



УДК 577.113.6:547.791.2

## МОДИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ [3 + 2]-ДИПОЛЯРНОГО ЦИКЛОПРИСОЕДИНЕНИЯ АЗИДОВ И АЛКИНОВ

© 2010 г. А. В. Устинов\*, И. А. Степанова\*, В. В. Дубнякова\*, Т. С. Зацепин\*\*,\*\*\*, Е. В. Ножевникова\*, В. А. Коршун\*\*

\*Учреждение РАН Институт биорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\*\*Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва;

\*\*\*Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва

Поступила в редакцию 17.06.2009 г. Принята к печати 28.09.2009 г.

Рассмотрено применение реакции циклоприсоединения азидов и алкинов для синтеза конъюгатов нуклеиновых кислот (НК) и аналогов олигодезоксирибонуклеотидов. Обобщены сведения о химических и ферментативных методах введения азидов и алкинов в ДНК.

Ключевые слова: азиды; алкины; циклоприсоединение; нуклеиновые кислоты, олигонуклеотиды, модификация.

## СОДЕРЖАНИЕ

1. Реакция Хьюсгена–Мельдаля–Шарплесса (CuAAC)
2. Введение азидогруппы в олигонуклеотиды и ДНК
3. Введение терминальных алкинов в олигонуклеотиды и ДНК
4. Модификация ДНК с помощью CuAAC с участием твердой фазы
5. Модификация ДНК с помощью CuAAC в растворе
6. CuAAC в синтезе аналогов олигомеров ДНК
7. Присоединение к азидам алкинов, активированных напряжением цикла

## Заключение

## 1. РЕАКЦИЯ ХЬЮСГЕНА–МЕЛЬДАЛЯ–ШАРПЛЕССА (КАТАЛИЗИРУЕМОЕ Cu(I) ЦИКЛОПРИСОЕДИНЕНИЕ АЗИДОВ И АЛКИНОВ, CuAAC)

Первый алкин, собственно ацетилен, был открыт Эдмундом Дэви в 1837 г. [1], а в 1864 г. Грисс описал органические азиды как новый класс соеди-

нений [2]. В конце XIX века было опубликовано первое сообщение о реакции азидов с алкином с образованием 1,2,3-триазола [3]: выдерживая на свету или нагревая в запаянной ампуле (8 ч при 100°C) эфирный раствор фенилазида (1) и диметилового эфира ацетилендикарбоновой кислоты (2), Михаэль получил соответствующий триазол (3) (схема 1).

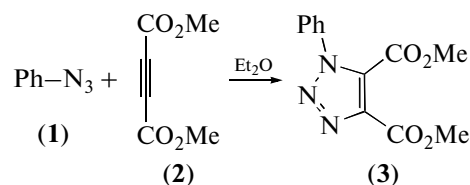


Схема 1. Первый синтез 1,2,3-триазола с помощью реакции циклоприсоединения [3].

На рубеже 1950–60-х гг. Хьюсген разработал общую концепцию 1,3-диполярного циклоприсоединения [4, 5], одним из вариантов которого является реакция азидов с алкинами. В последующие полвека эта реакция активно изучалась. Но ее широкому распространению мешало то обстоятельство, что при взаимодействии несимметричных или терминальных алкинов с азидом (4) образуется смесь (зачастую трудноразделимая) двух изомерных триазолов. Например, в случае терминальных алкинов (5) это 1,4- (6) и 1,5-дизамещенные (7) триазолы (схема 2). Соотношение продуктов зависело от типов заместителей R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> в соединениях (4) и (5) и от условий реакции, но получать исключительно тот или иной изомер триазола не удавалось.

Сокращения: НК – нуклеиновые кислоты; 3'-AZT – 3'-азидо-3'-дезокситимидин; CuAAC – катализируемое Cu(I) циклоприсоединение азидов и алкинов ((Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition); DBU – 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-ен; DIEA – диизопропилэтиламин; Dmt – 4,4'-диметокситриптил; ТВТА – *трис*(1-бензил-1,2,3-триазол-4-илметил)амин; ТСЕР – *трис*(2-карбоксиил)фосфин; ТНРТА – *трис*[1-(3-гидроксипропил)-1,2,3-триазол-4-илметил]амин.

# Автор для связи (тел.: (495) 429-87-10; эл. почта: korshun@ibch.ru).

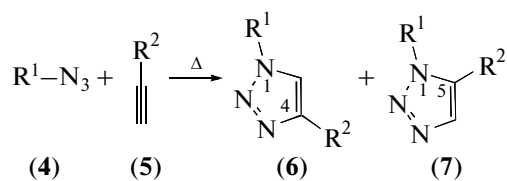


Схема 2. Присоединение азидов к терминальным алкинам.

Прорыв был осуществлен в XXI веке: в 2002 г. группами Мельдаля [6] и Шарплесса [7] было обнаружено, что соединения меди(I) способны эффективно катализировать эту реакцию с участием терминальных алкинов, а сама реакция становится региоспецифичной — приводит исключительно к 1,4-дизамещенным 1,2,3-триазолам (6). Это связано с тем, что катализ коренным образом меняет механизм реакции. Если термическое 1,3-диполярное циклоприсоединение Хьюсена является синхронным процессом, то реакция с участием одновалентной меди протекает ступенчато. Был предложен механизм этой реакции [7, 8], включающий образование из алкина (5) и катализатора (8) ацетиленида меди (9), затем присоединение азидата (4), циклизацию образующегося интермедиата (10) в структуру (11), с последующим сужением цикла и образованием медного производного триазола (12) и, наконец, гидролизом связи медь—углерод (схема 3). Для такого пути реакции энергия интермедиатов сильно снижена и поэтому общая скорость превращения увеличивается на 7–8 порядков по сравнению с согласованным процессом. Для реакции введена аббревиатура CuAAC (Cu(I)-catalyzed azide–alkyne cy-cloaddition).

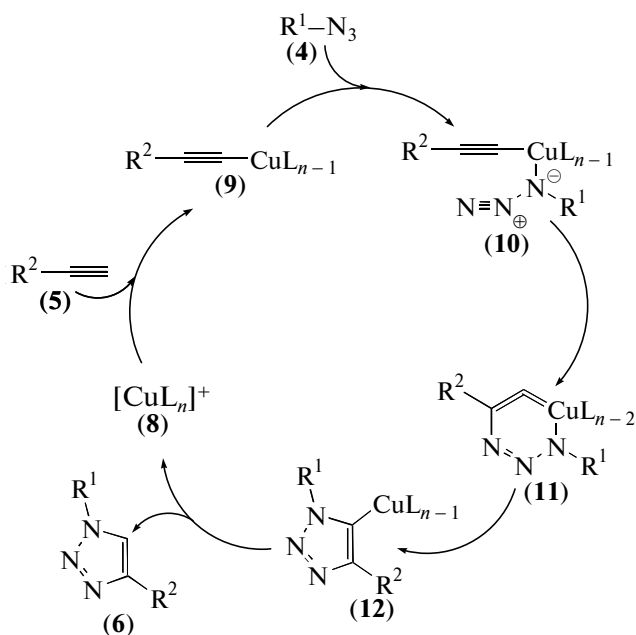
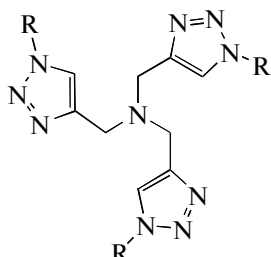


Схема 3. Механизм Cu(I)-катализируемого циклоприсоединения азидов и терминальных алкинов (CuAAC) [7, 8]. L — одновалентные лиганды.

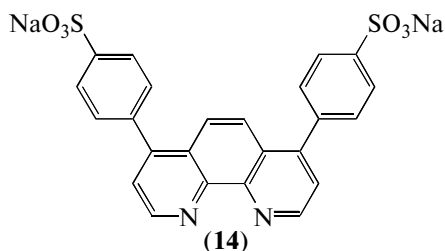
Кинетику CuAAC изучали в отсутствие сильно-связывающих лигандов для меди, когда катализатор Cu(I) получали *in situ* из CuSO<sub>4</sub> и аскорбата натрия [9]. В присутствии избытка Cu(I) реакция имеет первый порядок по азиду и немного более высокий, чем первый порядок, — по алкину. При соотношении азид–алкин 1 : 1 реакция имеет второй порядок по меди, что может свидетельствовать об участии Cu(I) в катализе в виде димерного комплекса. Предполагается, что интермедиат (12) может содержать двухъядерный медный кластер, в том числе скоординированный с дополнительным остатком алкина (5). Но принципиально структура интермедиата (12) как 5-металлзамещенного 1,2,3-триазола не вызывает сомнений, поскольку применение в качестве алкина PhC≡CD в протонных растворителях не приводило к включению дейтерия в конечный триазол и, наоборот, реакция с PhC≡CH в присутствии D<sub>2</sub>O или MeOD давала высокую степень дейтерирования продукта в положение 5 [9]. В дальнейшем теоретические исследования подтвердили, что катализаторами могут выступать именно медные кластеры [10, 11].

Недавно Фокин, Шарплесс и сотр. сообщили [12], что йодалкины RC≡CI в условиях CuAAC взаимодействуют с азидатами с образованием 4-R-5-йод-1,2,3-триазолов, причем скорость реакции выше, чем для соответствующих терминальных алкинов RC≡CH. Авторы обсуждают два возможных механизма реакции. Первый механизм соответствует изображенному на схеме 3; лишь на последней стадии интермедиат (12) вступает в реакцию обмена с RC≡CI, давая ацетиленид (9) и продукт, 4-R-5-йод-1,2,3-триазол. По второму механизму реакция также протекает через циклическое переходное состояние, но связь углерод–йод сохраняется в течение всего пути реакции. Исследователи отдают предпочтение второму механизму, поскольку даже в протонных растворителях или с субстратами, содержащими спиртовые группы, продуктами реакции являются только 5-йодтриазолы [12].

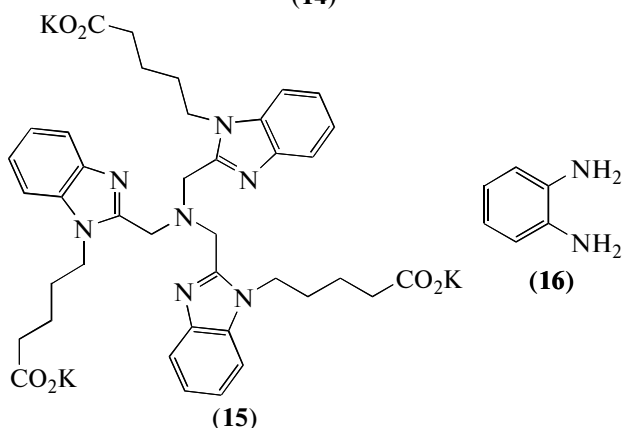
С целью повышения эффективности процесса CuAAC был предпринят поиск подходящих лигандов для меди(I) [13–21]. В качестве хелатирующих добавок наилучшие результаты показали *triac*(бензилтриазолилметил)амин (ТВТА) (13а) [13–15], *triac*(гидроксипропилтриазолилметил)амин (ТНРТА) (13б) [14], сульфированный батофенантролин (14) [15, 16], бензимидазольное производное (15) [17, 18], а также *o*-фенилендиамин (16) [19]. Для проведения CuAAC в малополярных растворителях были предложены лиганды (17а,б) [20] и (18) [21].



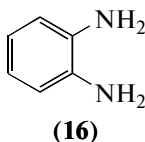
(13a): R = Bn  
(136): R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH



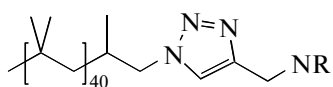
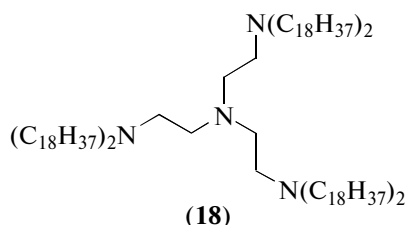
(14)



(15)



(16)

(17a): R = —CH<sub>2</sub>—(176): R = —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NEt<sub>2</sub>

(18)

Следует отметить, что еще в 1960-е гг. исследовались реакции ацетиленидов магния [22–24] и лития [25] с азидами. Продуктами циклоприсоединения в них являются исключительно 1,5-дизамещенные 1,2,3-триазолы (7). Очевидно, что, как и в случае медьпроизводных, эта реакция является ступенчатой, а не синхронной. Полезность этого метода для

синтеза соединений (7) была недавно подтверждена [26], а затем были разработаны эффективные рутениевые катализаторы, которые позволяют получать 1,5-дизамещенные 1,2,3-триазолы (7) прямо из терминальных ацетиленов [27–29]. Но все варианты реакции азидов и алкинов, специфично приводящие к 1,5-дизамещенным триазолам, проводятся в органических растворителях, часто в достаточно жестких условиях (например, кипение в толуоле) и поэтому, по состоянию на сегодняшний день, не имеют перспектив для получения конъюгатов биомолекул в водной среде.

Реакция CuAAC, называемая также реакцией Хьюстена–Мельдаля–Шарплесса, специфично приводящая к 1,4-дизамещенным 1,2,3-триазолам (6) и протекающая в мягких условиях в широком диапазоне растворителей, в том числе в воде, оказалась исключительно эффективным методом комбинаторной химии, функционализации полимеров и поверхностей, синтеза дендримеров и биоконъюгации. С момента открытия медного катализа в 2002 г. по этой теме опубликованы многие сотни статей и большое число обзоров [30–68].

Получение ковалентных конъюгатов биомолекул — как низкомолекулярных соединений, так и биополимеров — весьма важная область биоорганической химии, поскольку различные биоконъюгаты находят широчайшее применение в качестве инструментов исследования в молекулярной биологии, для массовой медицинской диагностики, а также в качестве лекарств. Методы биоконъюгации постоянно совершенствуются [69], но набор используемых реакций небольшой, поскольку на них накладываются существенные ограничения: они должны, как правило, протекать в водной среде при комнатной температуре с очень высоким выходом и не затрагивать различные функциональные группы биомолекул и биополимеров. CuAAC идеально удовлетворяет этим требованиям, поскольку азиды и алкины инертны по отношению к подавляющему числу функциональных групп как биомолекул, так и реагентов, используемых в других методах биоконъюгации. Перспективность реакции CuAAC для биоконъюгации была осознана очень быстро и эффектно продемонстрирована на примере модификации поверхности вириона флуоресцентным красителем [13].

Ковалентные конъюгаты НК и олигонуклеотидов, особенно с флуоресцентными красителями, белками и твердофазными подложками, представляют огромный интерес для биотехнологии, диагностики и медицины. Использование CuAAC явилось мощным стимулом для возникновения новых идей в химии НК. К сожалению, развитие этого направления на некоторое время задержалось, поскольку соединения меди(I) в присутствии кислорода вызывают эффективное расщепление нуклеотидных последовательностей. Однако, после введения в

обиход хелатирующих лигандов для Cu(I) и ряда других методических усовершенствований, реакция стала популярна и для синтеза олиго- и полинуклеотидных конъюгатов. CuAAC позволяет использовать только те функциональные группы, которые введены в заданные положения и не затрагивают остальную часть биомолекулы. Ортогональность CuAAC по отношению к подавляющему большинству других методов биоконъюгации расширяет возможности исследователя при синтезе сложных конъюгатов. В настоящее время число оригинальных работ нарастает экспоненциально, а недавно опубликованные мини-обзоры по постсинтетической модификации ДНК с помощью CuAAC [70] и применению CuAAC в химии нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов [71] достаточно хорошо отражают прогресс в этой области.

В настоящем обзоре мы хотим подробнее рассмотреть развитие и перспективы применения CuAAC для модификации НК или получения аналогов НК. Не будет учитываться применение CuAAC для синтеза модифицированных нуклеозидов, за исключением тех случаев, когда такие модифицированные нуклеозиды затем встраиваются в олигодезоксирибонуклеотиды или каким-либо образом используются для синтеза олигомеров или нуклеозидных кластеров.

Впервые реакция циклоприсоединения азидов и алкинов была применена для синтеза олигонуклео-

тидного конъюгата в некатализируемом варианте. Seo и соавт. [72] проводили реакцию в растворе между 5'-азидомеченным олигонуклеотидом (19) и ацетиленовым производным карбоксифлуоресцеина (20) (соотношение 1 : 150) при 80°C в водной среде в течение 72 ч, при этом с выходом 91% был выделен меченый олигонуклеотид (21), предположительно в виде смеси 1,4- и 1,5-дизамещенных триазолов (схема 4). Конъюгат (21) использовался в качестве праймера для автоматизированного флуоресцентного секвенирования ДНК [72].

Те же авторы изучали модификацию олигонуклеотида (19) в воде активированными ацетиленовыми производными — диэтиловым эфиром ацетилендикарбоновой кислоты (22) и этилпропиолатом (24). В этом случае через 48 ч реакции при комнатной температуре получены продукты модификации (23) и (25), соответственно (схема 4). Было также обнаружено, что при проведении реакции с ацетиленом (24) в смеси вода—ацетонитрил 4 : 1 в присутствии 300 экв. CuI и 300 экв. DIEA реакция немного ускоряется, но выход конъюгата (25) за 24 ч составил лишь 60% [73]. В дальнейшем [3 + 2]-циклоприсоединение азидов и алкинов для получения производных НК использовалось исключительно в медькатализируемом варианте (CuAAC) для терминальных алкинов и лишь совсем недавно в некатализируемой реакции были применены напряженные циклические алкины (см. раздел 7).

