyne Cycloadditions // *Bioconjug. Chem.* 2006. Vol. 17, № 1. P. 52–57. doi: 10.1021/bc0502311.
  350. Bureš F. Fundamental aspects of property tuning in push–pull molecules // *RSC Adv.* 2014. Vol. 4, № 102. P. 58826–58851. doi: 10.1039/C4RA11264D.
  351. Ci Z. et al. Influence of the benzo[d]thiazole-derived  $\pi$ -bridges on the optical and photovoltaic performance of D– $\pi$ –A dyes // *Dyes Pigments*. 2013. Vol. 96, № 3. P. 619–625. doi: 10.1016/j.dyepig.2012.11.004.



352. Kovalska V. et al. Fluorescent homodimer styrylcyanines: synthesis and spectral-luminescent studies in nucleic acids and protein complexes // *Dyes Pigments*. 2005. Vol. 67, № 1. P. 47–54. doi: 10.1016/j.dyepig.2004.10.007.
353. Miglietta G. et al. RNA G-Quadruplexes in Kirsten Ras ( *KRAS* ) Oncogene as Targets for Small Molecules Inhibiting Translation // *J. Med. Chem.* 2017. Vol. 60, № 23. P. 9448–9461. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00622.
354. Malina J., Scott P., Brabec V. Stabilization of human telomeric RNA G-quadruplex by the water-compatible optically pure and biologically-active metallohelicenes // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 14543. doi: 10.1038/s41598-020-71429-5.
355. Marchand A., Gabelica V. Folding and misfolding pathways of G-quadruplex DNA // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № 22. P. 10999–11012. doi: 10.1093/nar/gkw970.
356. Kovanda A. et al. Anti-sense DNA d(GGCCCC)n expansions in C9ORF72 form i-motifs and protonated hairpins // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 17944. doi: 10.1038/srep17944.
357. Jeng S.C.Y. et al. Fluorogenic aptamers resolve the flexibility of RNA junctions using orientation-dependent FRET // *RNA*. 2021. Vol. 27, № 4. P. 433–444. doi: 10.1261/rna.078220.120.
358. Bychenko O.S. et al. Use of Genetically Encoded Fluorescent Aptamers for Visualization of Mycobacterium tuberculosis Small RNA MTS1338 in Infected Macrophages // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. Vol. 493, № 1. P. 185–189. doi: 10.1134/S1607672920040055.
359. Ahmed W., Zheng K., Liu Z.-F. Small Non-Coding RNAs: New Insights in Modulation of Host Immune Response by Intracellular Bacterial Pathogens // *Front. Immunol.* 2016. Vol. 7. doi: 10.3389/fimmu.2016.00431.
360. Pita T., Feliciano J.R., Leitão J.H. Extracellular RNAs in Bacterial Infections: From Emerging Key Players on Host-Pathogen Interactions to Exploitable Biomarkers and Therapeutic Targets // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 24. P. 9634. doi: 10.3390/ijms21249634.
361. <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>
362. Chaturvedi V. et al. Evaluation of Mycobacterium smegmatis as a possible surrogate screen for selecting molecules active against multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2007. Vol. 53, № 6. P. 333–337. doi: 10.2323/jgam.53.333.
363. Grigorov A. et al. Small RNA F6 Provides Mycobacterium smegmatis Entry into Dormancy // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 21. P. 11536. doi: 10.3390/ijms222111536.
364. Bychenko O. et al. Mycobacterium tuberculosis Small RNA MTS1338 Confers Pathogenic Properties to Non-Pathogenic Mycobacterium smegmatis // *Microorganisms*. 2021. Vol. 9, № 2. P. 414. doi: 10.3390/microorganisms9020414.

365. Das G.M. et al. Biosensing Using SERS Active Gold Nanostructures // *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11, № 10. P. 2679. doi: 10.3390/nano11102679.
366. Szlag V.M. et al. Molecular Affinity Agents for Intrinsic Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Sensors // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018. Vol. 10, № 38. P. 31825–31844. doi: 10.1021/acsami.8b10303.
367. Wang H.-X. et al. Development and Application of Aptamer-Based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Sensors in Quantitative Analysis and Biotherapy // *Sensors*. 2019. Vol. 19, № 17. P. 3806. doi: 10.3390/s19173806.
368. López-Castaños K.A. et al. Indirect Quantification of Glyphosate by SERS Using an Incubation Process With Hemin as the Reporter Molecule: A Contribution to Signal Amplification Mechanism // *Front. Chem.* 2020. Vol. 8. P. 612076. doi: 10.3389/fchem.2020.612076.
369. Chen H. et al. SERS-based dual-mode DNA aptasensors for rapid classification of SARS-CoV-2 and influenza A/H1N1 infection // *Sens. Actuators B Chem.* 2022. Vol. 355. P. 131324. doi: 10.1016/j.snb.2021.131324.
370. Gribanyov D. et al. SERS-Based Colloidal Aptasensors for Quantitative Determination of Influenza Virus // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 4. P. 1842. doi: 10.3390/ijms22041842.
371. Kukushkin V.I. et al. Highly sensitive detection of influenza virus with SERS aptasensor // *PLOS ONE* / ed. Kourentzi K. 2019. Vol. 14, № 4. P. e0216247. doi: 10.1371/journal.pone.0216247.
372. Zavyalova E. et al. SERS-Based Aptasensor for Rapid Quantitative Detection of SARS-CoV-2 // *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11, № 6. P. 1394. doi: 10.3390/nano11061394.
373. Ly N.H., Joo S.-W. Recent advances in cancer bioimaging using a rationally designed Raman reporter in combination with plasmonic gold // *J. Mater. Chem. B*. 2020. Vol. 8, № 2. P. 186–198. doi: 10.1039/C9TB01598A.
374. Roxo C., Kotkowiak W., Pasternak A. G-Quadruplex-Forming Aptamers—Characteristics, Applications, and Perspectives // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 20. P. 3781. doi: 10.3390/molecules24203781.
375. Lin C.H., Patei D.J. Structural basis of DNA folding and recognition in an AMP-DNA aptamer complex: distinct architectures but common recognition motifs for DNA and RNA aptamers complexed to AMP // *Chem. Biol.* 1997. Vol. 4, № 11. P. 817–832. doi: 10.1016/S1074-5521(97)90115-0.
376. Santos T. et al. G-Quadruplexes and Their Ligands: Biophysical Methods to Unravel G-Quadruplex/Ligand Interactions // *Pharmaceuticals*. 2021. Vol. 14, № 8. P. 769. doi: 10.3390/ph14080769.

377. Cao Y. et al. Raman/fluorescence dual-sensing and imaging of intracellular pH distribution // *Chem. Commun.* 2015. Vol. 51, № 99. P. 17584–17587. doi: 10.1039/C5CC07697H.
378. Shi J. et al. Ultrasensitive Dual-Signal Detection of Telomerase and MiR-21 Based on Boolean Logic Operations // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2021. Vol. 13, № 43. P. 51393–51402. doi: 10.1021/acsami.1c17912.
379. Dudek M. et al. Light-Induced Modulation of Chiral Functions in G-Quadruplex–Photochrome Systems // *J. Phys. Chem. Lett.* 2021. Vol. 12, № 39. P. 9436–9441. doi: 10.1021/acs.jpcclett.1c02207.
380. Pithan P.M. et al. Synthesis of 5-Alkyl- and 5-Phenylamino-Substituted Azothiazole Dyes with Solvatochromic and DNA-Binding Properties // *Chem. – Eur. J.* 2019. Vol. 25, № 70. P. 16088–16098. doi: 10.1002/chem.201903657.
381. Wang X. et al. Conformational Switching of G-Quadruplex DNA by Photoregulation // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010. Vol. 49, № 31. P. 5305–5309. doi: 10.1002/anie.201002290.
382. Xing X. et al. Light-driven conformational regulation of human telomeric G-quadruplex DNA in physiological conditions // *Org. Biomol. Chem.* 2011. Vol. 9, № 19. P. 6639–6645. doi: 10.1039/C1OB05939D.
383. Wu J. et al. The synthesis, self-assembly and pH-responsive fluorescence enhancement of an alternating amphiphilic copolymer with azobenzene pendants // *Polym. Chem.* 2019. Vol. 10, № 29. P. 4025–4030. doi: 10.1039/C9PY00634F.
384. Chevalier A., Renard P.-Y., Romieu A. Straightforward synthesis of bioconjugatable azo dyes. Part 2: Black Hole Quencher-2 (BHQ-2) and BlackBerry Quencher 650 (BBQ-650) scaffolds // *Tetrahedron Lett.* 2014. Vol. 55, № 50. P. 6764–6768. doi: 10.1016/j.tetlet.2014.10.054.
385. Ilyinsky N.S. et al. Novel multi-targeting anthra[2,3-b]thiophene-5,10-diones with guanidine-containing side chains: Interaction with telomeric G-quadruplex, inhibition of telomerase and topoisomerase I and cytotoxic properties // *Eur. J. Med. Chem.* 2014. Vol. 85. P. 605–614. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.08.030.
386. Huizenga D.E., Szostak J.W. A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34, № 2. P. 656–665. doi: 10.1021/bi00002a033.
387. Lai H. et al. Bimetallic AgNPs@dopamine modified-halloysite nanotubes-AuNPs for adenine determination using surface-enhanced Raman scattering // *Microchim. Acta.* 2021. Vol. 188, № 4. P. 127. doi: 10.1007/s00604-021-04778-1.
388. Shiratori I. et al. Selection of DNA aptamers that bind to influenza A viruses with high affinity and broad subtype specificity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. Vol. 443, № 1. P. 37–41. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.041.

389. Novoseltseva A.A. et al. Structural and Functional Aspects of G-Quadruplex Aptamers Which Bind a Broad Range of Influenza A Viruses // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 119. doi: 10.3390/biom10010119.
390. Kramberger P. et al. Evaluation of nanoparticle tracking analysis for total virus particle determination // *Virology*. 2012. Vol. 9, № 1. P. 265. doi: 10.1186/1743-422X-9-265.
391. Kiilerich-Pedersen K. et al. High sensitivity point-of-care device for direct virus diagnostics // *Biosens. Bioelectron.* 2013. Vol. 49. P. 374–379. doi: 10.1016/j.bios.2013.05.046.
392. Herrmann B., Larsson C., Zwegberg B.W. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA) // *J. Clin. Microbiol.* 2001. Vol. 39, № 1. P. 134–138. doi: 10.1128/JCM.39.1.134-138.2001.
393. Rhodes D., Lipps H.J. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43, № 18. P. 8627–8637. doi: 10.1093/nar/gkv862.
394. Seifert H.S. Above and Beyond Watson and Crick: Guanine Quadruplex Structures and Microbes // *Annu. Rev. Microbiol.* 2018. Vol. 72, № 1. P. 49–69. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062629.
395. Métifiot M. et al. G-quadruplexes in viruses: function and potential therapeutic applications // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42, № 20. P. 12352–12366. doi: 10.1093/nar/gku999.
396. Hänsel-Hertsch R., Di Antonio M., Balasubramanian S. DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. Vol. 18, № 5. P. 279–284. doi: 10.1038/nrm.2017.3.
397. Ruggiero E., Richter S.N. G-quadruplexes and G-quadruplex ligands: targets and tools in antiviral therapy // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46, № 7. P. 3270–3283. doi: 10.1093/nar/gky187.
398. Zahin M. et al. Identification of G-quadruplex forming sequences in three manatee papillomaviruses // *PLOS ONE* / ed. Buratti E. 2018. Vol. 13, № 4. P. e0195625. doi: 10.1371/journal.pone.0195625.
399. Belmonte-Reche E. et al. G-Quadruplex Identification in the Genome of Protozoan Parasites Points to Naphthalene Diimide Ligands as New Antiparasitic Agents // *J. Med. Chem.* 2018. Vol. 61, № 3. P. 1231–1240. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01672.
400. Harris L.M. et al. G-Quadruplex DNA Motifs in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* and Their Potential as Novel Antimalarial Drug Targets // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018. Vol. 62, № 3. P. e01828-17. doi: 10.1128/AAC.01828-17.

401. Perrone R. et al. Mapping and characterization of G-quadruplexes in *Mycobacterium tuberculosis* gene promoter regions // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 5743. doi: 10.1038/s41598-017-05867-z.
402. Mishra S.K. et al. Characterization of G-Quadruplex Motifs in *espB*, *espK*, and *cyp51* Genes of *Mycobacterium tuberculosis* as Potential Drug Targets // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* 2019. Vol. 16. P. 698–706. doi: 10.1016/j.omtn.2019.04.022.
403. Mishra S.K. et al. Characterization of highly conserved G-quadruplex motifs as potential drug targets in *Streptococcus pneumoniae* // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 1791. doi: 10.1038/s41598-018-38400-x.
404. Harris L.M., Merrick C.J. G-Quadruplexes in Pathogens: A Common Route to Virulence Control? // *PLOS Pathog.* 2015. Vol. 11, № 2. P. e1004562. doi: 10.1371/journal.ppat.1004562.
405. Spiegel J., Adhikari S., Balasubramanian S. The Structure and Function of DNA G-Quadruplexes // *Trends Chem.* 2020. Vol. 2, № 2. P. 123–136. doi: 10.1016/j.trechm.2019.07.002.
406. Duarte A.R. et al. Design of Modular G-quadruplex Ligands // *ChemMedChem.* 2018. Vol. 13, № 9. P. 869–893. doi: 10.1002/cmdc.201700747.
407. Hilton J. et al. Results of the phase I CCTG IND.231 trial of CX-5461 in patients with advanced solid tumors enriched for DNA-repair deficiencies // *Nat. Commun.* 2022. Vol. 13, № 1. P. 3607. doi: 10.1038/s41467-022-31199-2.
408. Koh G.C.C. et al. The chemotherapeutic drug CX-5461 is a potent mutagen in cultured human cells // *Nat. Genet.* 2024. Vol. 56, № 1. P. 23–26. doi: 10.1038/s41588-023-01602-9.
409. Berner A. et al. G4-Ligand-Conjugated Oligonucleotides Mediate Selective Binding and Stabilization of Individual G4 DNA Structures // *J. Am. Chem. Soc.* 2024. Vol. 146, № 10. P. 6926–6935. doi: 10.1021/jacs.3c14408.
410. Bejugam M. et al. Trisubstituted Isoalloxazines as a New Class of G-Quadruplex Binding Ligands: Small Molecule Regulation of c-kit Oncogene Expression // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. Vol. 129, № 43. P. 12926–12927. doi: 10.1021/ja075881p.
411. Lu Y.-J. et al. 5- *N* -Methylated Quindoline Derivatives as Telomeric G-Quadruplex Stabilizing Ligands: Effects of 5- *N* Positive Charge on Quadruplex Binding Affinity and Cell Proliferation // *J. Med. Chem.* 2008. Vol. 51, № 20. P. 6381–6392. doi: 10.1021/jm800497p.
412. Tikhomirov A.S. et al. Tri-armed ligands of G-quadruplex on heteroarene-fused anthraquinone scaffolds: Design, synthesis and pre-screening of biological properties // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. Vol. 159. P. 59–73. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.09.054.

413. Read M. et al. Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. Vol. 98, № 9. P. 4844–4849. doi: 10.1073/pnas.081560598.
414. Harrison R.J. et al. Trisubstituted Acridine Derivatives as Potent and Selective Telomerase Inhibitors // *J. Med. Chem.* 2003. Vol. 46, № 21. P. 4463–4476. doi: 10.1021/jm0308693.
415. Shin-ya K. et al. Telomestatin, a Novel Telomerase Inhibitor from *Streptomyces anulatus* // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. Vol. 123, № 6. P. 1262–1263. doi: 10.1021/ja005780q.
416. Kim M.-Y. et al. Telomestatin, a Potent Telomerase Inhibitor That Interacts Quite Specifically with the Human Telomeric Intramolecular G-Quadruplex // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. Vol. 124, № 10. P. 2098–2099. doi: 10.1021/ja017308q.
417. Drewe W.C., Neidle S. Click chemistry assembly of G-quadruplex ligands incorporating a diarylurea scaffold and triazole linkers // *Chem. Commun.* 2008. № 42. P. 5295. doi: 10.1039/b814576h.
418. Drewe W.C. et al. Rational Design of Substituted Diarylureas: A Scaffold for Binding to G-Quadruplex Motifs // *J. Med. Chem.* 2008. Vol. 51, № 24. P. 7751–7767. doi: 10.1021/jm801245v.
419. Dash J. et al. Diarylethynyl Amides That Recognize the Parallel Conformation of Genomic Promoter DNA G-Quadruplexes // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130, № 47. P. 15950–15956. doi: 10.1021/ja8046552.
420. Dash J. et al. Synthesis and Binding Studies of Novel Diethynyl-Pyridine Amides with Genomic Promoter DNA G-Quadruplexes // *Chem. – Eur. J.* 2011. Vol. 17, № 16. P. 4571–4581. doi: 10.1002/chem.201003157.
421. Waller Z.A.E. et al. Triarylpyridines: a versatile small molecule scaffold for G-quadruplex recognition // *Chem. Commun.* 2008. № 12. P. 1467. doi: 10.1039/b718854d.
422. Smith N.M. et al. Unraveling the relationship between structure and stabilization of triarylpyridines as G-quadruplex binding ligands // *Org. Biomol. Chem.* 2011. Vol. 9, № 17. P. 6154. doi: 10.1039/c1ob05560g.
423. Yoo H., Rill R.L. Single-strand DNA Binding of Actinomycin D with a Chromophore 2-Amino to 2-Hydroxyl Substitution // *BMB Rep.* 2003. Vol. 36, № 3. P. 305–311. doi: 10.5483/BMBRep.2003.36.3.305.
424. Hudson J.S., Brooks S.C., Graves D.E. Interactions of Actinomycin D with Human Telomeric G-Quadruplex DNA // *Biochemistry.* 2009. Vol. 48, № 21. P. 4440–4447. doi: 10.1021/bi900203z.