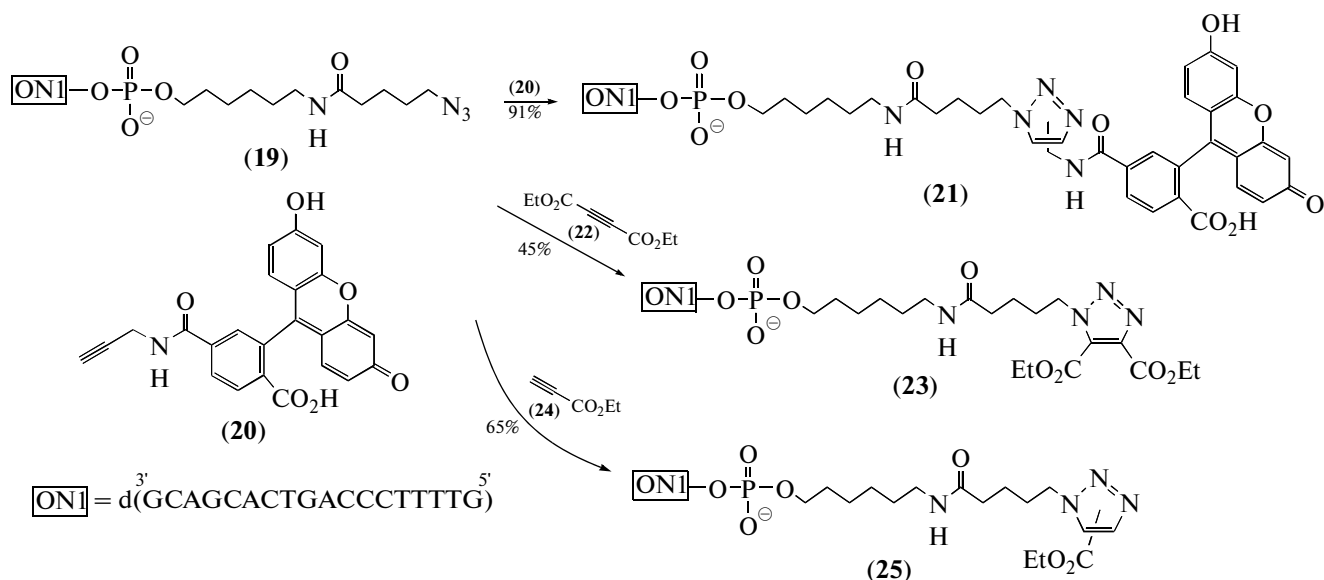


Схема 4. Модификация азидо-олигонуклеотида производным флуоресцеина [72] и эфирами ацетиленкарбоновых кислот [73] в отсутствие медного катализа.

Итак, для проведения реакции модификации необходимо введение в ДНК или олигонуклеотид

азидогруппы или терминального ацетилена, что может быть осуществлено различными способами.

## 2. ВВЕДЕНИЕ АЗИДОГРУППЫ В ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И ДНК

### 2.1. Введение азидогрупп в синтетические олигонуклеотиды в процессе автоматизированного твердофазного синтеза

Поскольку азиды вступают в реакцию с содержащими трехвалентный фосфор фосфитамидами (реакция Штаудингера) [74, 75], введение их в олигонуклеотиды в процессе стандартного автоматизированного фосфоритного триэфирного синтеза с

помощью модифицирующих фосфитамидных реагентов невозможно. Примером одновременного присутствия в молекуле амидитной и азидофункций является нестабильное соединение (26), которое использовали без выделения в синтезе динуклеозидных производных (27), содержащих остаток 3'-AZT (схема 5) [76]. Описан также синтез с малым выходом амидофосфита (28), но попытка его конденсации с 5'-концевым гидроксилком растущей цепи в синтезаторе оказалась безуспешной [77].

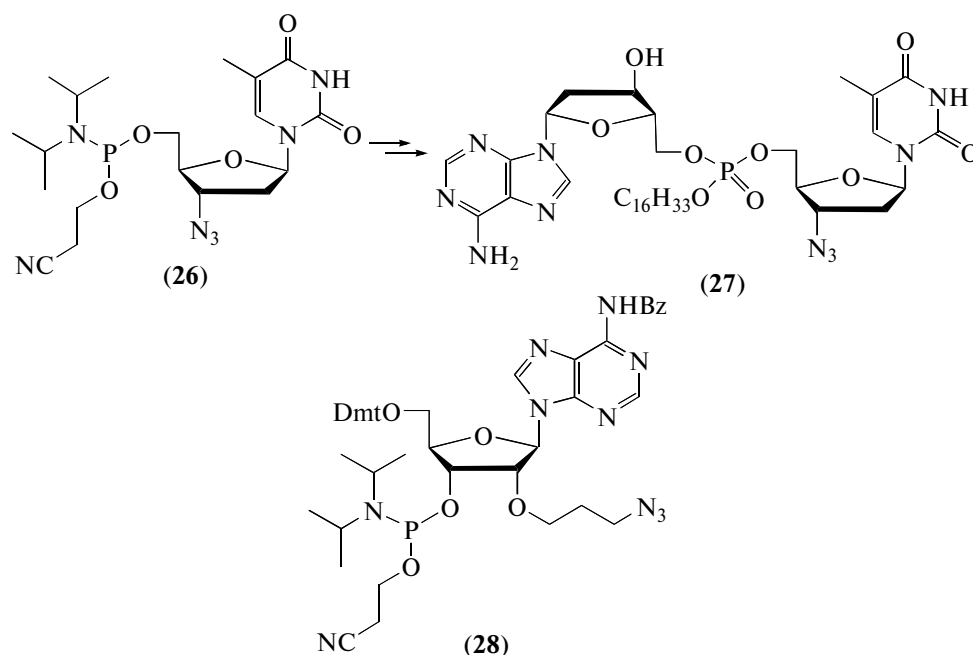


Схема 5. Применение амидофосфоритной группы в синтезе липофильных производных AZT [76].

Однако в случае использования фосфотриэфирного метода (пятивалентный фосфор) введение азидов в олигонуклеотид возможно. Первыми это осуществили Полушин и соавт. [78]. С использова-

нием нуклеотидного блока (29) твердофазным синтезом был получен и охарактеризован олигомер (30), содержащий пять 2'-азидо-2'-деоксиуридинов подряд (схема 6).

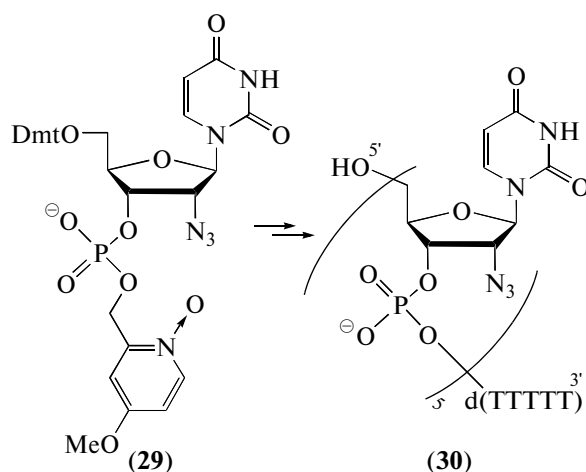


Схема 6. Фосфотриэфирный синтез олигонуклеотида с несколькими азидогруппами [78].

Для синтеза олигонуклеотида (**32**), содержащего остаток 3'-дезоксидезокси-3'-азидотимидина, использовали фосфотриэфирный блок (**31**) [79]. Сначала получали олигонуклеотид: синтез начинали с пропан-

диольного носителя и наращивание цепи вели "обращенными" амидитами в направлении 5' → 3'. Затем проводили фосфотриэфирную конденсацию с реагентом (**31**) и деблокирование (схема 7).

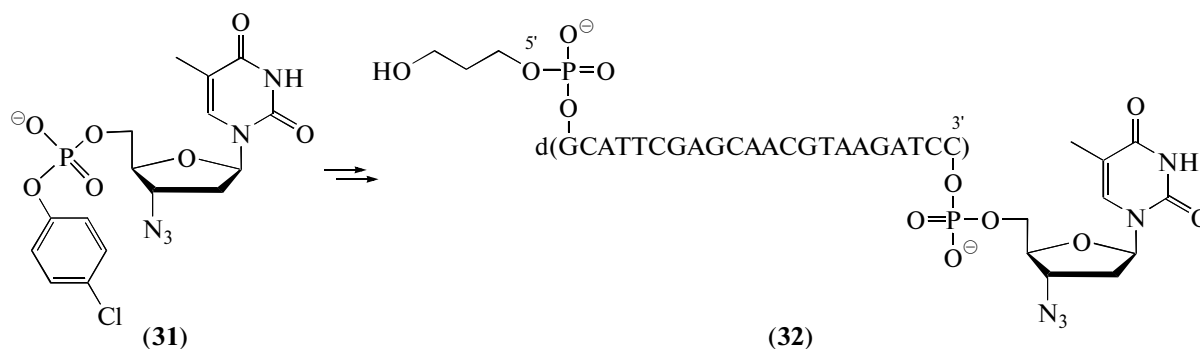


Схема 7. Фосфотриэфирный синтез олигонуклеотида с 3'-терминальным 3'-AZT [79].

Недавно Ефимов и сотр. разработали метод синтеза олигорибонуклеотидов с использованием 2'-азидометильной защитной группы в мономерных блоках (**33а–ж**) (схема 8) [80–82]. После окончания синтеза и двухстадийного деблокирования получа-

ли вполне стабильные 2'-*O*-азидометилрибонуклеотиды, например олигомер (**34**), а затем проводили удаление азидометильной защитной группы обработкой трифенилфосфином с последующим гидролизом.

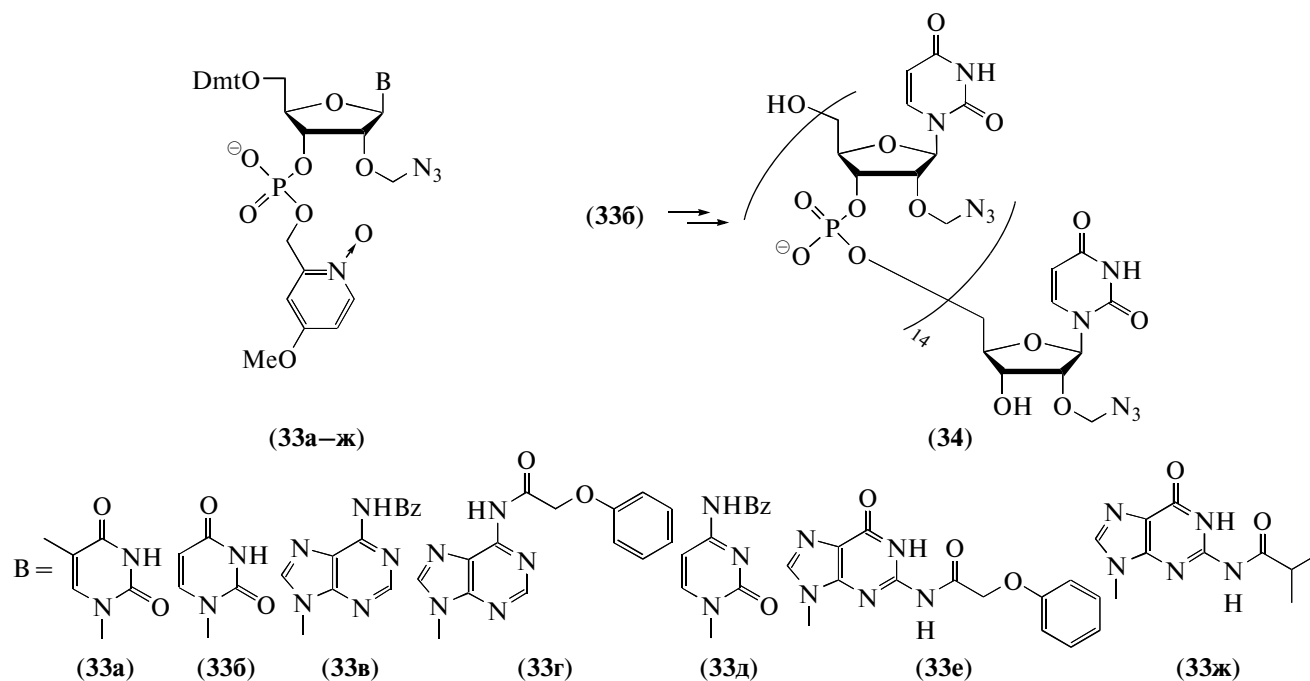


Схема 8. 2'-*O*-азидометильные производные олигорибонуклеотидов – интермедиаты в новом методе синтеза РНК [81, 82].

В Н-фосфонатном методе олигонуклеотидного синтеза мономерные блоки также содержат пятивалентный фосфор, который совместим с азидами, что позволяет синтезировать азидосодержащие олигомеры. Например, были получены “обращенные” Н-фосфонатные мономеры, которые использовали для наращивания олигонуклеотидной цепи

в направлении 5' → 3', а на последней стадии проводили конденсацию олигомера с фосфонатом (35) и после деблокирования выделяли целевой 3'-азидоолигонуклеотид (36) (схема 9) [83]. Нарастиванием 3'-AZT по 5'-гидроксилу Н-фосфонатными мономерами в растворе получали тринуклеотиды с азидогруппой в 3'-положении [84].

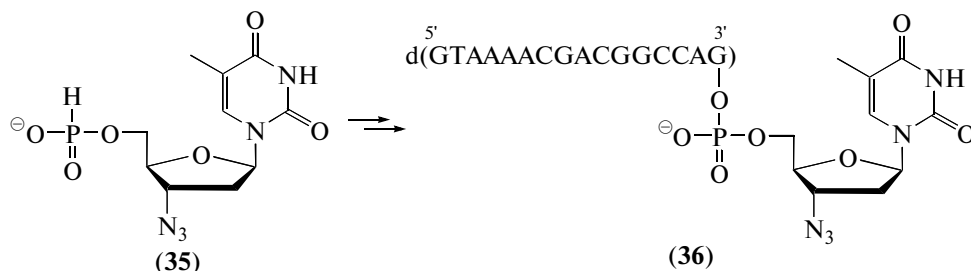


Схема 9. Н-Фосфонатный синтез олигонуклеотида с 3'-терминальным 3'-AZT [83].

Вводить азидогруппы с помощью Н-фосфонатных реагентов можно в любое положение нуклеотидной цепи. Это продемонстрировали Секине и сотр. [85], использовав фосфонатный

блок (37) в синтезе олигонуклеотида (38) (схема 10). Кивиниеми и соавт. [86] с помощью фосфонатного блока (39) получили олигонуклеотиды (40) и (41) (схема 10).

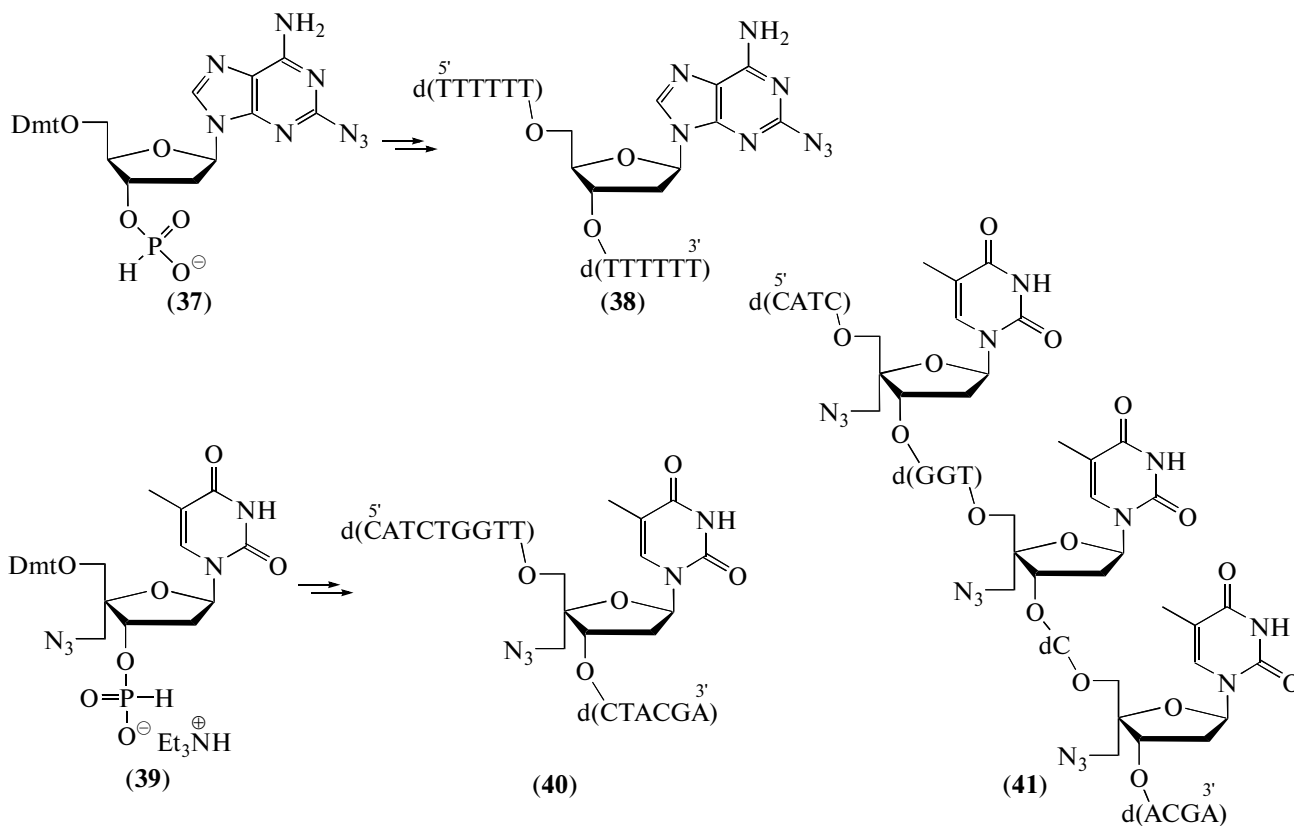
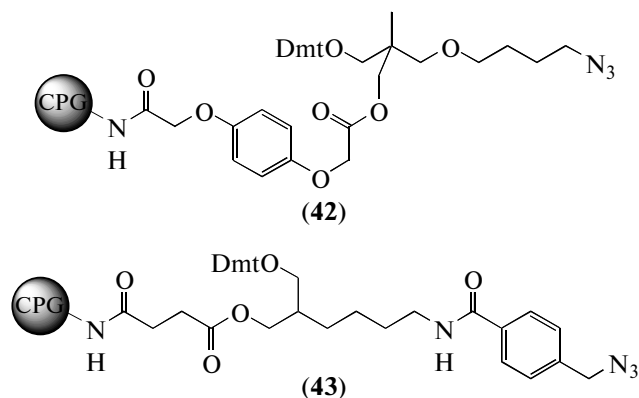


Схема 10. Введение в состав олигонуклеотидов 2-азидо-2'-дезоксиаденозина [85] и 4'-азидометилтимидина [86] с помощью Н-фосфонатных реагентов (межнуклеозидные фосфаты в модифицированных олигомерах не показаны).