425. Kang H.-J., Park H.-J. Novel Molecular Mechanism for Actinomycin D Activity as an Oncogenic Promoter G-Quadruplex Binder // *Biochemistry*. 2009. Vol. 48, № 31. P. 7392–7398. doi: 10.1021/bi9006836.
426. Niknezhad Z., Hassani L., Norouzi D. Investigating actinomycin D binding to G-quadruplex, i-motif and double-stranded DNA in 27-nt segment of c-MYC gene promoter // *Mater. Sci. Eng. C*. 2016. Vol. 58. P. 1188–1193. doi: 10.1016/j.msec.2015.09.072.
427. McLuckie K.I.E. et al. G-Quadruplex-Binding Benzo[ *a* ]phenoxazines Down-Regulate *c-KIT* Expression in Human Gastric Carcinoma Cells // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133, № 8. P. 2658–2663. doi: 10.1021/ja109474c.
428. Singh A. et al. 1 *H* -1,2,3-triazole-tethered uracil-ferrocene and uracil-ferrocenylchalcone conjugates: Synthesis and antitubercular evaluation // *Chem. Biol. Drug Des.* 2017. Vol. 89, № 6. P. 856–861. doi: 10.1111/cbdd.12908.
429. Ausín C. et al. Synthesis of Amino- and Guanidino-G-Clamp PNA Monomers // *Org. Lett.* 2002. Vol. 4, № 23. P. 4073–4075. doi: 10.1021/ol026815p.
430. Neidle S. Quadruplex Nucleic Acids as Novel Therapeutic Targets // *J. Med. Chem.* 2016. Vol. 59, № 13. P. 5987–6011. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01835.
431. Simonsson T., Pribylova M., Vorlickova M. A Nuclease Hypersensitive Element in the Human c-myc Promoter Adopts Several Distinct i-Tetraplex Structures // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 278, № 1. P. 158–166. doi: 10.1006/bbrc.2000.3783.
432. Phan A.T. Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix // *Nucleic Acids Res.* 2002. Vol. 30, № 21. P. 4618–4625. doi: 10.1093/nar/gkf597.
433. De Rache A., Mergny J.-L. Assessment of selectivity of G-quadruplex ligands via an optimised FRET melting assay // *Biochimie*. 2015. Vol. 115. P. 194–202. doi: 10.1016/j.biochi.2015.06.002.
434. Jerabek-Willemsen M. et al. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond // *J. Mol. Struct.* 2014. Vol. 1077. P. 101–113. doi: 10.1016/j.molstruc.2014.03.009.
435. Koirala D. et al. A single-molecule platform for investigation of interactions between G-quadruplexes and small-molecule ligands // *Nat. Chem.* 2011. Vol. 3, № 10. P. 782–787. doi: 10.1038/nchem.1126.
436. Mandal S. et al. Submolecular dissection reveals strong and specific binding of polyamide–pyridostatin conjugates to human telomere interface // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, № 7. P. 3295–3305. doi: 10.1093/nar/gkz135.
437. Bernatowicz M.S., Wu Y., Matsueda G.R. 1*H*-Pyrazole-1-carboxamidinium hydrochloride an attractive reagent for guanylation of amines and its application to peptide synthesis // *J. Org. Chem.* 1992. Vol. 57, № 8. P. 2497–2502. doi: 10.1021/jo00034a059.

438. Maier M.A., Barber-Peoc'h I., Manoharan M. Postsynthetic guanidinylation of primary amino groups in the minor and major grooves of oligonucleotides // *Tetrahedron Lett.* 2002. Vol. 43, № 42. P. 7613–7616. doi: 10.1016/S0040-4039(02)01732-X.
439. Ling K.-Q., Sayre L.M. Discovery of a Sensitive, Selective, and Tightly Binding Fluorogenic Substrate of Bovine Plasma Amine Oxidase // *J. Org. Chem.* 2009. Vol. 74, № 1. P. 339–350. doi: 10.1021/jo8018945.
440. Nicoludis J.M. et al. Interaction of human telomeric DNA with N- methyl mesoporphyrin IX // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, № 12. P. 5432–5447. doi: 10.1093/nar/gks152.
441. Incles C.M. et al. A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells // *Mol. Cancer Ther.* 2004. Vol. 3, № 10. P. 1201–1206. doi: 10.1158/1535-7163.1201.3.10.
442. Sullivan H.-J. et al. Binding of Telomestatin, TMPyP4, BSU6037, and BRACO19 to a Telomeric G-Quadruplex–Duplex Hybrid Probed by All-Atom Molecular Dynamics Simulations with Explicit Solvent // *ACS Omega.* 2018. Vol. 3, № 11. P. 14788–14806. doi: 10.1021/acsomega.8b01574.
443. Perrone R. et al. A Dynamic G-Quadruplex Region Regulates the HIV-1 Long Terminal Repeat Promoter // *J. Med. Chem.* 2013. Vol. 56, № 16. P. 6521–6530. doi: 10.1021/jm400914r.
444. Perrone R. et al. Formation of a Unique Cluster of G-Quadruplex Structures in the HIV-1 nef Coding Region: Implications for Antiviral Activity // *PLoS ONE* / ed. Qiu J. 2013. Vol. 8, № 8. P. e73121. doi: 10.1371/journal.pone.0073121.
445. Amrane S. et al. Topology of a DNA G-Quadruplex Structure Formed in the HIV-1 Promoter: A Potential Target for Anti-HIV Drug Development // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136, № 14. P. 5249–5252. doi: 10.1021/ja501500c.
446. Piekna-Przybylska D. et al. U3 Region in the HIV-1 Genome Adopts a G-Quadruplex Structure in Its RNA and DNA Sequence // *Biochemistry.* 2014. Vol. 53, № 16. P. 2581–2593. doi: 10.1021/bi4016692.
447. Perrone R. et al. Synthesis, Binding and Antiviral Properties of Potent Core-Extended Naphthalene Diimides Targeting the HIV-1 Long Terminal Repeat Promoter G-Quadruplexes // *J. Med. Chem.* 2015. Vol. 58, № 24. P. 9639–9652. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01283.
448. Tian T. et al. G-Quadruplex: A Regulator of Gene Expression and Its Chemical Targeting // *Chem.* 2018. Vol. 4, № 6. P. 1314–1344. doi: 10.1016/j.chempr.2018.02.014.



449. Díaz-Casado L. et al. De Novo Design of Selective Quadruplex–Duplex Junction Ligands and Structural Characterisation of Their Binding Mode: Targeting the G4 Hot-Spot // *Chem. – Eur. J.* 2021. Vol. 27, № 20. P. 6204–6212. doi: 10.1002/chem.202005026.
450. Ehrhardt D. GFP technology for live cell imaging // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003. Vol. 6, № 6. P. 622–628. doi: 10.1016/j.pbi.2003.09.014.
451. Wu L., Burgess K. Syntheses of Highly Fluorescent GFP-Chromophore Analogues // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130, № 12. P. 4089–4096. doi: 10.1021/ja710388h.
452. Chen C. et al. Developing Bright Green Fluorescent Protein (GFP)-like Fluorogens for Live-Cell Imaging with Nonpolar Protein–Chromophore Interactions // *Chem. – Eur. J.* 2021. Vol. 27, № 35. P. 8946–8950. doi: 10.1002/chem.202101250.
453. Bozhanova N.G. et al. Protein labeling for live cell fluorescence microscopy with a highly photostable renewable signal // *Chem. Sci.* 2017. Vol. 8, № 10. P. 7138–7142. doi: 10.1039/C7SC01628J.
454. Tassinari M. et al. A Fragment-Based Approach for the Development of G-Quadruplex Ligands: Role of the Amidoxime Moiety // *Molecules.* 2018. Vol. 23, № 8. P. 1874. doi: 10.3390/molecules23081874.
455. Moyzis R.K. et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988. Vol. 85, № 18. P. 6622–6626. doi: 10.1073/pnas.85.18.6622.
456. Cheng Y. et al. Folding/unfolding kinetics of G-quadruplexes upstream of the P1 promoter of the human BCL-2 oncogene // *J. Biol. Chem.* 2019. Vol. 294, № 15. P. 5890–5895. doi: 10.1074/jbc.RA119.007516.
457. Lim K.W. et al. Duplex stem-loop-containing quadruplex motifs in the human genome: a combined genomic and structural study // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43, № 11. P. 5630–5646. doi: 10.1093/nar/gkv355.
458. Povarova N.V. et al. Docking-guided identification of protein hosts for GFP chromophore-like ligands // *J. Mater. Chem. C.* 2016. Vol. 4, № 14. P. 3036–3040. doi: 10.1039/C5TC03931B.
459. Mineev K.S. et al. NanoFAST: structure-based design of a small fluorogen-activating protein with only 98 amino acids // *Chem. Sci.* 2021. Vol. 12, № 19. P. 6719–6725. doi: 10.1039/D1SC01454D.
460. V'kovski P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 // *Nat. Rev. Microbiol.* 2021. Vol. 19, № 3. P. 155–170. doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.

461. Bhatt P.R. et al. Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome // *Science*. 2021. Vol. 372, № 6548. P. 1306–1313. doi: 10.1126/science.abf3546.
462. Kelly J.A., Woodside M.T., Dinman J.D. Programmed –1 Ribosomal Frameshifting in coronaviruses: A therapeutic target // *Virology*. 2021. Vol. 554. P. 75–82. doi: 10.1016/j.virol.2020.12.010.
463. Zhang K. et al. Cryo-EM and antisense targeting of the 28-kDa frameshift stimulation element from the SARS-CoV-2 RNA genome // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021. Vol. 28, № 9. P. 747–754. doi: 10.1038/s41594-021-00653-y.
464. Roman C. et al. The SARS-CoV-2 Programmed –1 Ribosomal Frameshifting Element Crystal Structure Solved to 2.09 Å Using Chaperone-Assisted RNA Crystallography // *ACS Chem. Biol.* 2021. Vol. 16, № 8. P. 1469–1481. doi: 10.1021/acscchembio.1c00324.
465. Jones C.P., Ferré-D'Amaré A.R. Crystal structure of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) frameshifting pseudoknot // *RNA*. 2022. Vol. 28, № 2. P. 239–249. doi: 10.1261/rna.078825.121.
466. Yan S. et al. Length-dependent motions of SARS-CoV-2 frameshifting RNA pseudoknot and alternative conformations suggest avenues for frameshifting suppression // *Nat. Commun.* 2022. Vol. 13, № 1. P. 4284. doi: 10.1038/s41467-022-31353-w.
467. Neupane K. et al. Structural dynamics of single SARS-CoV-2 pseudoknot molecules reveal topologically distinct conformers // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 4749. doi: 10.1038/s41467-021-25085-6.
468. Yu D. et al. Pseudoknot-targeting Cas13b combats SARS-CoV-2 infection by suppressing viral replication // *Mol. Ther.* 2023. Vol. 31, № 6. P. 1675–1687. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.03.018.
469. Szczesniak I. et al. Structural and Functional RNA Motifs of SARS-CoV-2 and Influenza A Virus as a Target of Viral Inhibitors // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, № 2. P. 1232. doi: 10.3390/ijms24021232.
470. Ahn D.-G. et al. Interference of ribosomal frameshifting by antisense peptide nucleic acids suppresses SARS coronavirus replication // *Antiviral Res.* 2011. Vol. 91, № 1. P. 1–10. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.04.009.
471. Ranjbar B., Gill P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review // *Chem. Biol. Drug Des.* 2009. Vol. 74, № 2. P. 101–120. doi: 10.1111/j.1747-0285.2009.00847.x.

472. Newbury S.F., McClellan J.A., Rodger A. Spectroscopic and thermodynamic studies of conformational changes in long, natural messenger ribonucleic acid molecules // *Anal. Commun.* 1996. Vol. 33, № 3. P. 117. doi: 10.1039/ac9963300117.
473. Schlick T. et al. Structure-altering mutations of the SARS-CoV-2 frameshifting RNA element // *Biophys. J.* 2021. Vol. 120, № 6. P. 1040–1053. doi: 10.1016/j.bpj.2020.10.012.
474. Kelly J.A. et al. Structural and functional conservation of the programmed –1 ribosomal frameshift signal of SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2) // *J. Biol. Chem.* 2020. Vol. 295, № 31. P. 10741–10748. doi: 10.1074/jbc.AC120.013449.
475. Kurreck J. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids // *Nucleic Acids Res.* 2002. Vol. 30, № 9. P. 1911–1918. doi: 10.1093/nar/30.9.1911.
476. Furdon P.J., Dominski Z., Kole R. RNase H cleavage of RNA hybridized to oligonucleotides containing methylphosphonate, phosphorothioate and phosphodiester bonds // *Nucleic Acids Res.* 1989. Vol. 17, № 22. P. 9193–9204. doi: 10.1093/nar/17.22.9193.
477. Liang X.-H. et al. RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus // *Mol. Ther.* 2017. Vol. 25, № 9. P. 2075–2092. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.06.002.
478. Pires De Souza G.A. et al. Choosing a cellular model to study SARS-CoV-2 // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022. Vol. 12. P. 1003608. doi: 10.3389/fcimb.2022.1003608.
479. Qin G. et al. The COVID-19 susceptibility of cancer patients might due to the high expression of SARS-CoV-2 required host factors // *J. Infect.* 2022. Vol. 84, № 3. P. 418–467. doi: 10.1016/j.jinf.2021.12.011.
480. Smirnova O.A. et al. SARS-CoV-2 Establishes a Productive Infection in Hepatoma and Glioblastoma Multiforme Cell Lines // *Cancers.* 2023. Vol. 15, № 3. P. 632. doi: 10.3390/cancers15030632.
481. Murgolo N. et al. SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development // *PLOS Pathog.* / ed. Hobman T.C. 2021. Vol. 17, № 2. P. e1009225. doi: 10.1371/journal.ppat.1009225.
482. Sheahan T.P. et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice // *Sci. Transl. Med.* 2020. Vol. 12, № 541. P. eabb5883. doi: 10.1126/scitranslmed.abb5883.
483. Shtro A.A. et al. Cationic Perylene Antivirals with Aqueous Solubility for Studies In Vivo // *Pharmaceuticals.* 2022. Vol. 15, № 10. P. 1178. doi: 10.3390/ph15101178.
484. Ming X. et al. Parallel-stranded DNA: Enhancing duplex stability by the ‘G-clamp’ and a pyrrolo-dC derivative // *Org. Biomol. Chem.* 2012. Vol. 10, № 9. P. 1861. doi: 10.1039/c2ob06606h.