Авторы последней работы отмечают, что возможны два варианта олигонуклеотидного синтеза. В первом случае сборка олигонуклеотида осуществляется исключительно Н-фосфонатными производными нуклеозидов. Но возможен и второй вариант, когда наращивание цепи ведется амидитным методом и только модифицированный блок (39) вводится в режиме Н-фосфонатного синтетического цикла; оба варианта дают похожие результаты. Это наблюдение имеет практическую ценность, поскольку в подавляющем большинстве современных синтезаторов используют амидитный метод, а провести одну или несколько Н-фосфонатных конденсаций можно и в ручном режиме. Если азидогруппа при достройке цепи амидитными мономерами, т. е. в присутствии соединений трехвалентного фосфора, сохраняется, то можно предположить, что скорость реакции Штаудингера в этих условиях весьма мала. Это может быть вызвано присутствием избытка активатора межнуклеотидной конденсации.



Действительно, вскоре другие авторы описали использование носителей (42) [87] и (43) [88], на которых проводился синтез 3'-азидомодифицированных олигонуклеотидов стандартным амидофосфитным методом. Олигонуклеотиды, полученные на носителе (42), модифицировали алкином по 5'-концу и затем проводили внутримолекулярную циклизацию.

## 2.2. Введение азидогрупп в синтетические олигонуклеотиды с помощью постмодификации

Поскольку азиды реагируют с амидитами, то до появления работ [86, 87] считалось, что азидогруппа несовместима с условиями синтетического цикла амидитного метода. Но было ясно, что она устойчива в условиях конечного аммиачного деблокирования. Поэтому вслед за последним циклом синтеза можно вводить в олигонуклеотид азиды (на твердой фазе или в растворе), а затем проводить аммонолиз и выделение азидомодифицированного олигомера.

Щепинов и Стеценко разработали эффективный метод синтеза олигонуклеотидов, содержащих 3'-терминальный 3'-AZT, который не требует использования Н-фосфонатов или фосфотриэфиров [89]. Был получен твердофазный носитель (44), на котором через 3'-арилсульфонат присоединен 5'-защитный тимидин. Наращивание цепи происходит стандартными амидитами, а после окончания синтеза носитель обрабатывают DBU, что приводит к отщеплению олигомера (45), содержащего на 3'-конце циклотимидин. Обработка азидом лития сопровождается раскрытием 2,2'-циклотимидина, в результате чего на 3'-конце олигонуклеотида (46) оказывается 3'-AZT (схема 11).

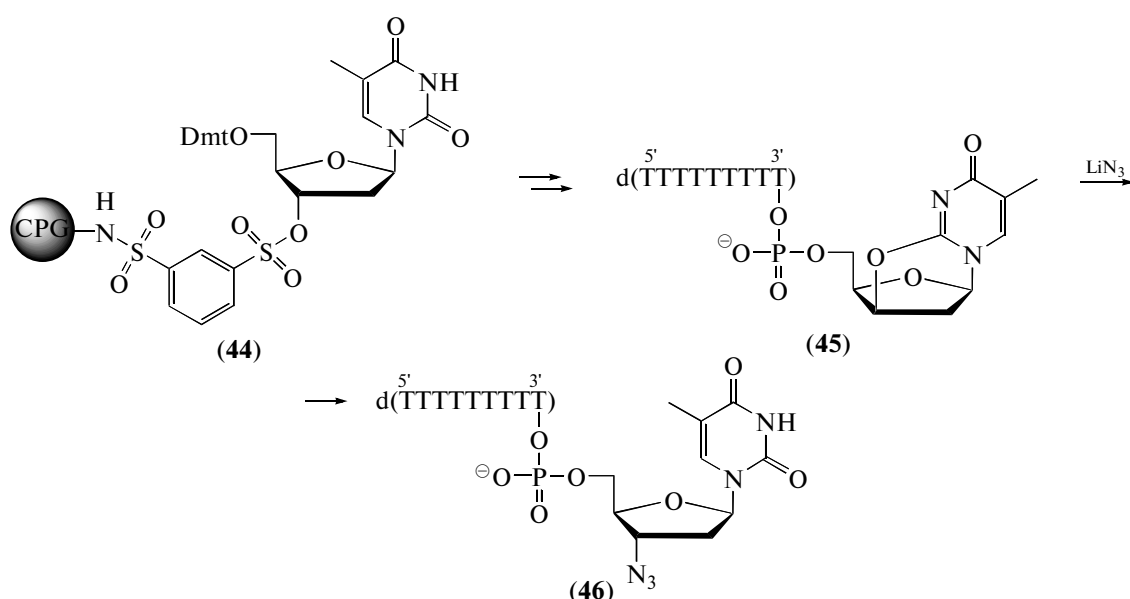


Схема 11. Синтез олигонуклеотида с 3'-терминальным 3'-AZT через ангидротимидин [89].



Для введения азидогруппы по 5'-концу олигомеров ДНК Миллер и Кул использовали нуклеофильное замещение йодида на азид [90]. После окончания олигонуклеотидного синтеза 5'-терминальная гидроксильная группа на твердой фазе в защищенном олигонуклеотиде (**47**) превращалась в 5'-йодид обработкой  $(\text{PhO})_3\text{PCl}$  [91]; этот метод удобнее и универсальнее, чем описанный ранее способ введения 5'-йод-5'-дезокситимидина в 5'-терминальное положение олигонуклеотида с помощью амидофосфитного реагента [92], поскольку в качестве 5'-

терминального может выступать любой нуклеозид. Затем йодид на носителе обрабатывали  $\text{NaN}_3$  в DMF для превращения в азид (**48**) и проводили стандартное аммиачное деблокирование, получая азидоолигонуклеотиды (**49а–г**). Выходы на стадии йодид  $\rightarrow$  азид воспроизводимо зависят от природы 5'-терминального нуклеозида: для dT выход наибольший, а для dA – наименьший (схема 12). Этот же метод впоследствии с успехом использовали другие авторы [93].

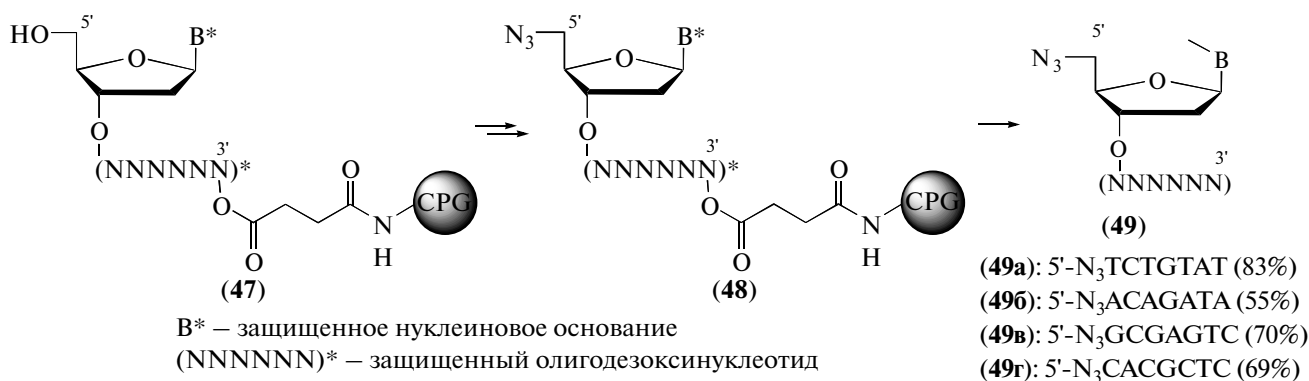
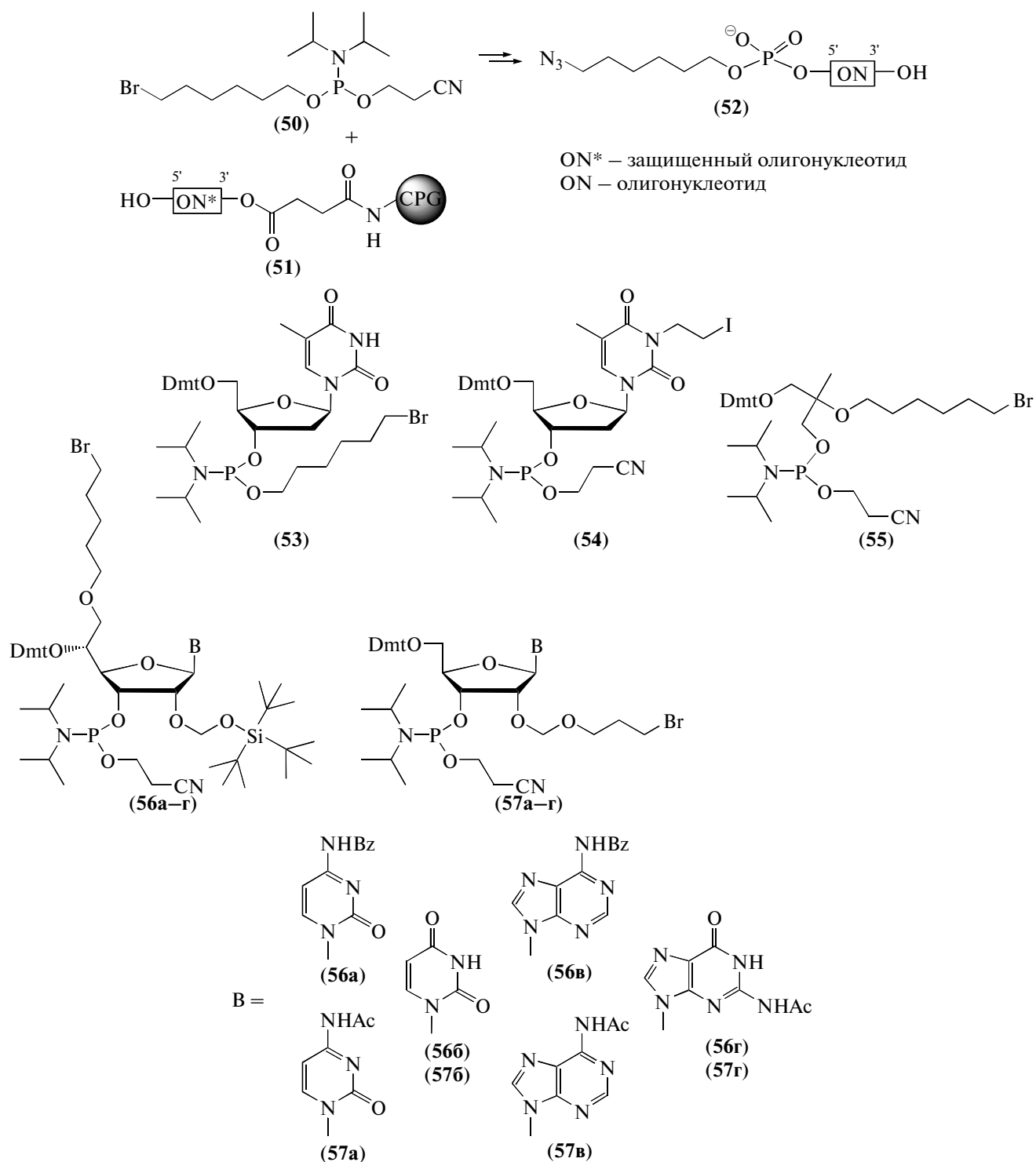


Схема 12. Постсинтетическая замена 5'-гидроксила в олигонуклеотидах на азид [90] (межнуклеозидные фосфаты не показаны).

Конденсация амидофосфита (**50**) с защищенным олигонуклеотидом (**51**) на твердой фазе с последующим нуклеофильным замещением брома на азид и аммиачным деблокированием дает 5'-азидоалкилолигомеры (**52**) [93–95] (схема 13). В работе [93] аммонолиз для деблокирования проводили при комнатной температуре, но, по-видимому, это не обязательно, и можно использовать стандартную для аммонолиза температуру 55–60°C. Кроме упоминавшегося выше амидитного реагента из 5'-йод-5'-дезокситимидина [92] описан ряд реагентов на основе алкилгалогенидов. Для модификации олигонуклеотидов азидоалкильными группами по фосфату предложен амидофосфит (**53**) [95], а для введения алифатической азидогруппы по гетероциклическо-

му основанию – реагент (**54**) [96]. Модифицирующий ненуклеозидный реагент (**55**) позволяет осуществлять введение нескольких азидогрупп [97, 98]. Во всех случаях обмен галогена на азид осуществляется на твердой фазе с последующим аммиачным деблокированием. Ранее для модификации олигонуклеотидов различными нуклеофилами были описаны наборы реагентов (**56а–г**) [99, 100] и (**57а–г**) [100], в которых бромалкильный остаток присоединен к сахарной части нуклеозида. Очевидно, что эти реагенты пригодны и для введения азидогрупп с помощью постсинтетической обработки модифицированных олигонуклеотидов азидами щелочных металлов.



**Схема 13.** Постсинтетическая модификация олигонуклеотидов 5'-азидоалкильной группой [93–95] и другие реагенты для введения галогеналкильной группы в олигонуклеотиды [95–100].

Азидогруппу на твердой фазе можно вводить в олигонуклеотиды и другим способом — после окончания сборки олигонуклеотида (**51**) проводят конденсацию с амиолинком (реагентом для введения аминогруппы) и затем удаляют защиту с аминогруппы.

Полученный амин (**58**) обрабатывают азидоуксусной кислотой в присутствии конденсирующего реагента [77] или азидоуксусным ангидридом [101] и после аммиачного деблокирования образуются 5'-азидоалкилолигонуклеотиды (**59**) (схема 14).

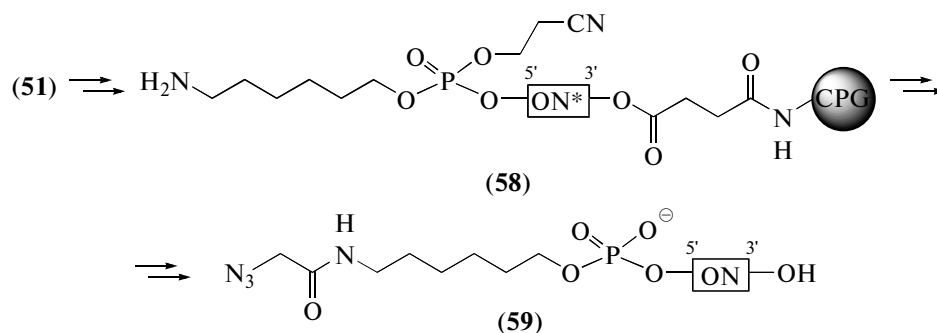


Схема 14. Постсинтетическая азидомодификация 5'-аминоалкильных производных олигонуклеотидов ацилированием [77, 101].

Еще один метод введения азидоалкильной группы состоит в ее присоединении через карбаматный линкер, устойчивый в условиях аммонолиза [102]. Свободную 5'-гидроксильную группу в защищенном олигонуклеотиде на носителе (**51**) активирова-

ли 1,1-карбонилдиимидазолом. Полученный имидазолид (**60**) обрабатывали 3-азидопропиламином, затем проводили аммиачное деблокирование и получали азидомодифицированный олигонуклеотид (**61**) (схема 15).