485. El-Sagheer A.H., Brown T. Combined nucleobase and backbone modifications enhance DNA duplex stability and preserve biocompatibility // *Chem Sci*. 2014. Vol. 5, № 1. P. 253–259. doi: 10.1039/C3SC51753E.
486. Kobayashi R. et al. A Chemo-Enzymatic Expeditious Route to Racemic Dihexanoyl (2*R*\*,3*R*\*,4*R*\*)-Dehydroxymethylepoxyquinomycin (DHMEQ), the Precursor for Lipase-Catalyzed Synthesis of the Potent Nuclear Factor- $\kappa$ B Inhibitor, (2*S*,3*S*,4*S*)-DHMEQ // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 2012. Vol. 60, № 9. P. 1220–1223. doi: 10.1248/cpb.c12-00417.
487. Bell-Horwath T.R. et al. Novel ROS-activated agents utilize a tethered amine to selectively target acute myeloid leukemia // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013. Vol. 23, № 10. P. 2951–2954. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.03.048.
488. Rajeev K.G. et al. High-Affinity Peptide Nucleic Acid Oligomers Containing Tricyclic Cytosine Analogues // *Org. Lett.* 2002. Vol. 4, № 25. P. 4395–4398. doi: 10.1021/ol027026a.
489. Kobori T., Takahashi H. Expanding Possibilities of Rolling Circle Amplification as a Biosensing Platform // *Anal. Sci.* 2014. Vol. 30, № 1. P. 59–64. doi: 10.2116/analsci.30.59.
490. Johne R. et al. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase // *Trends Microbiol.* 2009. Vol. 17, № 5. P. 205–211. doi: 10.1016/j.tim.2009.02.004.
491. Romainczyk O. et al. The RNA–DNA hybrid structure determined by EPR, CD and RNase H1 // *Mol. Biosyst.* 2011. Vol. 7, № 4. P. 1050. doi: 10.1039/c0mb00258e.
492. Gehring K., Leroy J.-L., Guéron M. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs // *Nature*. 1993. Vol. 363, № 6429. P. 561–565. doi: 10.1038/363561a0.
493. Takahashi S., Brazier J.A., Sugimoto N. Topological impact of noncanonical DNA structures on Klenow fragment of DNA polymerase // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017. Vol. 114, № 36. P. 9605–9610. doi: 10.1073/pnas.1704258114.
494. Benabou S. et al. Fundamental aspects of the nucleic acid i-motif structures // *RSC Adv.* 2014. Vol. 4, № 51. P. 26956–26980. doi: 10.1039/C4RA02129K.
495. Heinen L. et al. Antagonistic Enzymes in a Biocatalytic pH Feedback System Program Autonomous DNA Hydrogel Life Cycles // *Nano Lett.* 2017. Vol. 17, № 8. P. 4989–4995. doi: 10.1021/acs.nanolett.7b02165.
496. Shi L. et al. Programmable i-motif DNA folding topology for a pH-switched reversible molecular sensing device // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 8. P. 4306–4314. doi: 10.1093/nar/gkx202.
497. Alba J.J., Sadurní A., Gargallo R. Nucleic Acid *i*- Motif Structures in Analytical Chemistry // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2016. Vol. 46, № 5. P. 443–454. doi: 10.1080/10408347.2016.1143347.

498. Dembska A., Juskowiak B. Pyrene functionalized molecular beacon with pH-sensitive i-motif in a loop // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2015. Vol. 150. P. 928–933. doi: 10.1016/j.saa.2015.06.041.
499. Bielecka P., Juskowiak B. Fluorescent Sensor for PH Monitoring Based on an i-Motif – Switching Aptamer Containing a Tricyclic Cytosine Analogue (tC) // *Molecules.* 2015. Vol. 20, № 10. P. 18511–18525. doi: 10.3390/molecules201018511.
500. Mata G., Luedtke N.W. Fluorescent Probe for Proton-Coupled DNA Folding Revealing Slow Exchange of *i* -Motif and Duplex Structures // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. Vol. 137, № 2. P. 699–707. doi: 10.1021/ja508741u.
501. Sharma J. et al. pH-driven conformational switch of “i-motif” DNA for the reversible assembly of gold nanoparticles // *Chem Commun.* 2007. № 5. P. 477–479. doi: 10.1039/B612707J.
502. Fujii T., Sugimoto N. Loop nucleotides impact the stability of intrastrand i-motif structures at neutral pH // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015. Vol. 17, № 26. P. 16719–16722. doi: 10.1039/C5CP02794B.
503. Day H.A., Pavlou P., Waller Z.A.E. i-Motif DNA: Structure, stability and targeting with ligands // *Bioorg. Med. Chem.* 2014. Vol. 22, № 16. P. 4407–4418. doi: 10.1016/j.bmc.2014.05.047.
504. Tatarinova O. et al. Comparison of the ‘Chemical’ and ‘Structural’ Approaches to the Optimization of the Thrombin-Binding Aptamer // *PLoS ONE* / ed. Willson R.C. 2014. Vol. 9, № 2. P. e89383. doi: 10.1371/journal.pone.0089383.
505. Lacroix L., Mergny J.-L. Chemical Modification of Pyrimidine TFOs: Effect on i-Motif and Triple Helix Formation // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. Vol. 381, № 1. P. 153–163. doi: 10.1006/abbi.2000.1934.
506. Fenna C.P. et al. The effect of 2'-fluorine substitutions on DNA i-motif conformation and stability // *Chem. Commun.* 2008. № 30. P. 3567. doi: 10.1039/b804833a.
507. Robidoux S., Damha M.J. D-2-Deoxyribose and D-Arabinose, but not D-Ribose, Stabilize the Cytosine Tetrad ( *i* -DNA) Structure // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1997. Vol. 15, № 3. P. 529–535. doi: 10.1080/07391102.1997.10508963.
508. Assi H.A. et al. Stabilization of i-motif structures by 2'- $\beta$ -fluorination of DNA // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № 11. P. 4998–5009. doi: 10.1093/nar/gkw402.
509. Kumar N., Petersen M., Maiti S. Tunable c-MYC LNA i-motif // *Chem. Commun.* 2009. № 12. P. 1532. doi: 10.1039/b819305c.
510. Kumar N. et al. i-Motif Formation with Locked Nucleic Acid (LNA) // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. Vol. 46, № 48. P. 9220–9222. doi: 10.1002/anie.200701667.

511. Pasternak A., Wengel J. Modulation of i-motif thermodynamic stability by the introduction of UNA (unlocked nucleic acid) monomers // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. Vol. 21, № 2. P. 752–755. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.11.106.
512. Mergny J. Kinetics and thermodynamics of i-DNA formation: phosphodiester versus modified oligodeoxynucleotides // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26, № 21. P. 4797–4803. doi: 10.1093/nar/26.21.4797.
513. Chen C. et al. Study of pH-Induced Folding and Unfolding Kinetics of the DNA i-Motif by Stopped-Flow Circular Dichroism // *Langmuir*. 2012. Vol. 28, № 51. P. 17743–17748. doi: 10.1021/la303851a.
514. Modi S. et al. A DNA nanomachine that maps spatial and temporal pH changes inside living cells // *Nat. Nanotechnol.* 2009. Vol. 4, № 5. P. 325–330. doi: 10.1038/nnano.2009.83.
515. Surana S. et al. An autonomous DNA nanomachine maps spatiotemporal pH changes in a multicellular living organism // *Nat. Commun.* 2011. Vol. 2, № 1. P. 340. doi: 10.1038/ncomms1340.
516. Modi S. et al. Two DNA nanomachines map pH changes along intersecting endocytic pathways inside the same cell // *Nat. Nanotechnol.* 2013. Vol. 8, № 6. P. 459–467. doi: 10.1038/nnano.2013.92.
517. Dembska A., Kierzek E., Juskowiak B. Studying the influence of stem composition in pH-sensitive molecular beacons onto their sensing properties // *Anal. Chim. Acta.* 2017. Vol. 990. P. 157–167. doi: 10.1016/j.aca.2017.07.040.
518. Mergny J.-L. Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № 16. P. e138–e138. doi: 10.1093/nar/gni134.
519. Mergny J.-L. Fluorescence Energy Transfer as a Probe for Tetraplex Formation: The i-Motif // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38, № 5. P. 1573–1581. doi: 10.1021/bi982208r.
520. Canalia M. Structure, internal motions and association-dissociation kinetics of the i-motif dimer of d(5mCCTCACTCC) // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № 17. P. 5471–5481. doi: 10.1093/nar/gki843.
521. Zhao Y. et al. The Folding and Unfolding Kinetics of the i-Motif Structure Formed by the C-Rich Strand of Human Telomere DNA // *ChemBioChem.* 2005. Vol. 6, № 11. P. 1957–1960. doi: 10.1002/cbic.200500175.
522. Leroy J.-L. The formation pathway of i-motif tetramers // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37, № 12. P. 4127–4134. doi: 10.1093/nar/gkp340.
523. Lieblein A.L. et al. Time-Resolved NMR Spectroscopic Studies of DNA i-Motif Folding Reveal Kinetic Partitioning // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012. Vol. 51, № 1. P. 250–253. doi: 10.1002/anie.201104938.

524. Heinen L., Walther A. Temporal control of i-motif switch lifetimes for autonomous operation of transient DNA nanostructures // *Chem. Sci.* 2017. Vol. 8, № 5. P. 4100–4107. doi: 10.1039/C7SC00646B.
525. Wang J. et al. Oscillatory Reaction Induced Periodic C-Quadruplex DNA Gating of Artificial Ion Channels // *ACS Nano.* 2017. Vol. 11, № 3. P. 3022–3029. doi: 10.1021/acsnano.6b08727.
526. Zhu J. et al. pH-Responsive Nanoparticle Superlattices with Tunable DNA Bonds // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. Vol. 140, № 15. P. 5061–5064. doi: 10.1021/jacs.8b02793.
527. Ma W. et al. Hairpin-Contained i-Motif Based Fluorescent Ratiometric Probe for High-Resolution and Sensitive Response of Small pH Variations // *Anal. Chem.* 2018. Vol. 90, № 3. P. 1889–1896. doi: 10.1021/acs.analchem.7b03972.
528. Majdi A. et al. Permissive role of cytosolic pH acidification in neurodegeneration: A closer look at its causes and consequences // *J. Neurosci. Res.* 2016. Vol. 94, № 10. P. 879–887. doi: 10.1002/jnr.23757.
529. Tyrtysnaia A.A. et al. Acute neuroinflammation provokes intracellular acidification in mouse hippocampus // *J. Neuroinflammation.* 2016. Vol. 13, № 1. P. 283. doi: 10.1186/s12974-016-0747-8.
530. Bathina S., Das U.N. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications // *Arch. Med. Sci.* 2015. Vol. 6. P. 1164–1178. doi: 10.5114/aoms.2015.56342.
531. Shi M., Fu J. Alligator Weed *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. // *Biological Invasions and Its Management in China* / ed. Wan F., Jiang M., Zhan A. Singapore: Springer Singapore, 2017. P. 163–173. doi: 10.1007/978-981-10-3427-5\_12.
532. Garabedian A. et al. Structures of the kinetically trapped i-motif DNA intermediates // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. Vol. 18, № 38. P. 26691–26702. doi: 10.1039/C6CP04418B.
533. Abdelhamid M.A.S., Waller Z.A.E. Tricky Topology: Persistence of Folded Human Telomeric i-Motif DNA at Ambient Temperature and Neutral pH // *Front. Chem.* 2020. Vol. 8. P. 40. doi: 10.3389/fchem.2020.00040.
534. Ruffin V.A. et al. Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons // *Front. Physiol.* 2014. Vol. 5. doi: 10.3389/fphys.2014.00043.
535. Chen A.K. et al. Assessing the Sensitivity of Commercially Available Fluorophores to the Intracellular Environment // *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80, № 19. P. 7437–7444. doi: 10.1021/ac8011347.
536. Levitus M., Ranjit S. Cyanine dyes in biophysical research: the photophysics of polymethine fluorescent dyes in biomolecular environments // *Q. Rev. Biophys.* 2011. Vol. 44, № 1. P. 123–151. doi: 10.1017/S0033583510000247.

537. Lietard J., Ameer D., Somoza M.M. Sequence-dependent quenching of fluorescein fluorescence on single-stranded and double-stranded DNA // *RSC Adv.* 2022. Vol. 12, № 9. P. 5629–5637. doi: 10.1039/D2RA00534D.
538. Nesterova I.V., Nesterov E.E. Rational Design of Highly Responsive pH Sensors Based on DNA i-Motif // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. Vol. 136, № 25. P. 8843–8846. doi: 10.1021/ja501859w.
539. Garavís M. et al. Centromeric Alpha-Satellite DNA Adopts Dimeric i-Motif Structures Capped by AT Hoogsteen Base Pairs // *Chem. – Eur. J.* 2015. Vol. 21, № 27. P. 9816–9824. doi: 10.1002/chem.201500448.
540. Yue X. et al. DNA-Based pH Nanosensor with Adjustable FRET Responses to Track Lysosomes and pH Fluctuations // *Anal. Chem.* 2021. Vol. 93, № 19. P. 7250–7257. doi: 10.1021/acs.analchem.1c00436.
541. Martynov V.I. et al. Genetically encoded fluorescent indicators for live cell pH imaging // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 2018. Vol. 1862, № 12. P. 2924–2939. doi: 10.1016/j.bbagen.2018.09.013.
542. Bielecka P., Dembska A., Juskowiak B. Monitoring of pH Using an i-Motif-Forming Sequence Containing a Fluorescent Cytosine Analogue, tC // *Molecules.* 2019. Vol. 24, № 5. P. 952. doi: 10.3390/molecules24050952.
543. Shen S. et al. Hill-type pH probes // *Anal. Bioanal. Chem.* 2023. Vol. 415, № 18. P. 3693–3702. doi: 10.1007/s00216-023-04515-y.
544. Börjesson K. et al. Nucleic Acid Base Analog FRET-Pair Facilitating Detailed Structural Measurements in Nucleic Acid Containing Systems // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. Vol. 131, № 12. P. 4288–4293. doi: 10.1021/ja806944w.
545. Campbell J.M., Bacon T.A., Wickstrom E. Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1990. Vol. 20, № 3. P. 259–267. doi: 10.1016/0165-022X(90)90084-P.
546. White K.A., Grillo-Hill B.K., Barber D.L. Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance // *J. Cell Sci.* 2017. Vol. 130, № 4. P. 663–669. doi: 10.1242/jcs.195297.
547. Leonetti J.P. et al. Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991. Vol. 88, № 7. P. 2702–2706. doi: 10.1073/pnas.88.7.2702.
548. Lorenz P. Nucleocytoplasmic shuttling: a novel in vivo property of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 2. P. 582–592. doi: 10.1093/nar/28.2.582.



549. Bratu D.P. et al. Visualizing the distribution and transport of mRNAs in living cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. Vol. 100, № 23. P. 13308–13313. doi: 10.1073/pnas.2233244100.
550. Tyagi S., Alsmadi O. Imaging Native  $\beta$ -Actin mRNA in Motile Fibroblasts // *Biophys. J.* 2004. Vol. 87, № 6. P. 4153–4162. doi: 10.1529/biophysj.104.045153.
551. Mhlanga M.M. tRNA-linked molecular beacons for imaging mRNAs in the cytoplasm of living cells // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № 6. P. 1902–1912. doi: 10.1093/nar/gki302.
552. Spiller D.G. et al. Improving the Intracellular Delivery and Molecular Efficacy of Antisense Oligonucleotides in Chronic Myeloid Leukemia Cells: A Comparison of Streptolysin-O Permeabilization, Electroporation, and Lipophilic Conjugation // *Blood*. 1998. Vol. 91, № 12. P. 4738–4746. doi: 10.1182/blood.V91.12.4738.
553. Tsybulsky D.A. et al. Molecular beacons with JOE dye: Influence of linker and 3' couple quencher // *Mol. Cell. Probes*. 2016. Vol. 30, № 5. P. 285–290. doi: 10.1016/j.mcp.2016.10.003.
554. Drake T.J., Tan W. Molecular Beacon DNA Probes and Their Bioanalytical Applications // *Appl. Spectrosc.* 2004. Vol. 58, № 9. P. 269A–280A. doi: 10.1366/0003702041959406.
555. Torimura M. et al. Fluorescence-Quenching Phenomenon by Photoinduced Electron Transfer between a Fluorescent Dye and a Nucleotide Base // *Anal. Sci.* 2001. Vol. 17, № 1. P. 155–160. doi: 10.2116/analsci.17.155.
556. King J.J. et al. DNA G-Quadruplex and i-Motif Structure Formation Is Interdependent in Human Cells // *J. Am. Chem. Soc.* 2020. Vol. 142, № 49. P. 20600–20604. doi: 10.1021/jacs.0c11708.
557. Abou Assi H. et al. i-Motif DNA: structural features and significance to cell biology // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46, № 16. P. 8038–8056. doi: 10.1093/nar/gky735.
558. Dettler J.M. et al. Biophysical Characterization of an Ensemble of Intramolecular i-Motifs Formed by the Human c-MYC NHE III1 P1 Promoter Mutant Sequence // *Biophys. J.* 2010. Vol. 99, № 2. P. 561–567. doi: 10.1016/j.bpj.2010.04.042.
559. Shin D., Sinkeldam R.W., Tor Y. Emissive RNA Alphabet // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133, № 38. P. 14912–14915. doi: 10.1021/ja206095a.
560. Schmidt O.P., Mata G., Luedtke N.W. Fluorescent Base Analogue Reveals T-Hg<sup>II</sup>-T Base Pairs Have High Kinetic Stabilities That Perturb DNA Metabolism // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. Vol. 138, № 44. P. 14733–14739. doi: 10.1021/jacs.6b09044.
561. Güixens-Gallardo P., Hocek M. Acetophenyl-thienyl-aniline-Linked Nucleotide for Construction of Solvatochromic Fluorescence Light-Up DNA Probes Sensing Protein-DNA Interactions // *Chem. – Eur. J.* 2021. Vol. 27, № 24. P. 7090–7093. doi: 10.1002/chem.202100575.