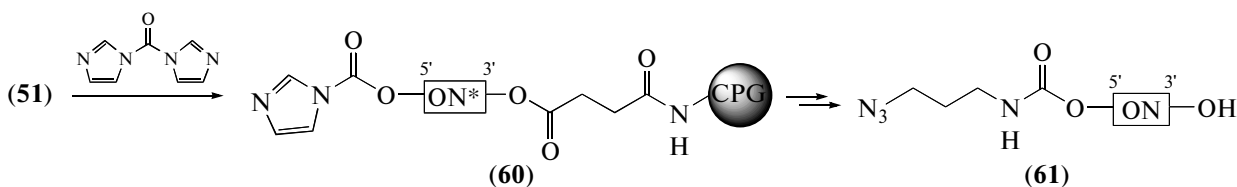
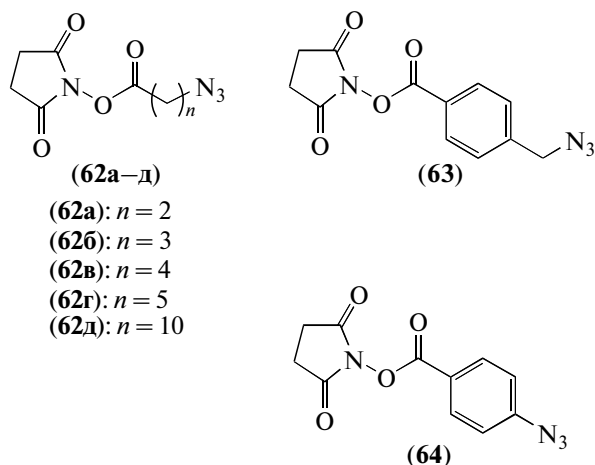


Схема 15. Постсинтетическое введение в олигонуклеотиды 5'-азидоалкильной группы с помощью карбаматного линкера [102].

Однако самым распространенным методом получения азидопроизводных олигонуклеотидов является ацилирование аминоалкилпроизводных олигонуклеотидов активированными эфирами  $\omega$ -азидоалкилкарбоновых кислот с различной длиной цепи: (**62a**) [103], (**62b**) [104–

112], (**62в**) [72, 73, 113–116], (**62г**) [93, 109, 117–120], (**62д**) [121] и (**63**) [88]. Как правило, реакцию проводят в водном растворе в интервале pH 8.0–9.5, но можно проводить ацилирование и на твердой фазе [93] с последующим деблокированием.



Ароматические азидогруппы для последующей функционализации CuAAC вводили в олигонуклеотиды с помощью активированного эфира (64) [122, 123]. Ароматические азиды вступают в реакцию циклоприсоединения так же, как и алифатические, но менее удобны из-за их фоточувствительности. Основное применение арилизидов на олигонуклеотидах – фотоаффинное мечение комплементарных последовательностей и ДНК-связывающих белков.

Ароматические азиды являются фотоактивируемыми сшивающими реагентами, поэтому ими часто модифицируют НК. При облучении УФ-светом арилизиды разлагаются с образованием высокоактивного нитрена, способного реагировать с соседними частями молекулы. С помощью олигонуклеотида арилизид можно адресно доставить в определенный участок одно- или двухцепочечной

ДНК-мишени и затем УФ-облучением индуцировать сшивку. Если метить арилизидом ДНК, связывающуюся с белками или ферментами, то после УФ-облучения получатся ковалентные сшивки ДНК–белок, локализация которых может дать информацию о структурных предпосылках ДНК-белкового взаимодействия или о строении активного центра фермента.

Имеются многочисленные примеры получения арилизидных производных ДНК и РНК ацилированием их соответствующих аминокислотных производных различными активированными эфирами фотоактивируемых меток, например, работы [124–136]. Азидобензойное производное глицингидазида использовалось для 3'-модификации тРНК, окисленной перйодатом [137]. Еще один распространенный метод включает синтез производного алифатического амина, несущего арилизид, и его последующее присоединение к олигонуклеотиду по активированному терминальному фосфату (см., например, [138–142]). Разумеется, все эти арилизидные модификации потенциально пригодны для дальнейшей функционализации с помощью циклоприсоединения к ацетиленам.

Заслуживает упоминания интересный метод введения 8-азидо-2'-дезоксаденозина в ДНК, когда постсинтетическую модификацию проводят прямо на незащищенном олигонуклеотиде (схема 16). Сначала синтезируют фрагмент ДНК (65), содержащий 8-бром-2'-дезоксаденозин в заданном положении, а затем при нагревании в водно-органическом растворе с азидом триэтиламмония получают целевое азидопроизводное (66) [143].

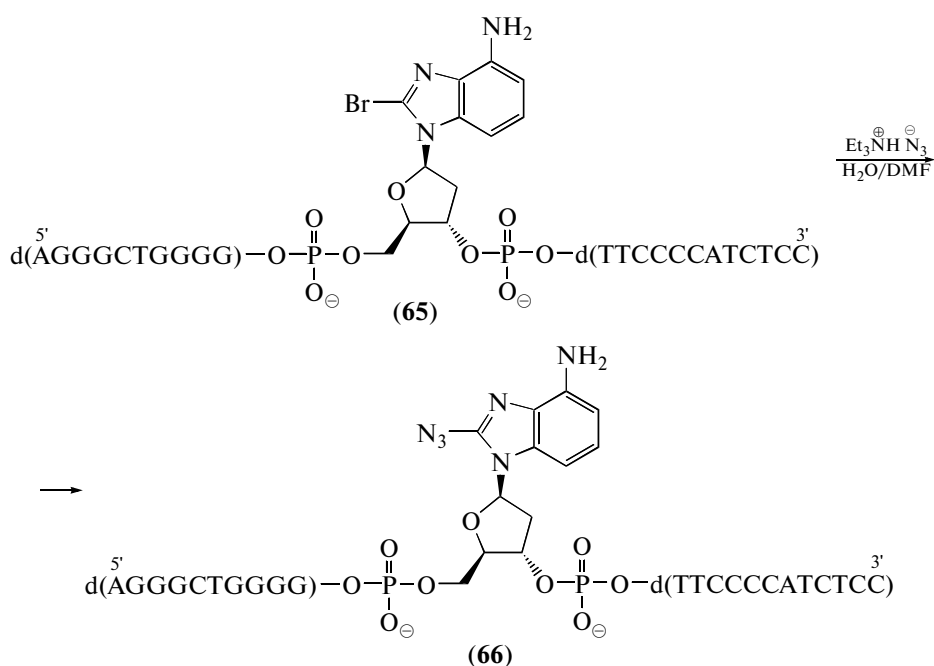
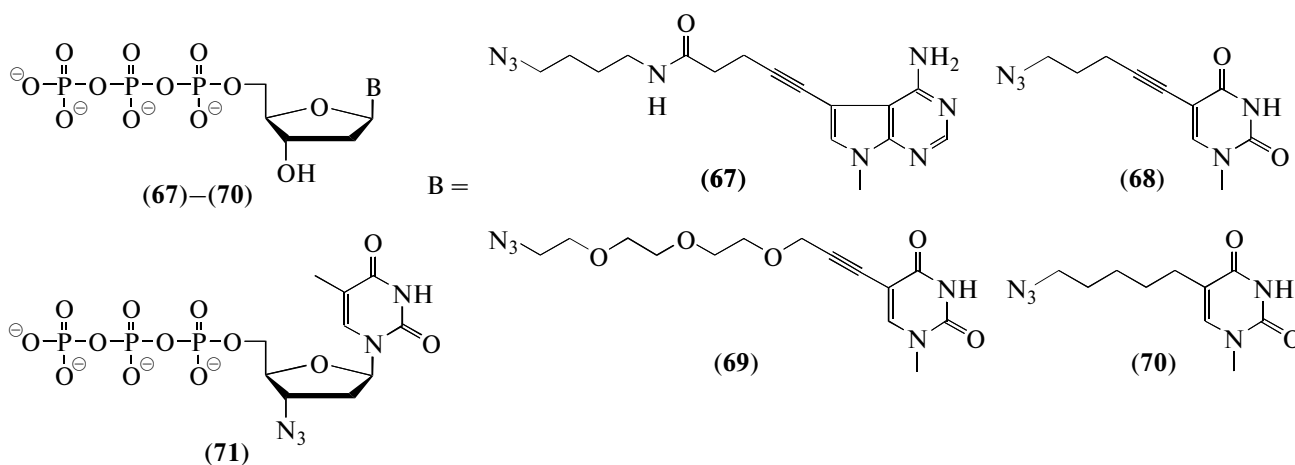


Схема 16. Получение 8-азидо-2'-дезоксаденозина в олигонуклеотиде из 8-бром-2'-дезоксаденозина [143].

### 2.3. Введение азидогрупп в ДНК с помощью ферментов

На сегодняшний день в литературе имеется лишь несколько примеров модификации НК алифатическими азидами с помощью ферментативных реакций. Прежде всего речь идет о встраивании модифицированных нуклеозид-5'-трифосфатов в ДНК с помощью полимераз. Были получены азидосодержащие трифосфаты (67) [144, 145], (68), (69) [145, 146] и (70) [147]. Оказалось, что для встраивания трех первых нуклеозидов в процессе репликации ДНК-матрицы лучше всего подходит ДНК-полимераза из *Pyrococcus woesei* (*Pwo*), которая эффек-

тивно и точно включает в синтезируемую цепь ДНК как пуриновый, так и оба пиримидиновых модифицированных трифосфата. Азидоалкильный трифосфат (70) не является субстратом какой-либо полимеразы. Это совсем не удивительно, поскольку давно установлено, что для узнавания полимеразой модифицированные нуклеозидтрифосфаты должны содержать линкер в 5-положении пиримидинов или в 7-положении 7-дезазапуринов, но в месте присоединения к основанию линкер должен быть жестким, т.е. содержать двойную или тройную связь [148, 149].

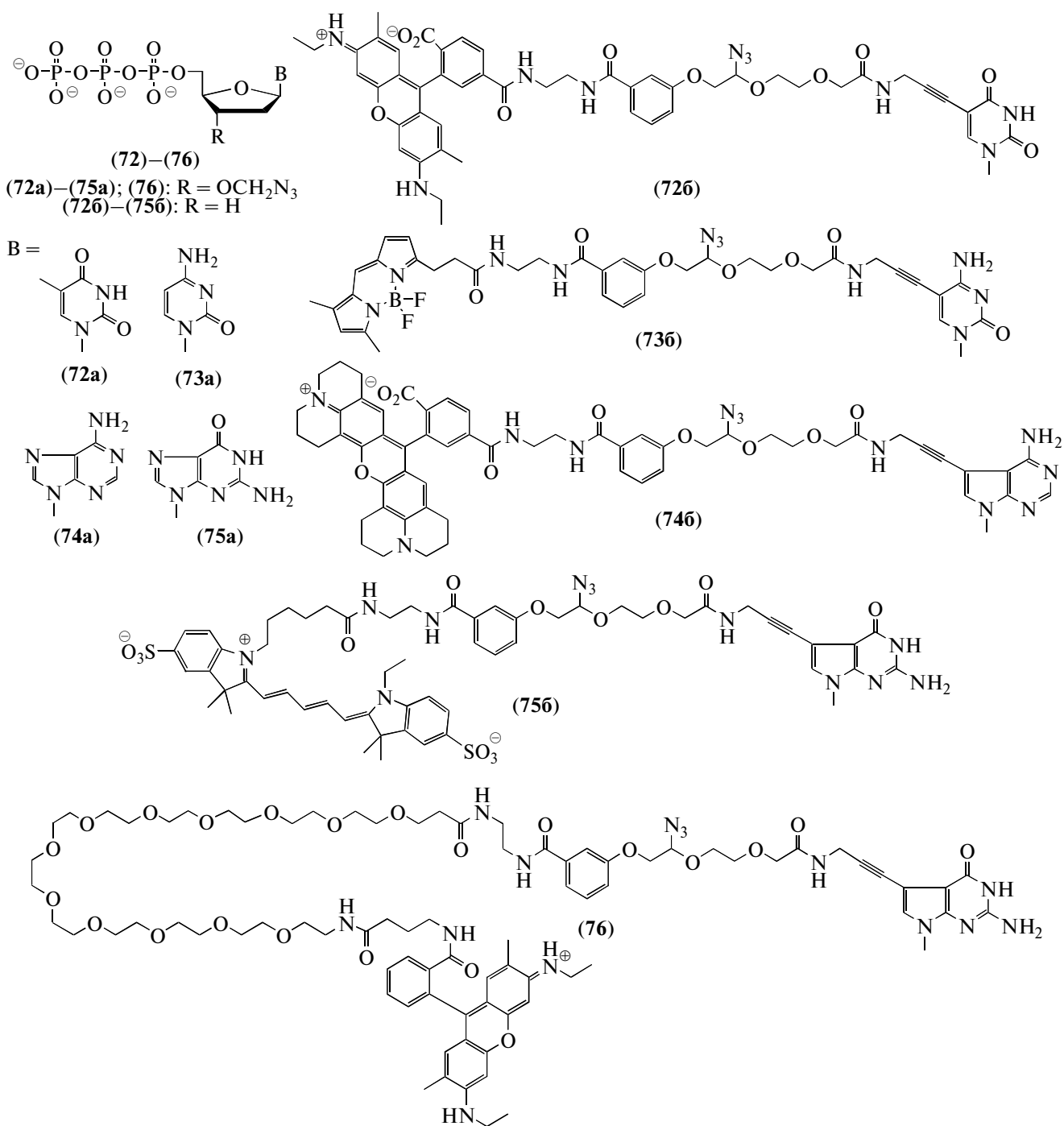


Трифосфат 3'-AZT (71) был использован для встраивания в ДНК с помощью терминальной нуклеотидилтрансферазы [150].

Компактная азидометильная защитная группа для 3'-гидроксила нуклеозидов [151, 152] недавно нашла интересное применение в новом методе секвенирования ДНК (один из вариантов “секвенирования в процессе синтеза”) [153]. Был синтезирован набор из четырех трифосфатов (72a)–(75a), которые эффективно встраивались в ДНК с помощью 9°N A485L/Y409V ДНК-полимеразы. При встраивании одной молекулы трифосфата наступает терминация синтеза, поскольку 3'-гидроксил растущей цепи блокирован азидометильной группой. Если удалить защитную группу с помощью ТСЕР, то затем можно провести встраивание следующего трифосфата защищенного нуклеозида и т.д. При секвенировании вместе с “обратимыми” терминаторами (72a)–(75a) в реакционной смеси присутствуют флуоресцентные терминаторы (72b)–(75b) на основе 2',3'-дидезоксинуклеозидов, в которых краситель присоединен к нуклеозиду с помощью азидосодержащего линкера, способного расщепляться под действием ТСЕР. В результате на каждом шаге секвенирования происходит достройка на один нуклеотид с частичным включением в ДНК флуорес-

центного терминатора, эмиссия которого автоматически регистрируется. Обработка ТСЕР приводит к отщеплению красителя и деблокированию 3'-гидроксилов, после чего цикл повторяется [153]. Следует отметить, что включение в растущую цепь как “обратимых” терминаторов (72a)–(75a), так и “необратимых” терминаторов (72b)–(75b) представляет собой ферментативное введение алифатической азидогруппы в ДНК. Очевидным недостатком такого метода секвенирования является уменьшение числа гидроксильных групп с каждым шагом в результате присоединения “необратимых” флуоресцентных терминаторов (72b)–(75b).

Этот недостаток был преодолен очень быстро. Через несколько месяцев после публикации работы [153] появилась статья Бентли, Баласубрамания и соавт. [154], в которой сообщалось о секвенировании генома индивидуального человека похожим методом. В этом исследовании в качестве терминаторов применялись меченные флуоресцентными красителями по основанию нуклеозид-5'-трифосфаты, 3'-гидроксил которых блокирован азидометильной группой. Таким образом, эти терминаторы сочетают в себе свойства соединений (72a)–(75a) и (72b)–(75b) – они способны однократно встраиваться в растущую цепь и при этом несут флуорес-



центную метку. При обработке ТСЕР одновременно отщепляется краситель и деблокируется 3'-гидроксил растущей цепи. В результате, теоретическое предельное число молекул ДНК для секвенирования уменьшается до одной (на практике секвенирование проводят на амплифицированных кластерах ДНК). Точная структура флуоресцентных 3'-азидометильных трифосфатов в работе [154] не приводится. Получение структурных блоков для синтеза этих соединений описано в патенте [155], а в патенте [156] со-

общается о синтезе трифосфата (76), в котором флуоресцентный краситель присоединен к остатку 7-дезазагуанина с помощью весьма длинного линкера для уменьшения тушения флуоресценции.