562. Wright E.P. et al. Mitoxantrone and Analogues Bind and Stabilize i-Motif Forming DNA Sequences // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 39456. doi: 10.1038/srep39456.
563. Browne D.T., Eisinger J., Leonard N.J. Synthetic spectroscopic models related to coenzymes and base pairs. II. Evidence for intramolecular base-base interactions in dinucleotide analogs // *J. Am. Chem. Soc.* 1968. Vol. 90, № 26. P. 7302–7323. doi: 10.1021/ja01028a023.
564. Antipova O.M. et al. Advances in the Application of Modified Nucleotides in SELEX Technology // *Biochem. Mosc.* 2018. Vol. 83, № 10. P. 1161–1172. doi: 10.1134/S0006297918100024.
565. Duo J. et al. Slow Off-Rate Modified Aptamer (SOMAmer) as a Novel Reagent in Immunoassay Development for Accurate Soluble Glypican-3 Quantification in Clinical Samples // *Anal. Chem.* 2018. Vol. 90, № 8. P. 5162–5170. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05277.
566. Abeydeera N.D. et al. Evoking picomolar binding in RNA by a single phosphorodithioate linkage // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № 17. P. 8052–8064. doi: 10.1093/nar/gkw725.
567. Davies D.R. et al. Unique motifs and hydrophobic interactions shape the binding of modified DNA ligands to protein targets // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. Vol. 109, № 49. P. 19971–19976. doi: 10.1073/pnas.1213933109.
568. Yatime L. et al. Structural basis for the targeting of complement anaphylatoxin C5a using a mixed L-RNA/L-DNA aptamer // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6, № 1. P. 6481. doi: 10.1038/ncomms7481.
569. Zavyalova E.G. et al. Putative Mechanisms Underlying High Inhibitory Activities of Bimodular DNA Aptamers to Thrombin // *Biomolecules.* 2019. Vol. 9, № 2. P. 41. doi: 10.3390/biom9020041.
570. Zavyalova E. et al. Cation Coordination Alters the Conformation of a Thrombin-Binding G-Quadruplex DNA Aptamer That Affects Inhibition of Thrombin // *Nucleic Acid Ther.* 2016. Vol. 26, № 5. P. 299–308. doi: 10.1089/nat.2016.0606.
571. Bai X. et al. Enhanced Binding Affinity for an i-Motif DNA Substrate Exhibited by a Protein Containing Nucleobase Amino Acids // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. Vol. 139, № 13. P. 4611–4614. doi: 10.1021/jacs.6b11825.
572. Xin B.-G. et al. Structural insights into the N-terminal APHB domain of HrpA: mediating canonical and i-motif recognition // *Nucleic Acids Res.* 2024. Vol. 52, № 6. P. 3406–3418. doi: 10.1093/nar/gkae138.
573. Musafia B., Oren-Banaroya R., Noiman S. Designing Anti-Influenza Aptamers: Novel Quantitative Structure Activity Relationship Approach Gives Insights into Aptamer – Virus

- Interaction // PLoS ONE / ed. Barash D. 2014. Vol. 9, № 5. P. e97696. doi: 10.1371/journal.pone.0097696.
574. Mir B. et al. Site-specific incorporation of a fluorescent nucleobase analog enhances i-motif stability and allows monitoring of i-motif folding inside cells // *Nucleic Acids Res.* 2024. Vol. 52, № 6. P. 3375–3389. doi: 10.1093/nar/gkae106.
  575. Serrano-Chacón I. et al. Structure of i-Motif/Duplex Junctions at Neutral pH // *J. Am. Chem. Soc.* 2021. Vol. 143, № 33. P. 12919–12923. doi: 10.1021/jacs.1c04679.
  576. Koag M.-C., Jung H., Lee S. Mutagenic Replication of the Major Oxidative Adenine Lesion 7,8-Dihydro-8-oxoadenine by Human DNA Polymerases // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. Vol. 141, № 11. P. 4584–4596. doi: 10.1021/jacs.8b08551.
  577. Leonard G.A. et al. Conformation of guanine.cntdot.8-oxoadenine base pairs in the crystal structure of d(CGCGAATT(O8A)GCG) // *Biochemistry.* 1992. Vol. 31, № 36. P. 8415–8420. doi: 10.1021/bi00151a004.
  578. Koag M.-C., Jung H., Lee S. Mutagenesis mechanism of the major oxidative adenine lesion 7,8-dihydro-8-oxoadenine // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, № 9. P. 5119–5134. doi: 10.1093/nar/gkaa193.
  579. Delaney J.C. et al. AlkB reverses etheno DNA lesions caused by lipid oxidation in vitro and in vivo // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. Vol. 12, № 10. P. 855–860. doi: 10.1038/nsmb996.
  580. Guengerich F.P., Crawford W.M., Watanabe P.G. Activation of vinyl chloride to covalently bound metabolites: roles of 2-chloroethylene oxide and 2-chloroacetaldehyde // *Biochemistry.* 1979. Vol. 18, № 23. P. 5177–5182. doi: 10.1021/bi00590a023.
  581. El Ghissassi F. et al. Formation of 1,N6-Ethenoadenine and 3,N4-Ethenocytosine by Lipid Peroxidation Products and Nucleic Acid Bases // *Chem. Res. Toxicol.* 1995. Vol. 8, № 2. P. 278–283. doi: 10.1021/tx00044a013.
  582. De Los Santos C. et al. NMR studies of the exocyclic 1,N6-ethenodeoxyadenosine adduct (.epsilon.dA) opposite deoxyguanosine in a DNA duplex. .epsilon.dA(syn).cntdot.dG(anti) pairing at the lesion site // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30, № 7. P. 1828–1835. doi: 10.1021/bi00221a015.
  583. Pandya G.A., Moriya M. 1, N<sup>6</sup> -Ethenodeoxyadenosine, a DNA Adduct Highly Mutagenic in Mammalian Cells // *Biochemistry.* 1996. Vol. 35, № 35. P. 11487–11492. doi: 10.1021/bi960170h.
  584. Tolentino J.H. et al. Inhibition of DNA replication fork progression and mutagenic potential of 1, N6-ethenoadenine and 8-oxoguanine in human cell extracts // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 36, № 4. P. 1300–1308. doi: 10.1093/nar/gkm1157.

585. Levine R.L. et al. Mutagenesis induced by a single 1,N6-ethenodeoxyadenosine adduct in human cells // *Cancer Res.* 2000. Vol. 60, № 15. P. 4098–4104.
586. Chatgililoglu C., Navacchia M.L., Postigo A. A facile one-pot synthesis of 8-oxo-7,8-dihydro-(2'-deoxy)adenosine in water // *Tetrahedron Lett.* 2006. Vol. 47, № 5. P. 711–714. doi: 10.1016/j.tetlet.2005.11.099.
587. Kouchakdjian M. et al. NMR studies of the exocyclic 1,N4-ethenodeoxyadenosine adduct ( $\epsilon$ .dA) opposite thymidine in a DNA duplex. Nonplanar alignment of  $\epsilon$ .dA(anti) and dT(anti) at the lesion site // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30, № 7. P. 1820–1828. doi: 10.1021/bi00221a014.
588. Chen J.J. et al. Enzymatic Primer-Extension with Glycerol-Nucleoside Triphosphates on DNA Templates // *PLoS ONE* / ed. Romesberg F. 2009. Vol. 4, № 3. P. e4949. doi: 10.1371/journal.pone.0004949.
589. Müller J. Metal-Ion-Mediated Base Pairs in Nucleic Acids // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2008. Vol. 2008, № 24. P. 3749–3763. doi: 10.1002/ejic.200800301.
590. Petrovec K., Ravoo B.J., Müller J. Cooperative formation of silver(i)-mediated base pairs // *Chem. Commun.* 2012. Vol. 48, № 97. P. 11844. doi: 10.1039/c2cc36169h.
591. Schweizer K. et al. Thermodynamics of the formation of Ag(I)-mediated azole base pairs in DNA duplexes // *J. Inorg. Biochem.* 2016. Vol. 160. P. 256–263. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.03.003.
592. Vorlíčková M. et al. Circular Dichroism Spectroscopy of DNA: From Duplexes to Quadruplexes // *Chirality.* 2012. Vol. 24, № 9. P. 691–698. doi: 10.1002/chir.22064.
593. Mandal S., Hebenbrock M., Müller J. Relative Strand Orientation in a DNA Duplex Controls the Nuclearity of a Metal-Mediated Base Pair // *Chem. – Eur. J.* 2017. Vol. 23, № 25. P. 5962–5965. doi: 10.1002/chem.201605327.
594. Hossain M.N., Ahmad S., Kraatz H. Consecutive Silver(I) Ion Incorporation into Oligonucleotides containing Cytosine-Cytosine Mispairs // *ChemPlusChem.* 2021. Vol. 86, № 2. P. 224–231. doi: 10.1002/cplu.202000607.
595. Escher D., Müller J. Silver(I) Coordination in Silver(I)-Mediated Homo Base Pairs of 6-Pyrazolylpurine in DNA Duplexes Involves the Watson–Crick Edge // *Chem. – Eur. J.* 2020. Vol. 26, № 68. P. 16043–16048. doi: 10.1002/chem.202002803.
596. Riccardi C. et al. G-quadruplex-based aptamers targeting human thrombin: Discovery, chemical modifications and antithrombotic effects // *Pharmacol. Ther.* 2021. Vol. 217. P. 107649. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107649.