Азиридиновые производные 5'-дезоксаденозина (77) [157] и (78) [157, 158], содержащие алифатический и ароматический азиды, являются кофакторами метилтрансфераз и способны алкилировать дуплексную ДНК, что было изучено на примере ферментов M.TaqI и M.EcoRI. Соединения (77) и

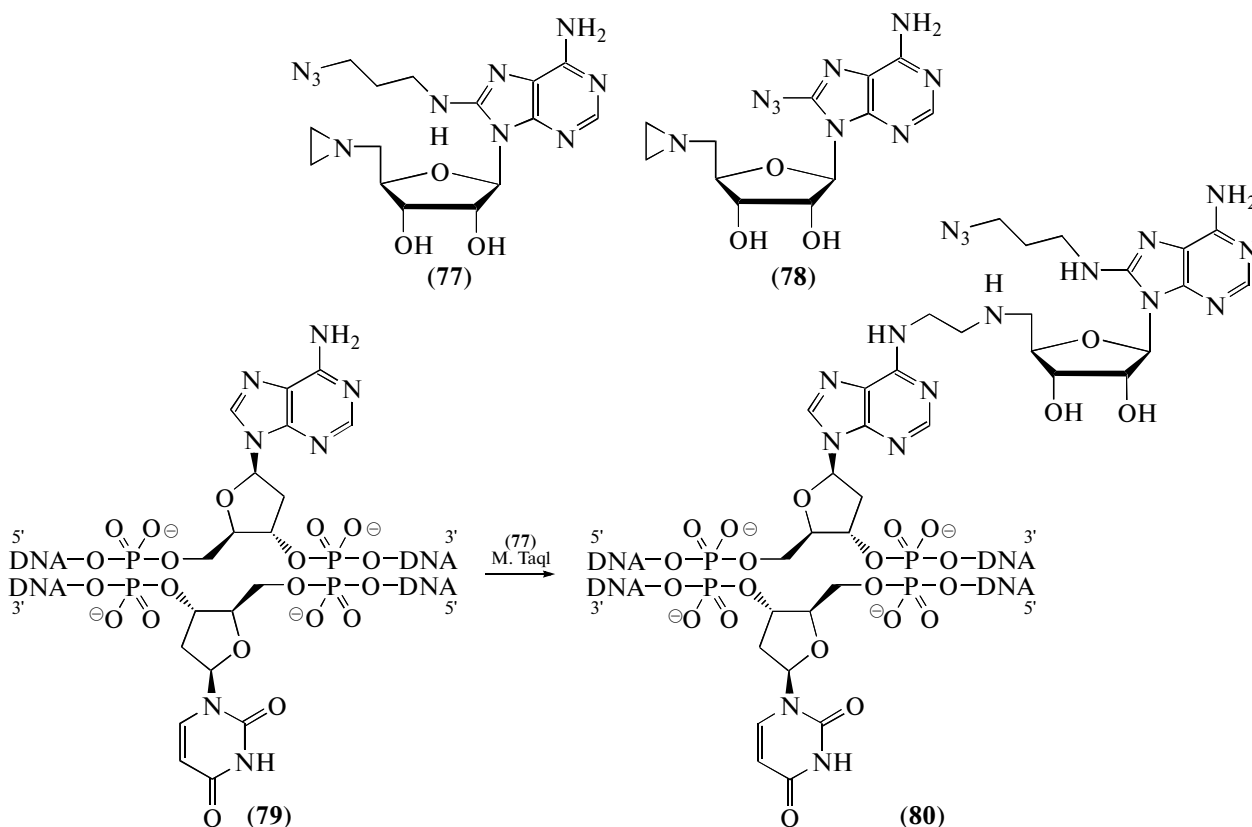


Схема 17. Ферментативное мечение ДНК азидопроизводными аденозина [157, 158].

(78) включаются ферментом *M. TaqI* даже лучше, чем их 8-незамещенный аналог. Химия алкилирования дуплексной ДНК (79) показана на схеме 17 (на примере модификации соединением (77)). Продукт алкилирования (80) содержит азидогруппу, по которой можно проводить дальнейшую модификацию.

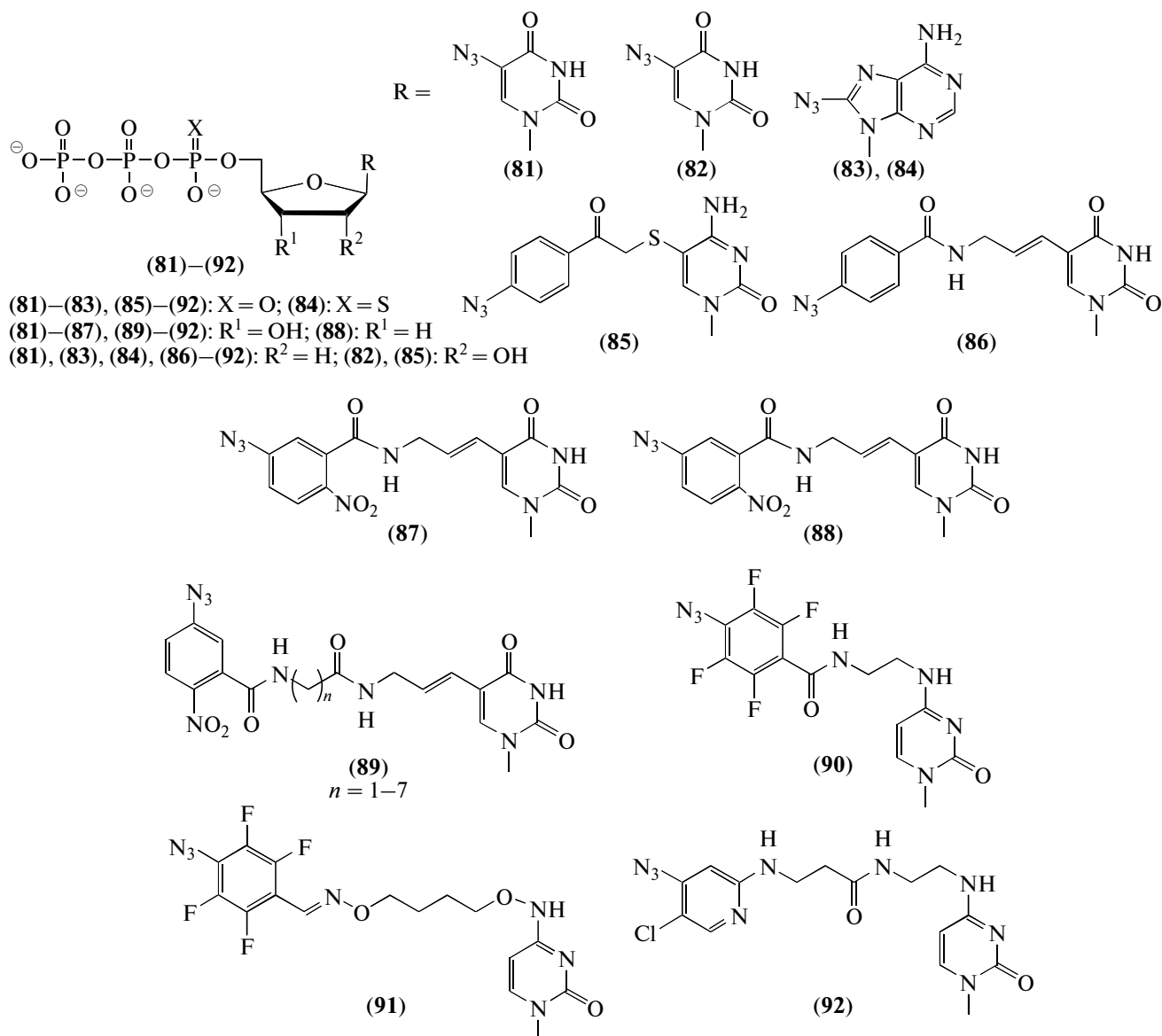
Остальные многочисленные примеры азидов, использованных для введения в НК с помощью ферментативных реакций представляют собой арилизидные трифосфаты, являющиеся субстратами различных ферментов репликации и репарации НК. Такие трифосфаты, несущие фотоаффинные метки, являются инструментами изучения НК-белковых взаимодействий, в первую очередь для НК-полимераз. Азидогруппа может быть введена как непосредственно в нуклеиновое основание, как в трифосфатах (81) [159–161], (82) [162], (83) [163, 164] и его  $\alpha$ -тиоаналоге (84) [165], так и в составе самых разнообразных линкеров — например, трифосфаты (85) [166–168], (86) [169, 170], (87) [171, 172], дидезоксинуклеозидтрифосфат (88) [173], набор трифосфатов с различной длиной линкера (89) [174], трифосфаты из различных  $N^4$ -модифицированных 2'-дезокситидинов (90) [175–177], (91) [178–181], (92) [179–182] и ряд других 5'-нуклеозид-

трифосфатов [171, 174, 180, 183–186]; см. также обзор [187].

### 3. ВВЕДЕНИЕ ТЕРМИНАЛЬНЫХ АЛКИНОВ В ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И ДНК

#### 3.1. Введение алкинов в синтетические олигонуклеотиды в процессе автоматизированного твердофазного синтеза

В отличие от азидогруппы, терминальные алкины в составе нуклеотидов полностью совместимы с синтетическим циклом фосфитного триэфирного метода, поэтому синтез алкинмодифицированных олигонуклеотидов не представляет особой проблемы. Для массового получения алкинмодифицированных олигонуклеотидов удобно сконструировать соответствующий амидофосфитный реагент и затем использовать его в автоматическом синтезаторе. Описан синтез и применение простых нуклеотидных амидофосфитных реагентов (93а) [188], (93б) [87], (93в) [79, 93, 101, 106–108, 119, 189, 190], (93г) [191], (94) [192] и (95) [105–107, 111], позволяющих вводить алкилацетилен в 5'-терминальное положение олигонуклеотидной цепи, а с помощью реагента (96) [193] можно получать олигонуклеоти-



ды, содержащие на 5'-конце сразу три алкинильных группы.

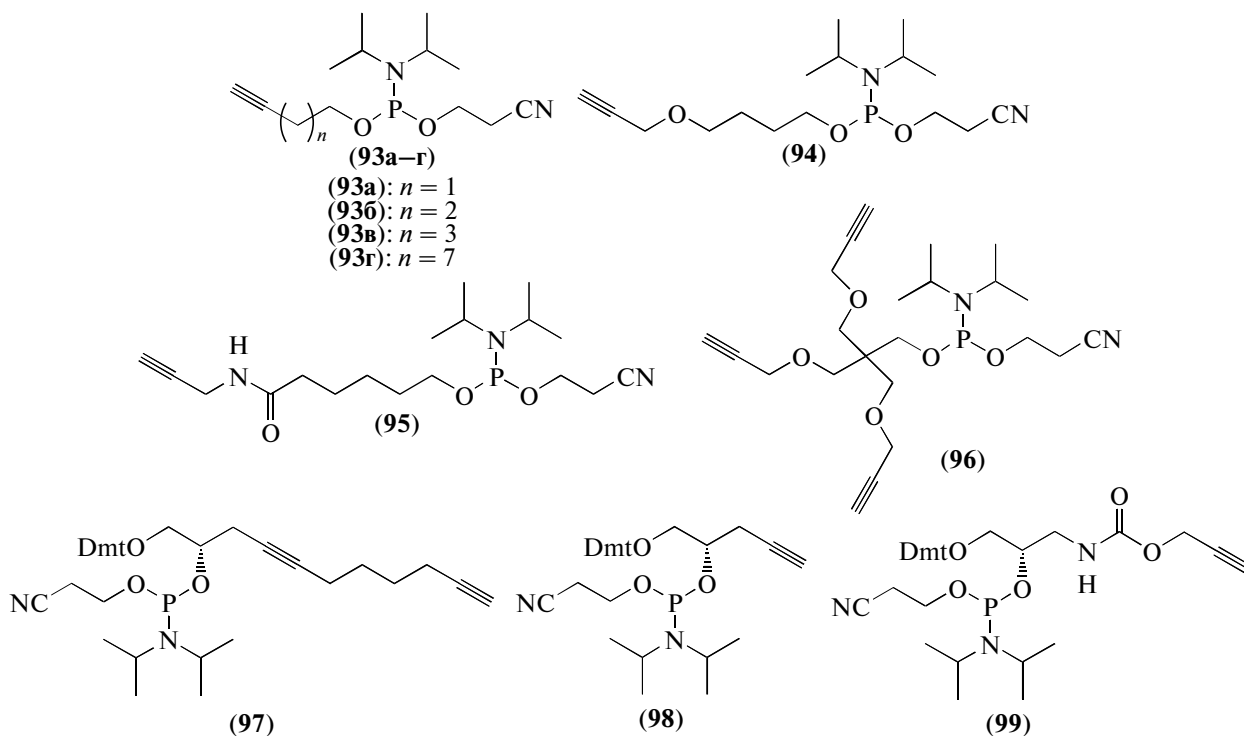
Реагенты (97) [194, 195], (98) [195] и (99) [196] более универсальны, поскольку, в принципе, позволяют встраивать алкиновую модификацию не только в 5'-терминальное положение, но и в середину олигонуклеотида (как псевдонуклеозидное звено). Кроме того, повторные конденсации с реагентами (97)–(99) могут обеспечить введение в один олигонуклеотид нескольких ацетиленовых групп.

Общим недостатком этих реагентов является то, что они построены на 1,2-диолевой псевдосахарной основе. Во-первых, 1,2-диолевая цепочка на один атом короче, чем 1,3-диолевая группа в природных нуклеозидах (НО–С5'–С4'–С3'–ОН), и это может негативно повлиять на гибридизацию олигомера, в котором один из нуклеозидов внутри цепи

заменен псевдонуклеозидом, с комплементарной последовательностью. Во-вторых, при единичном встраивании модификации по 5'-концу (что обычно и требуется), аммиачное деблокирование может приводить к частичному отщеплению модифицирующей группы в результате индуцированного соседним первичным гидроксидом гидролиза фосфодиэфирной связи. Избежать этого можно, проводя аммонолиз без удаления 5'-терминальной диметокситритильной защитной группы. Липофильность Dmt-группы позволяет осуществлять очистку олигонуклеотидов с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. После такой очистки Dmt-группа легко удаляется кислотой.

Реагенты (100) [197, 198], (101) [99, 193, 199] и (102) [193, 200] построены на основе 1,3-диолов и пригодны для введения одной или нескольких алкиновых модификаций в любое место олигонук-





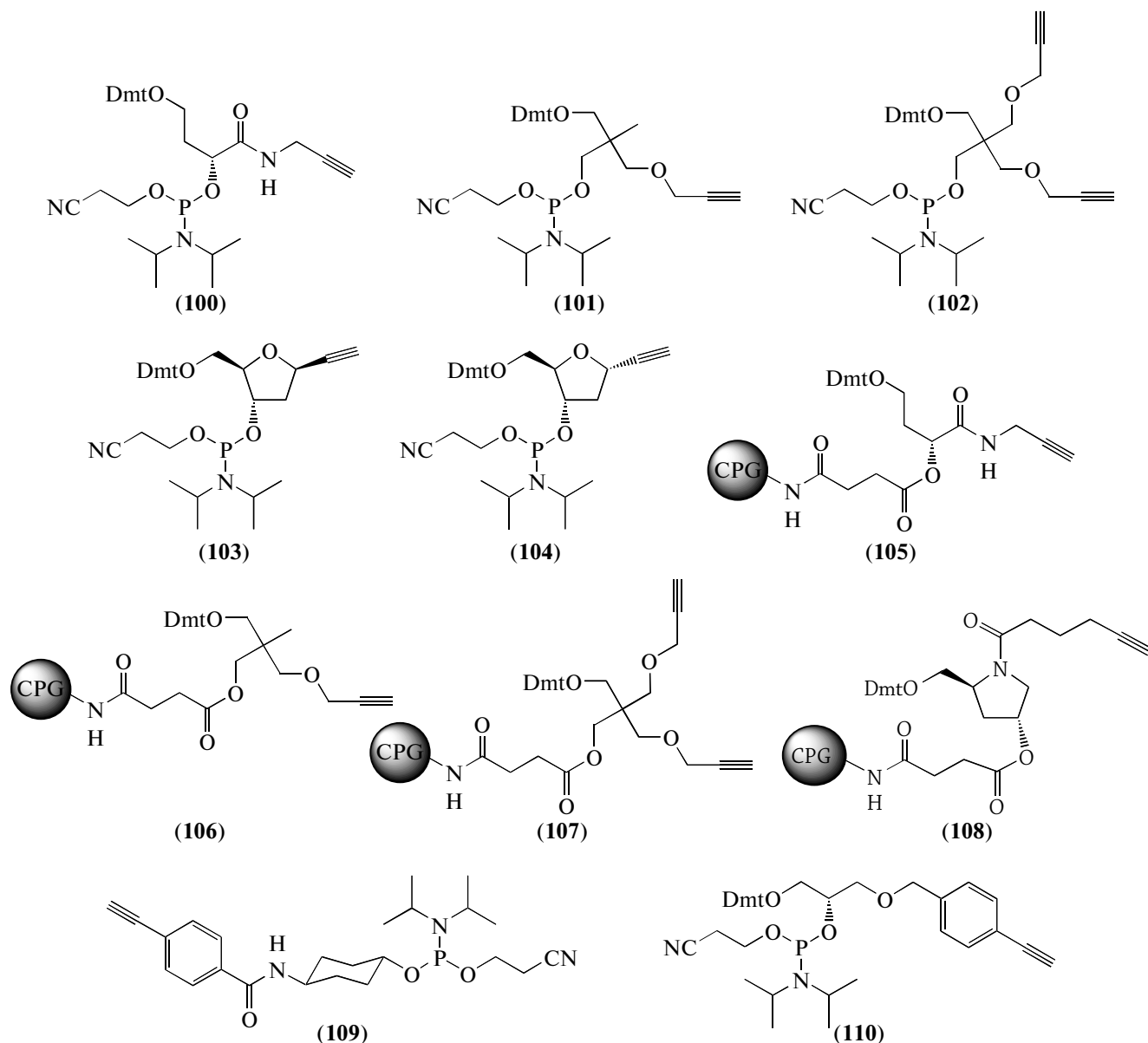
леотида. Реагент (**102**) позволяет вводить два алкиновых остатка за одну стадию конденсации, т. е. после нескольких ( $n$ ) циклов с реагентом (**102**) можно получить олигомер, содержащий  $2n$  алкинов. Оказалось, что, как и в случае реагентов на основе 1,2-диола, при однократной конденсации реагента (**100**) по 5'-концу олигонуклеотидной цепи необходимо проводить аммиачное деблокирование с сохранением 5'-Dmt-защиты во избежание отщепления модифицирующей группы [198]. Однако следует отметить, что для терминальной модификации реагентами на основе 2,4-дигидроксибутирамидов в случае проведения аммонолиза олигомера со свободным 5'-гидроксидом механизм отщепления модифицирующей группы совершенно иной, чем в случае реагентов на основе 1,2-диола – при содействии соседней НО-группы происходит гидролиз не фосфодиэфирной, а амидной связи в самом реагенте [198, 201]. Недостатком реагента (**101**) является то, что на стадии синтеза его предшественника из нехирального триола генерируется смесь энантиомеров. Поэтому в составе хиральных нуклеотидных олигомеров введение одного фрагмента (**101**) приведет к продукту в виде смеси двух диастереомеров, а в случае введения  $n$  модификаций – в виде смеси  $2^n$  диастереомеров.