597. Schultze P., Macaya R.F., Feigon J. Three-dimensional Solution Structure of the Thrombin-binding DNA Aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG) // *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 235, № 5. P. 1532–1547. doi: 10.1006/jmbi.1994.1105.
598. Russo Krauss I. et al. High-resolution structures of two complexes between thrombin and thrombin-binding aptamer shed light on the role of cations in the aptamer inhibitory activity // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, № 16. P. 8119–8128. doi: 10.1093/nar/gks512.
599. Xu G. et al. A simple pyrene-pyridinium-based fluorescent probe for colorimetric and ratiometric sensing of sulfite // *Dyes Pigments.* 2015. Vol. 120. P. 322–327. doi: 10.1016/j.dyepig.2015.04.038.
600. Gao C. et al. Two-photon fluorescence and fluorescence imaging of two styryl heterocyclic dyes combined with DNA // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2016. Vol. 156. P. 1–8. doi: 10.1016/j.saa.2015.11.014.
601. Tsuda M., Kawazoe Y. Catalytic Hydrogenation of Dimethylpyridine Methiodides and Stereochemistry of Hydrogenation Products // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 1970. Vol. 18, № 12. P. 2499–2506. doi: 10.1248/cpb.18.2499.
602. Yang F. et al. Synthesis and nonlinear optical absorption properties of two new conjugated ferrocene-bridge-pyridinium compounds // *Tetrahedron.* 2007. Vol. 63, № 37. P. 9188–9194. doi: 10.1016/j.tet.2007.06.058.
603. Shen D. et al. Design, synthesis and evaluation of a novel fluorescent probe to accurately detect H<sub>2</sub>S in hepatocytes and natural waters // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2020. Vol. 228. P. 117690. doi: 10.1016/j.saa.2019.117690.
604. Caruso U. et al. New side-chain polyurethanes with highly conjugated push–pull chromophores for second order NLO applications // *Opt. Mater.* 2005. Vol. 27, № 12. P. 1800–1810. doi: 10.1016/j.optmat.2004.11.009.
605. Baldridge A., Kowalik J., Tolbert L. Efficient Synthesis of New 4-Arylideneimidazolin-5-ones Related to the GFP Chromophore by 2+3 Cyclocondensation of Arylideneimines with Imidate Ylides // *Synthesis.* 2010. Vol. 2010, № 14. P. 2424–2436. doi: 10.1055/s-0029-1218796.
606. Rodgers B.J. et al. Functionalized Tricyclic Cytosine Analogues Provide Nucleoside Fluorophores with Improved Photophysical Properties and a Range of Solvent Sensitivities // *Chem. – Eur. J.* 2014. Vol. 20, № 7. P. 2010–2015. doi: 10.1002/chem.201303410.
607. Zhang K. et al. A Smart Latent Catalyst Containing *o*-Trifluoroacetamide Functional Benzoxazine: Precursor for Low Temperature Formation of Very High Performance Polybenzoxazole with Low Dielectric Constant and High Thermal Stability // *Macromolecules.* 2017. Vol. 50, № 17. P. 6552–6560. doi: 10.1021/acs.macromol.7b00887.

608. Kausar A. et al. Tuning DNA Stability To Achieve Turnover in Template for an Enzymatic Ligation Reaction // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011. Vol. 50, № 38. P. 8922–8926. doi: 10.1002/anie.201102579.
609. Wawrzyniak-Turek K., Höbartner C. Enzymatic combinatorial nucleoside deletion scanning mutagenesis of functional RNA // *Chem. Commun.* 2014. Vol. 50, № 75. P. 10937. doi: 10.1039/C4CC04719B.
610. Jakobsen U., Vogel S. Mismatch discrimination of lipidated DNA and LNA-probes (LiNAs) in hybridization-controlled liposome assembly // *Org. Biomol. Chem.* 2016. Vol. 14, № 29. P. 6985–6995. doi: 10.1039/C6OB01120A.
611. Farzan V.M. et al. Automated Solid-Phase Click Synthesis of Oligonucleotide Conjugates: From Small Molecules to Diverse *N*-Acetylgalactosamine Clusters // *Bioconjug. Chem.* 2017. Vol. 28, № 10. P. 2599–2607. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00462.
612. Peñuelas-Urquides K. et al. Measuring of *Mycobacterium tuberculosis* growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units // *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* 2013. Vol. 44, № 1. P. 287–289. doi: 10.1590/S1517-83822013000100042.
613. Aseev L.V. et al. Regulation of Ribosomal Protein Synthesis in *Mycobacteria*: The Autogenous Control of *rpsO* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 18. P. 9679. doi: 10.3390/ijms22189679.
614. Kaloudas D., Pavlova N., Penchovsky R. EBWS: Essential Bioinformatics Web Services for Sequence Analyses // *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 2019. Vol. 16, № 3. P. 942–953. doi: 10.1109/TCBB.2018.2816645.
615. Zhuchkov V.A. et al. [Development of a Series of Neutralizing Nanobodies against SARS-CoV-2 Spike Protein] // *Mol. Biol. (Mosk.)*. 2023. Vol. 57, № 3. P. 505–516.
616. Lipatova A.V. et al. Multi-Omics Analysis of Glioblastoma Cells' Sensitivity to Oncolytic Viruses // *Cancers*. 2021. Vol. 13, № 21. P. 5268. doi: 10.3390/cancers13215268.
617. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods*. 1983. Vol. 65, № 1–2. P. 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
618. Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche // *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Für Exp. Pathol. Pharmacol.* 1931. Vol. 162, № 4. P. 480–483. doi: 10.1007/BF01863914.
619. Lei C. et al. On the Calculation of TCID<sub>50</sub> for Quantitation of Virus Infectivity // *Virol. Sin.* 2021. Vol. 36, № 1. P. 141–144. doi: 10.1007/s12250-020-00230-5.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность:

- коллективу лаборатории структуры и функций биополимеров (Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства, Москва) и особенно ее руководителю - Варижук Анне Михайловне за помощь в выполнении экспериментальной части работы и анализе полученных результатов, а также за помощь в подготовке текста и оформлении диссертации;
- коллективам лаборатории молекулярного дизайна и синтеза, лаборатории регуляторной транскриптомики, лаборатории структурной биологии ионных каналов, лаборатории молекулярной иммунологии и лаборатории химии гетероциклических соединений) (ГНЦ ИБХ РАН);
- сотрудникам кафедры химии природных соединений (химический факультет МГУ);
- сотрудникам лаборатории ядерных реакций им. Флерова (Объединенный институт ядерных исследований);
- сотрудникам лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом (Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Институт полиомиелита);
- сотрудникам института химической физики Rocasolano (Мадрид, Испания), института неорганической и аналитической химии университета Мюнстера (Мюнстер, Германия) и кафедры биологической инженерии и кафедры химии и центра по изучению влияния экологических факторов на здоровье человека (Массачусетский технологический институт, Кэмбридж, США);
- Зацепину Тимофею Сергеевичу за синтез олигонуклеотидов;
- Коршуну Владимиру Аркадьевичу и Алферовой Вере Александровне за плодотворное обсуждение и помощь в очистке соединений;
- Беляеву Евгению Семеновичу за регистрацию ЯМР-спектров;
- коллегам по группе молекулярных инструментов для исследования живых систем и
- своей семье за многолетнюю поддержку и вдохновение в работе и жизни.