Недавно описаны амидофосфиты (**103**) и (**104**) [202], структурная основа которых представляет собой фрагмент дезоксирибозы. Эти реагенты позволяют встраивать в олигонуклеотидную цепь энантиомерно чистый ацетиленсодержащий фрагмент и лишены всех недостатков реагентов (**97**)–(**103**).

Для синтеза 3'-модифицированных алкинами олигонуклеотидов можно использовать носители (**105**) [198], (**106**) [95, 99, 193, 199, 203], (**107**) [95, 193, 203] и (**108**) [204]. При работе с носителем (**107**) получаются олигомеры с двумя пропаргильными группами на 3'-конце, а при посадке на носитель (**106**) хирального нуклеозидного производного должна получаться смесь диастереомеров.

Ароматические терминальные ацетилены (этиниларены) так же эффективно способны реагировать с азидами в CuAAC, как и алифатические. Это продемонстрировано на примере олигонуклеотидов с этинилареновой модификацией, которую вводили в 5'-терминальное положение с помощью реагента (**109**) [205]. Для встраивания этиниларенов в среднюю часть олигонуклеотида предложен реагент (**110**) [206, 207].

Синтезировать олигонуклеотиды, содержащие терминальные ацетилены, можно также с помощью реагентов, являющихся производными нуклеотидных амидофосфитов. Описан ряд нуклеозидных фосфамидитов, в которых алкин может быть присоединен по фосфору (реагент (**111**) [95]), сахару и нуклеиновому основанию. Среди замещенных по сахару производных первыми были получены 2'-*O*-пропаргильные нуклеозиды. Сначала была разработана комбинация защитных групп для 2'-*O*-алкилирования гуанозина [208], а затем были получены четыре нуклеозидных фосфамидита (**112a–г**) и использованы в автоматическом синтезаторе для сборки олигомеров [209]. Пивалоилоксиметильная защитная группа для N3 в реагенте (**112a**) не обяза-

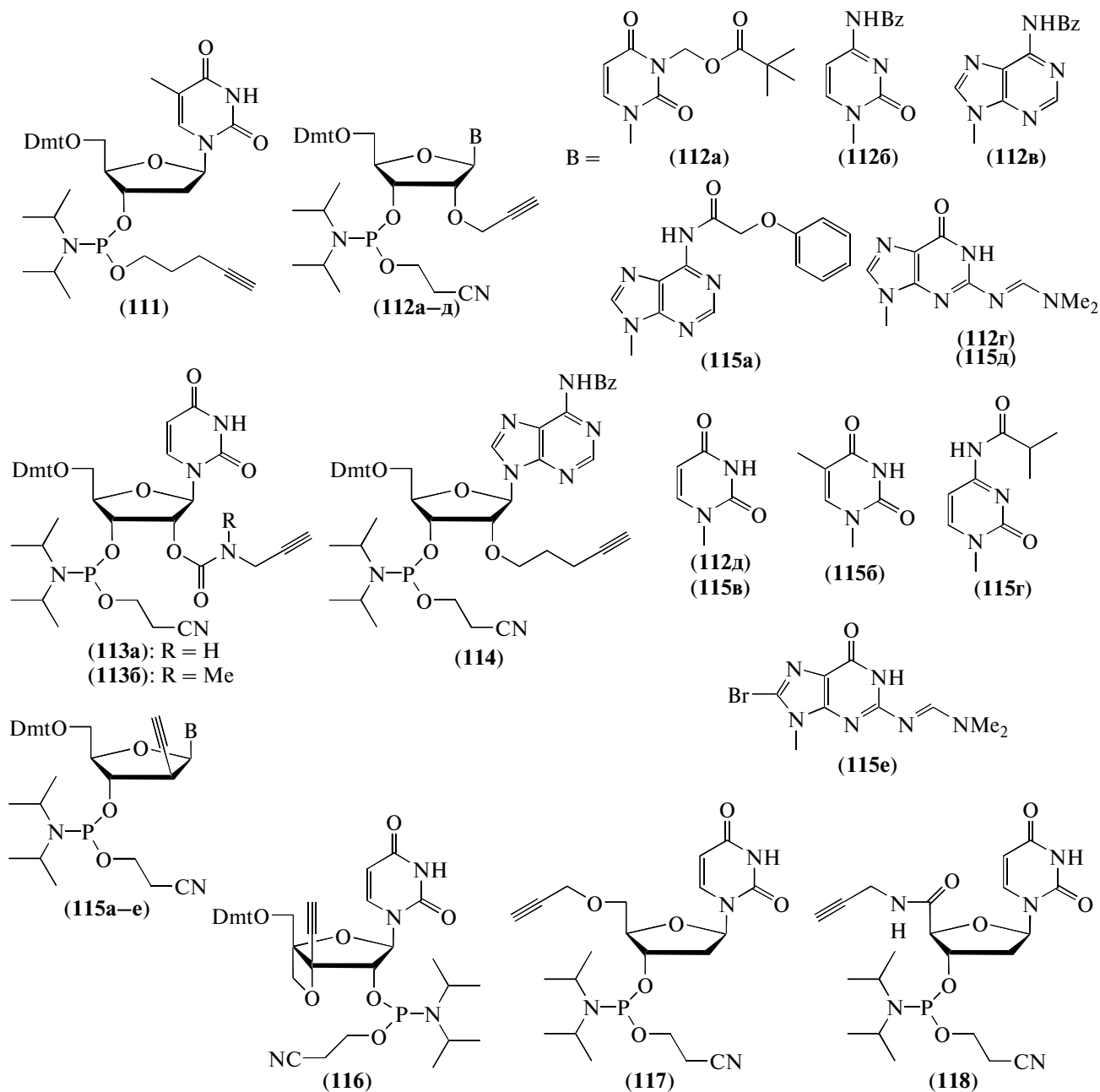


тельна — впоследствии для синтеза модифицированных олигомеров брали незащищенное производное (**112д**) [196]. Легко получаемые 2'-карбаматные производные уридина (**113а,б**) позволяют модифицировать олигонуклеотиды терминальными алкинами, но при гибридизации таких олигомеров наблюдается значительная дестабилизация дуплекса [210, 211]. Наконец, в реагенте (**114**) на основе аденозина ацетиленовая группа отделена от 2'-кислорода трехатомным (как и в карбаматах (**113**)), но более гибким алкильным линкером. Считается, что введение модификации по 2'-*O*-атому позволяет направить лиганд в малую бороздку ДНК-дуплекса.

Синтезирован ряд производных 2'-дезоксинуклеозидов с 2'-этинильным заместителем в *арабино*-конфигурации: (**115а–д**) [212–215] и 8-бромгуанозинное производное (**115е**) [216].

Реагент (**116**) содержит этинил, присоединенный по 3'-*C*-атому, и позволяет синтезировать 5'-2'-олигомеры [217]. Амидофосфиты (**117**) [218] и (**118**) [79] дают возможность получать в синтезаторе олигонуклеотиды, содержащие 5'-терминальную ацетиленовую модификацию.

Еще более разнообразны примеры нуклеозидных реагентов, в которых терминальный ацетилен присоединен к нуклеиновому основанию. Первым был синтезирован амидит из 5-этинил-2'-дезоксидеоксиуридина (**119**) [109, 219–221]. Затем были получены реагенты, в которых этинильная группа связана с основаниями различными линкерами. Особенно удачным оказался линкер на основе 1,7-октадина. Описан синтез и применение амидофосфитных реагентов из 5-октадиинильных производных пиримидиновых нуклеозидов — 2'-дезоксидеоксиуридина (**120**)

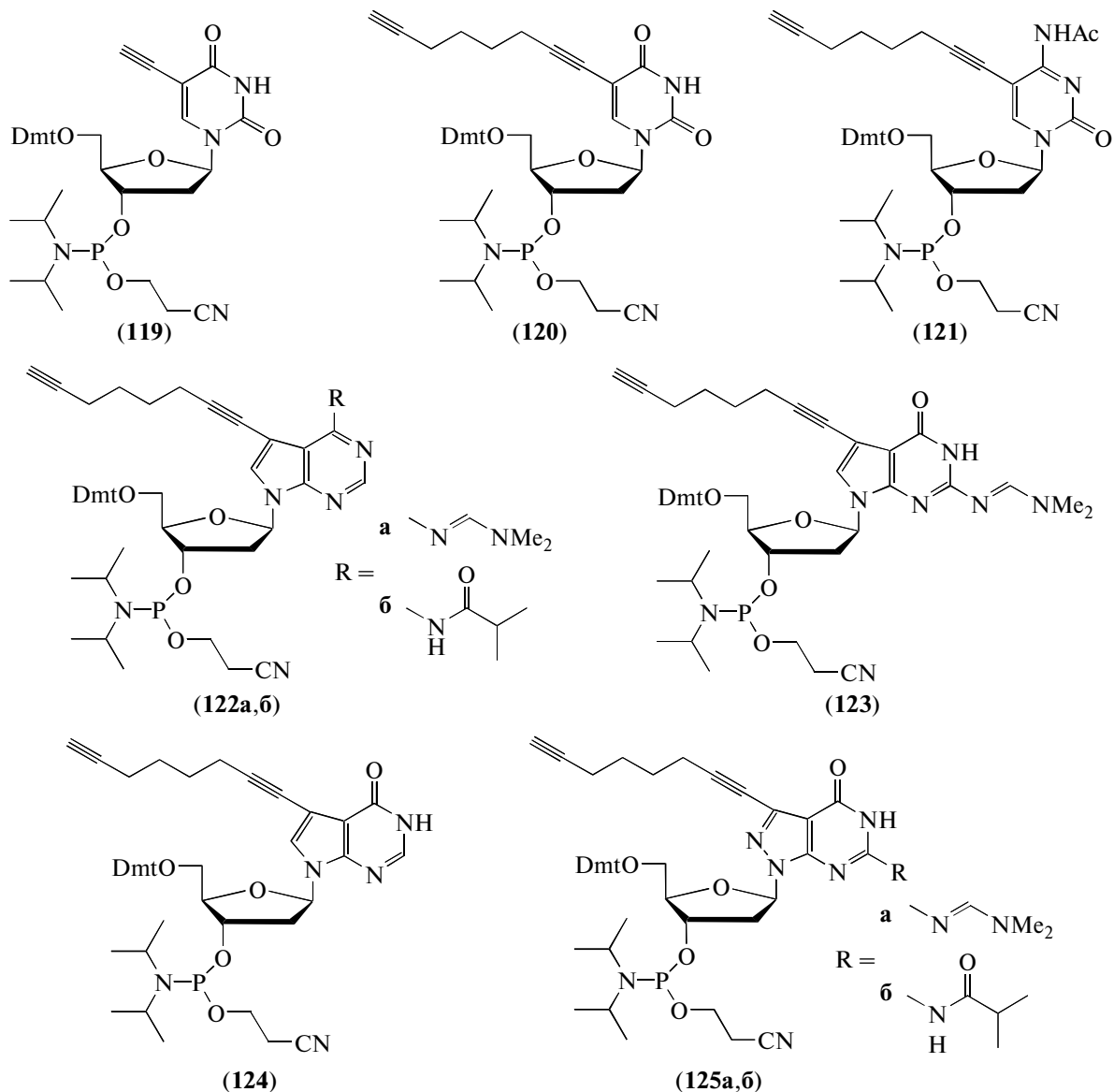


[109, 194, 195, 220, 222–226] и 2'-дезокситидина (**121**) [222, 223, 225, 226], а также 7-октадиинильных производных 7-дезапуриновых нуклеозидов 2'-дезоксаденозина (**122a**) [222, 223] и (**122b**) [225], 2'-дезоксигуанозина (**123**) [222, 223, 225, 227] и 2'-дезоксиденозина (**124**) [228]. Получено также аналогичное производное 7-деза-8-аза-2'-дезоксигуанозина (**125a,б**) [229, 230].

Следующим усовершенствованием явилось использование двух силильных защитных групп для терминального ацетилена (реагенты (**126a,б**)), из которых триметилсилильная защита удаляется при аммиачном деблокировании олигонуклеотида, а триизопропилсилильная – при последующей фто-

ридной обработке. Это позволяет ступенчато функционализировать ацетилены в олигонуклеотиде различными реагентами [195].

Из 2'-дезоксиденозина синтезированы также производные с другими линкерами по 5-положению – реагенты (**127**) [223, 224], (**128**) [231, 232] и (**129**) [233]. Последний реагент содержит два ацетиленовых остатка, пригодных для дальнейшей функционализации с помощью CuAAC. Недавно получено аналогичное производное 7-деза-2'-дезоксигуанозина (**130**) [227]. Общим свойством нуклеозидов (**120**)–(**130**) является наличие жесткого (этинильного или *транс*-этинильного для нуклеозида (**128**)) линкера в 5-положении пиримиди-

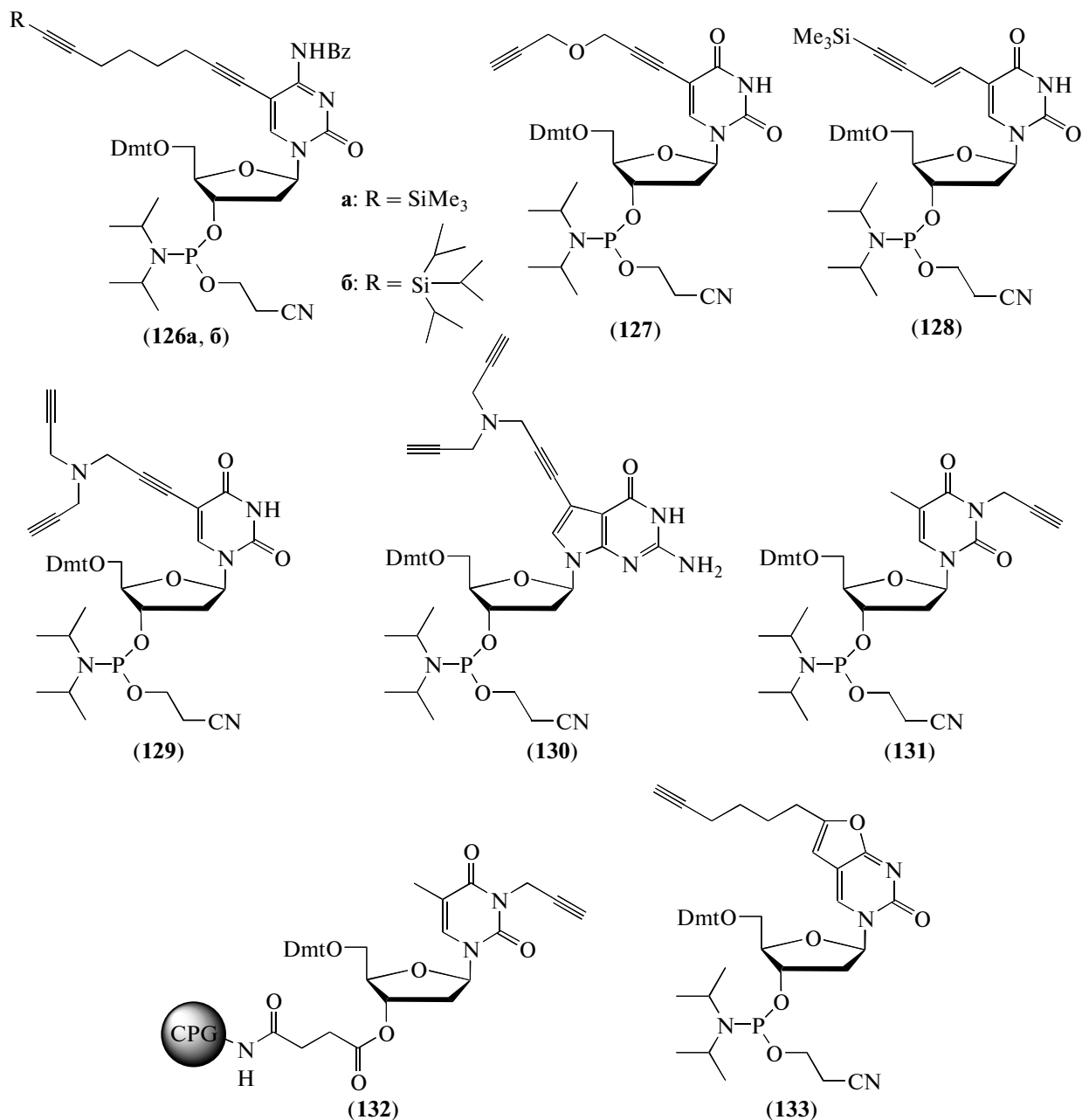


нов и 7-положении 7-дезазапуринов. Известно [234], что такой линкер направляет заместитель в большую бороздку ДНК и влияние модификации на стабильность дуплекса оказывается гораздо меньше, чем при присоединении по сахару; дестабилизация дуплекса не слишком велика даже в случае весьма объемных лигандов [235]. Поэтому присоединение алкина к нуклеозиду по нуклеиновому основанию с помощью жесткого (вблизи основания) линкера удобно и оправдано, особенно если затем планируется функционализация объемными реагентами и требуется, чтобы ее влияние на стабильность дуплекса было минимальным.

Следует упомянуть также N3-пропаргильное производное 2'-деоксиуридина в виде амидофосфита (131) [233] и твердофазного носителя (132) [96]. Фуранопиримидиновое производное (133),

являющееся продуктом циклизации нуклеозида (120), было использовано в олигонуклеотидном синтезе [236]. Защищенный олигонуклеотид (134) на твердой фазе содержит фуранопиримидиновый нуклеозид, но после аммиачного деблокирования полностью превращается в аналог цитозина (135) (схема 18). Такое поведение фуранопиримидиновых нуклеозидов в аммонолизе было отмечено ранее [237].

В целом, при использовании любого алкинмодифицирующего фосфамидитного реагента нет необходимости в каких-либо изменениях в синтетическом цикле, лишь для объемных молекул можно увеличить время стадии конденсации по сравнению со стандартным.



### 3.2. Введение алкинов в синтетические олигонуклеотиды с помощью постмодификации

Постмодификацию НК алкинами, как и в случае азидов, можно проводить широким набором методов, на твердой фазе или в растворе. Морван и сотр. предложили для получения алкинмодифицированных олигомеров использовать реакцию Атертона—Тодда, применявшуюся ранее для превращения на олигонуклеотидах Н-фосфонатов в амидофосфаты, но в качестве амина использовать пропаргиламин [238–240]. Реакцию проводят на твердой фазе: Н-фосфонат обрабатывают CCl<sub>4</sub> и пропаргиламином в пиридине; при этом группа P–H заменяется на P–NH–CH<sub>2</sub>–C≡CH. Можно сначала синтезиро-

вать олигонуклеотид фосфитным триэфирным методом, затем ввести Н-фосфонатную группу по 5'-терминальному положению однократно [238] или фосфонатным олигомером [239] и затем модифицировать фосфонаты пропаргиламином или, наоборот, провести сначала синтез олигофосфонатной последовательности, модифицировать фосфонаты пропаргиламином и затем обычным методом достроить олигонуклеотидную последовательность [240].

Для постсинтетической 5'-модификации дезоксиолигонуклеотидов 5'-гидроксильную группу защищенного олигомера (47) на подложке заменяли на йод [90, 91] (см. выше синтез азидоолигонуклео-

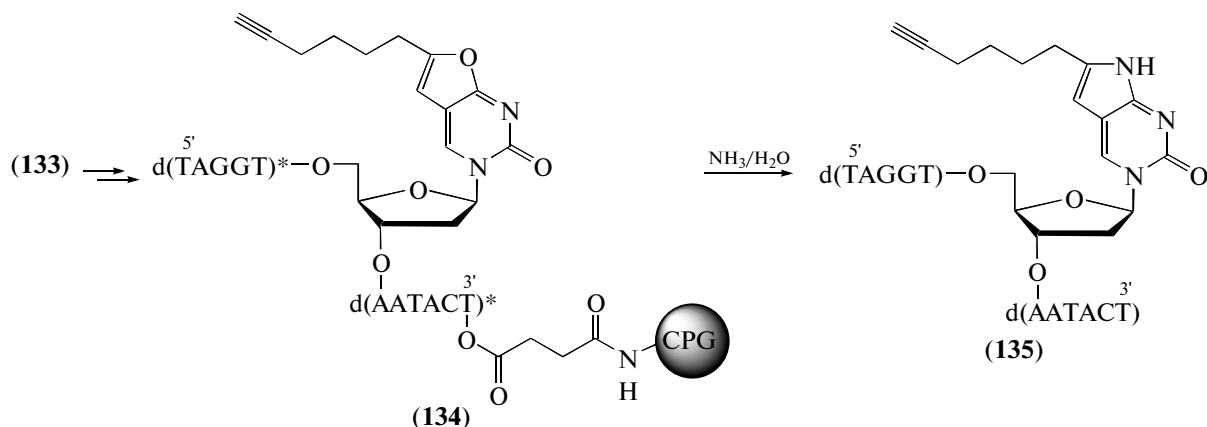


Схема 18. Превращение алкинсодержащего фуранопиримидинового нуклеозида в аммонолизе [236] (межнуклеотидные фосфаты не показаны).

тидов), а затем полученный йодид (**136**) обрабатывали 4-пентин-1-тиолом и после аммонолиза выделяли целевые ацетиленовые олигонуклеотиды (**137**) [241] (схема 19).

Наконец, следует упомянуть еще один метод постмодификации олигонуклеотида на твердой фазе, приводящий к алкинпроизводным. С помощью реагента (**138**) синтезируется нуклеотидный олигомер, содержащий в средней части нуклеозидную вставку с арилйодидным остатком. Защищенный олигонуклеотид (**139**) на твердой фазе функционализируется избытком 1,3-диэтилнлбензола в условиях реакции Соногаширы (CuI/Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>/Et<sub>3</sub>N/DMF), а затем проводится ам-

миачное деблокирование (схема 20). Продуктом является этиниларильный олигонуклеотид (**140**) [242].

С целью получения 5'-алкинмодифицированных олигонуклеотидов с помощью амидитного реагента (**141**) на 5'-конец защищенного олигонуклеотида на твердой фазе вводили активированную карбоксильную группу, затем проводили обработку пропаргил амином и аммиачное деблокирование [93]. С другой стороны, можно получать аминоалкильный олигонуклеотид на твердой фазе и обрабатывать его активированным производным (**142**) [93] или кислотой (**143**) в присутствии конденсирующих реагентов [88], а затем проводить аммиачное деблокирование.

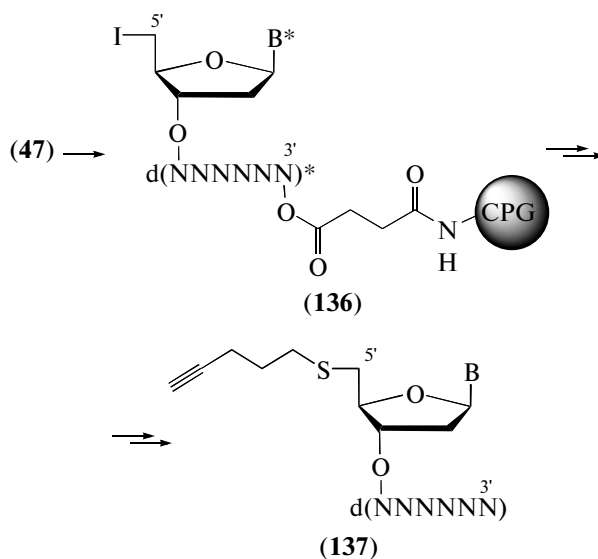


Схема 19. Получение 5'-алкинпроизводных олигонуклеотидов путем алкилирования 4-пентин-1-тиола [241] (фосфаты не показаны).

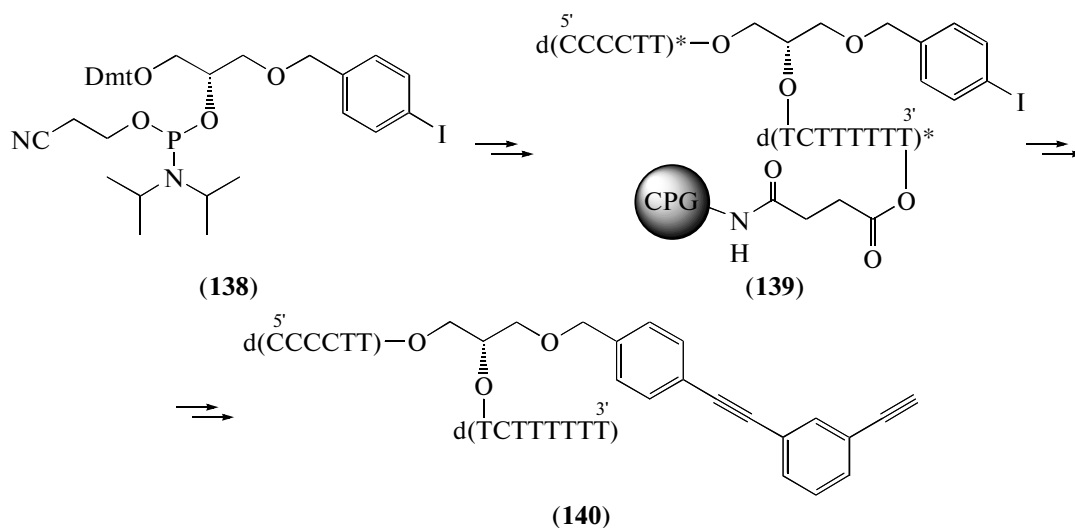
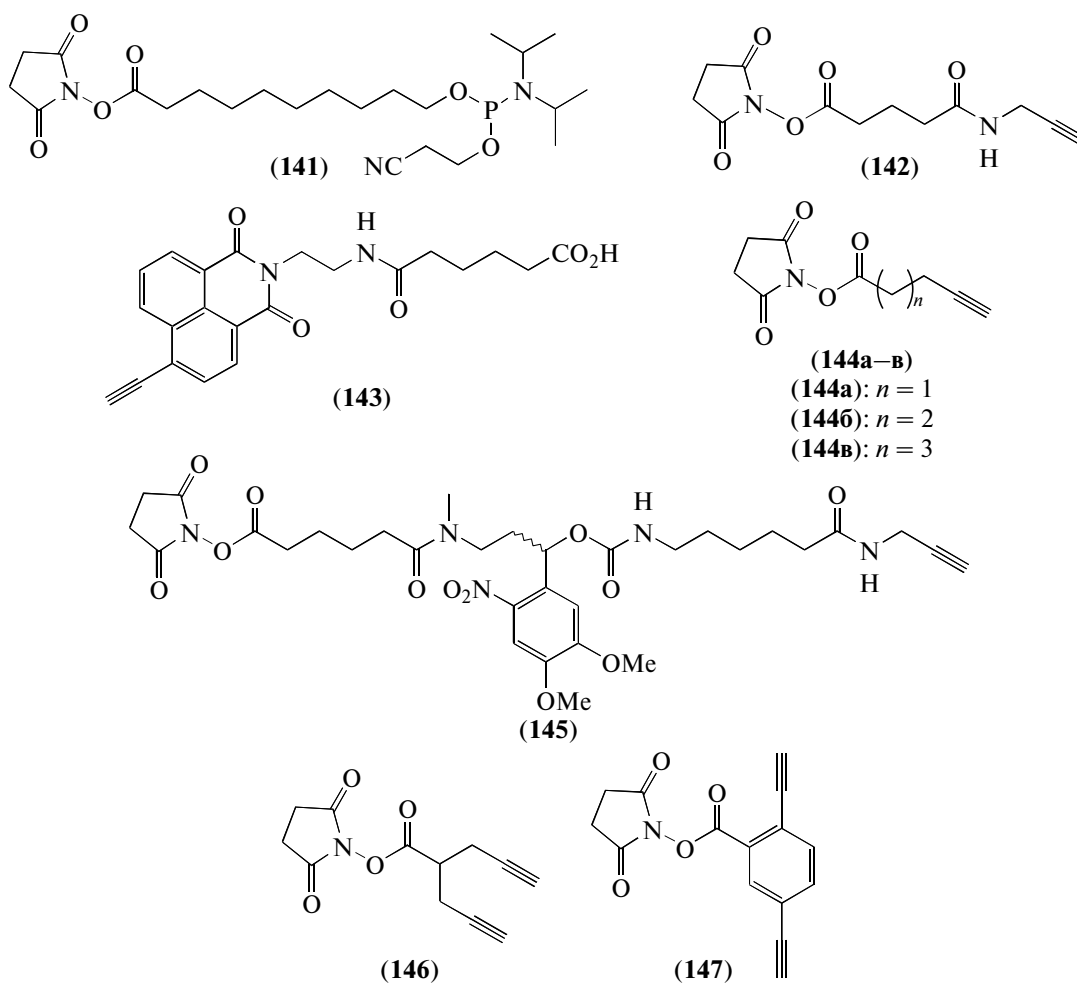
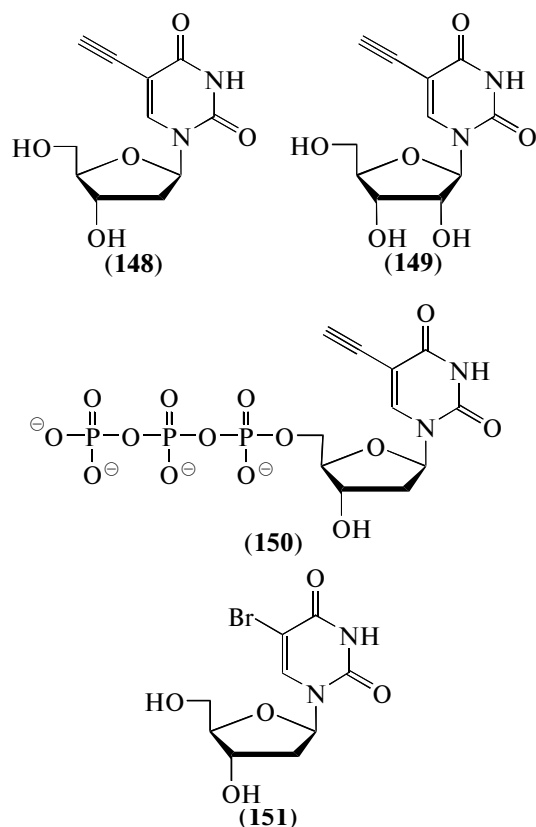


Схема 20. Постсинтетическое введение этинильной группы в олигонуклеотид с помощью реакции Соногаширы [242] (фосфаты не показаны).





Часто используют также реакцию аминомодифицированного олигонуклеотида с оксисукцинимидными эфирами  $\omega$ -алкинкарбоновых кислот, например, 4-пентиновой (**144a**) [110, 120, 122, 243], 5-гексиновой (**144б**) [119] и 6-гептиновой (**144в**) [104, 110, 244], которую проводят в водном растворе. Недавно описана модификация олигонуклеотидов в растворе активированным эфиром (**145**), содержащим фоторасщепляемый линкер [103]. Активированные эфиры (**146**) и (**147**) [123] позволяют по одной аминогруппе вводить сразу две этинильные группы.

### 3.3. Введение терминальных алкинов в ДНК с помощью ферментов

Первый алкинсодержащий нуклеозид, 5-этинил-2'-деоксиуридин (**148**), был описан в 1976 г. [245] (подробнее о синтезе этинильных производных нуклеозидов см. обзор [246]). Через несколько лет было обнаружено ферментативное фосфорилирование 5-этинилуридина (**149**), а также фосфорилирование его 5'-дифосфата до трифосфата и полимеризация в поли-5-этинилуридиловую кислоту [247]. Затем был синтезирован 5'-трифосфат 5-этинил-2'-деоксиуридина (**150**) и изучены его субстратные свойства по отношению к ДНК-полимеразам [248, 249]. Но после открытия CuAAC оказалось, что этинилнуклеозид (**148**) может быть использован в процедуре анализа синтеза ДНК в

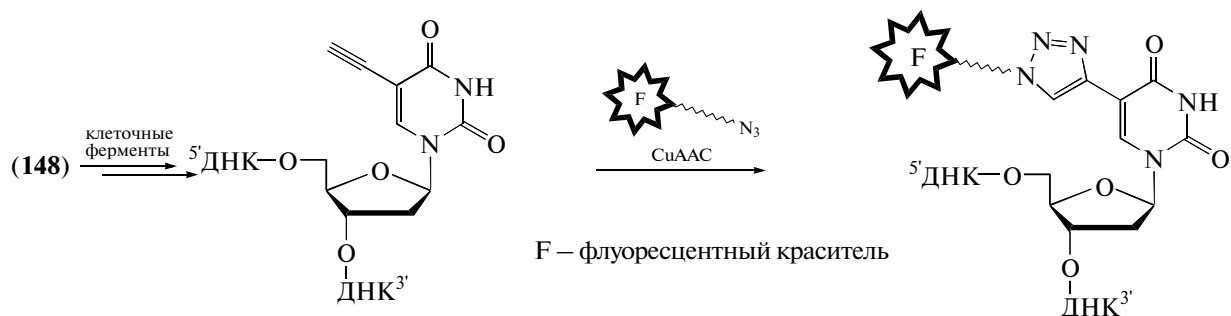
живой клетке вместо 5-бром-2'-деоксиуридина ((**151**), 5-Br-dU).

Бромпроизводное (**151**) широко используется для качественной и количественной оценки синтеза ДНК в клетках и тканях методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии [250]. Эти исследования позволили не только детально изучить пролиферацию клеток, влияние факторов роста, сайты репликации ДНК, дифференциацию клеток [251], нейрогенез [252], но и создать эффективные методы диагностики в клинической онкологии, химио- и радиотерапии, а также в канцерогенезе [253]. 5-Br-dU – структурный аналог тимидина, является субстратом для киназ и в виде 5'-трифосфатного производного эффективно встраивается в растущую цепь ДНК с помощью ДНК-полимераз. Для проведения анализа во время S-фазы клеточного цикла вводится 5-Br-dU, далее проводится фиксация клеток и определение включившегося в ДНК 5-Br-dU с помощью антител. Чтобы сделать 5-Br-dU доступным для антител, требуется провести предварительную частичную денатурацию двуцепочечной ДНК под действием кислот или нагреванием. Однако при этом происходит значительное разрушение многих клеточных эпителиев. Кроме того, объемность антител затрудняет их проникновение в случае компактных конденсированных структур. Поэтому важно было разработать аналогичный метод анализа, но без использования антител.

Недавно в качестве альтернативы 5-Br-dU был предложен 5-этинил-2'-деоксиуридин (**148**) [254, 255]. Первые стадии работы соответствуют аналогичным для 5-Br-dU, однако вместо использования флуоресцентно меченных антител, обычно проводят присоединение флуоресцентного красителя, содержащего азидогруппу (схема 21). Этот подход не требует предварительной денатурации ДНК, что позволяет проводить мультиплексный анализ клеточных эпителиев с использованием антител, а также дополнительно окрашивать ДНК флуоресцентными красителями. Стоит отметить, что использование вместо 5-Br-dU 5-этинильного производного (**148**) существенно сокращает время и стоимость эксперимента.

Отдельно хотелось бы выделить работы [256, 257], в которых для выявления остатков (**148**) проводили присоединение 5-бром-5'-азидо-5',2'-дидезоксиуридина с последующим детектированием последнего антителами. Так как остаток 5-Br-dU экспонирован в большую бороздку ДНК-дуплекса, то он становится более доступен для антител и отпадает необходимость в денатурации ДНК. Также эти работы могут продемонстрировать эффективность использования 5-этинил-2'-деоксиуридина (**148**) консервативно настроенным специалистам. Карелл и сотр. [147, 258] на примере прокариотических полимераз показали, что 5'-трифосфат (**150**) не всегда достаточно эффективно встраивается в цепь ДНК.

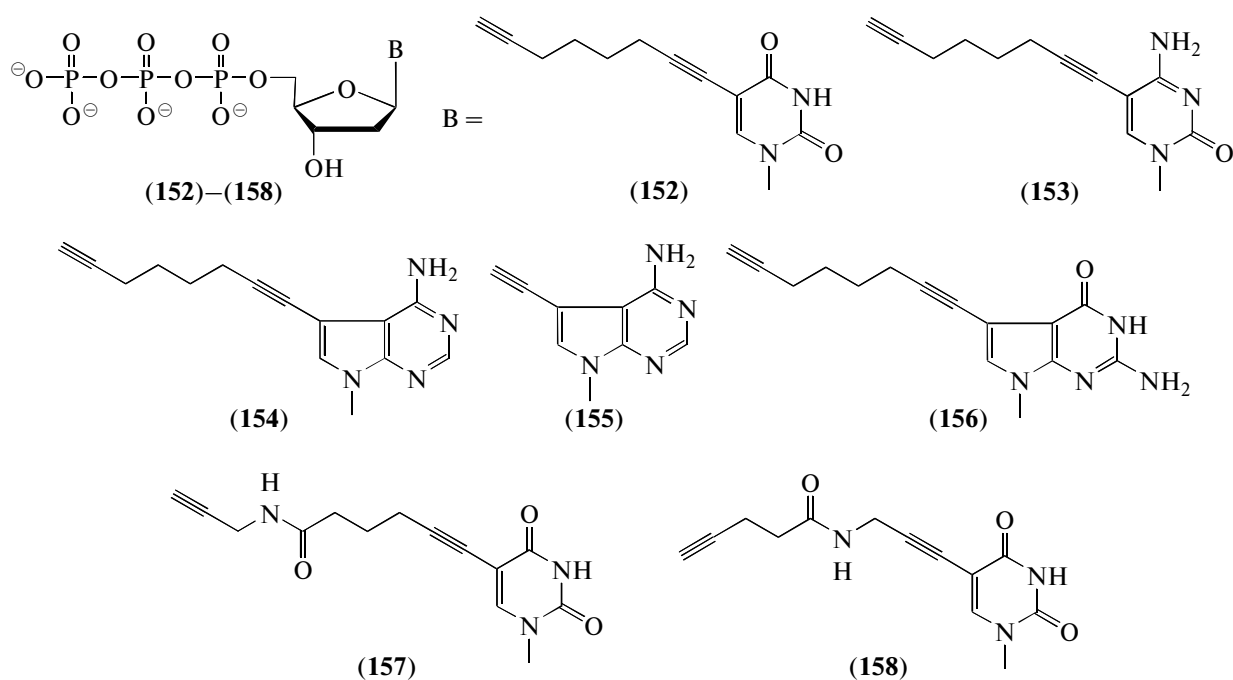




**Схема 21.** Встраивание нуклеозида (148) в ДНК в живой клетке и последующее мечение азидопроизводными флуоресцентных красителей.

Тем не менее факт мечения ДНК в культурах клеток и *in vivo* с применением 5-этинил-2'-деоксиуридина (148), говорит о том, что его 5'-трифосфат встраивается в растущую цепь ДНК с эффективностью, достаточной для детекции [259]. Основное применение этинильного производного (148) – количественное определение пролиферации клеток – как в культуре клеток [260–275], так и в эмбрионах [276] и животных [254]. Кроме того, он был предложен для детекции репликации, протекающей вне S-фазы клеточного цикла, что может указывать на нарушения системы репарации клетки [277].

Недавно была опубликована работа [278], в которой 5-этинилуридин (149) был использован для мечения РНК *in vivo*. Продемонстрировано, что производное (149) эффективно проникает в клетки и встраивается в РНК (содержание в РНК составляет 1–3% от уридина). Его дифосфат не является субстратом рибонуклеотидредуктазы, что позволяет проводить селективное мечение РНК. Используя нуклеозид (149), удалось продемонстрировать различие транскрипции в разных органах мыши. Причем можно было работать с большими фрагментами органов (~1 см), что выгодно отличает данный метод от метода на основе 5-Br-dU.



Для модификации ДНК большим числом этинильных групп в процессе ПЦР были получены 5'-трифосфаты октадиинильных нуклеозидов (152) [147, 258, 279–282], (153) [147, 279, 283], (154) и (156) [279]. Они весьма эффективно встраиваются в растущую цепь ДНК различными полимеразами и

способны полностью замещать соответствующие природные нуклеозиды. Трифосфат (155) [280] ферментативно встраивали в ДНК и затем изучали ее устойчивость к различным нуклеазам. Удивительно, что трифосфат (157) оказался плохим субстратом полимераз [147]. Описан также синтез трифосфата

(158) [284], но сам такой трифосфат не тестировался в полимеразной реакции, а использовался для получения с помощью CuAAC других модифицирующих трифосфатов, несущих остаток борной кислоты. Такие трифосфаты являлись субстратами полимераз и эффективно встраивались в нуклеотидную цепь в процессе ПЦР, а ПЦР-продукт приобретал способность связывать углеводы [284].

Соединение (159) использовалось для ферментативного введения алкинов в двухцепочечную ДНК с помощью метилтрансфераз (схема 22). По-видимому, субстратом служит азиридиновое производное, аналогичное соединению (78), образующееся в результате алкилирования атома азота алкилиодидом [284].

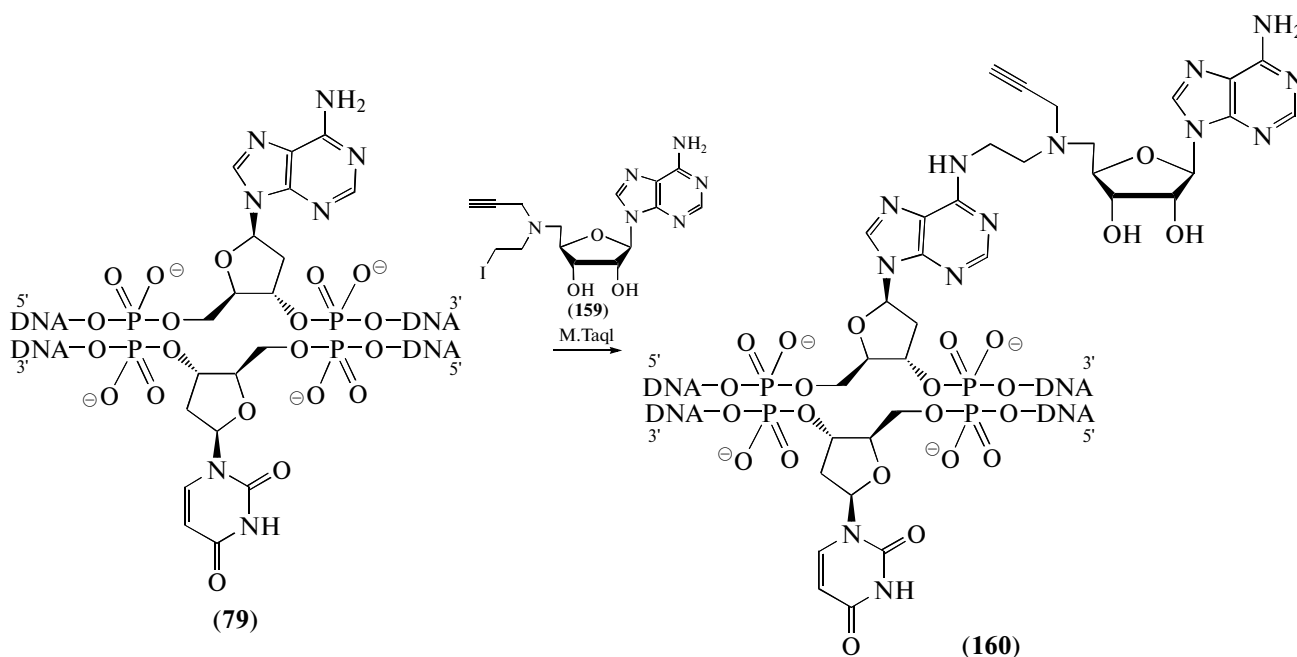


Схема 22. Модификация ДНК алкином с помощью метилтрансферазы [285].

Таким образом, рассмотренные в разделах 2 и 3 известные на сегодняшний день методы и реагенты позволяют модифицировать олигонуклеотиды и ДНК терминальными ацетиленами и азидами, включая те случаи, когда эти функциональные группы в дальнейшем не использовались для CuAAC. Представленный материал может оказаться полезным для исследователей, которые выбирают методы специфической модификации НК под свои задачи.

Далее рассмотрим примеры ковалентной модификации ДНК с помощью CuAAC. Их можно подразделить на методы с участием твердой фазы и реакции в растворе.

#### 4. МОДИФИКАЦИЯ ДНК С ПОМОЩЬЮ CuAAC С УЧАСТИЕМ ТВЕРДОЙ ФАЗЫ

##### 4.1. Модификация ДНК на твердой фазе с последующим переводом в раствор

Имеется несколько примеров, когда ковалентную модификацию олигонуклеотидов проводят на твердой фазе после завершения олигонуклеотидного синтеза и введения алкинов или азидов. Обычно

используют медный катализ в воде или водно-органической среде. В качестве катализатора применяли соединения одновалентной меди, образующиеся при смешивании раствора  $\text{CuSO}_4$  с аскорбиновой кислотой [86, 93, 95, 97, 102, 200, 238–240]. В качестве восстановителя применяли также трис(карбоксиэтил)фосфин [224], а в качестве соединения  $\text{Cu(I)-CuI}$  [93] и  $\text{CuBr}$  [195]. Оказалось, что реакцию на твердой фазе значительно ускоряет микроволновое облучение, причем реакцию проводят при температуре  $60^\circ\text{C}$  в водно-метанольной среде [95, 97, 102, 200, 238–240] или в растворе DMSO [172]. Добавление лиганда ТВТА (13a) значительно увеличивает выход целевого продукта [86, 93, 195, 224].

Реакция на твердой фазе использовалась в эффективном методе модификации олигонуклеотида тремя различными азидами. В олигонуклеотид встраивали ацетилен с помощью амидита (121) и два защищенных ацетилена с помощью реагентов (126a) и (126b). После завершения синтеза продукт модифицировали по незащищенному терминальному алкину, затем носитель промывали 1% уксусной кислотой для удаления триметилсилильной

группы из алкина (**126a**). Далее проводили модификацию вторым азидом. После этого олигонуклеотид деблокировали и удаляли триизопропилсилильную группу фторидом тетрабутиламмония в смеси ацетонитрил/DMF 4 : 1. Модификацию третьим азидом осуществляли в растворе. На твердой фазе можно проводить только первую стадию, после которой обработка олигонуклеотида водным раствором аммиака приводит к удалению триметилсилильной группы из реагента (**126a**) и освобождению второго алкина. В этом случае реакции со вторым и третьим азидом протекают в растворе [195].

На твердой фазе исследовалась циклизация олигонуклеотида (**161**), содержащего на 3'-фосфате алкин, а по 5'-терминальному положению азидогруппу (схема 23). Реакция в условиях микроволнового облучения дает циклические продукты (**162a,б**) и (**163a,б**), причем при увеличении длины олигонуклеотида доля циклического димера (**163**) возрастает [95]. Следует отметить, что образование подобного циклического димера наблюдалось и в случае твердофазной циклизации пептидов [286].

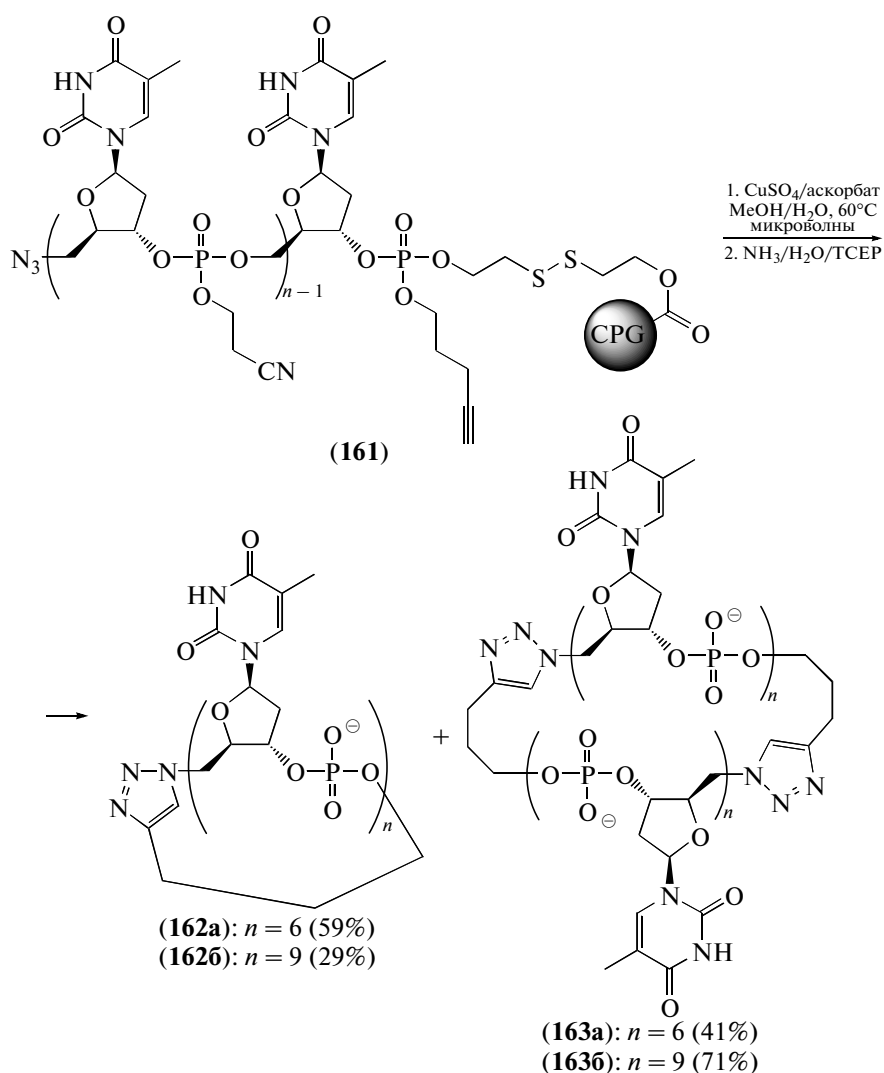


Схема 23. Циклизация/димеризация олигонуклеотида с помощью CuAAC на твердой фазе [95].

#### 4.2. Иммуобилизация ДНК

Поскольку азиды и терминальные алкины весьма устойчивы в водных растворах (не подвергаются гидролизу как, например, оксисукцинимидные эфиры), и медькатализируемое

циклоприсоединение является рН-независимой реакцией, этот метод перспективен для иммобилизации ДНК на твердой фазе. В таблице представлены описанные в литературе примеры иммобилизации ДНК посредством CuAAC.

## Иммобилизация ДНК на твердой фазе с помощью CuAAC

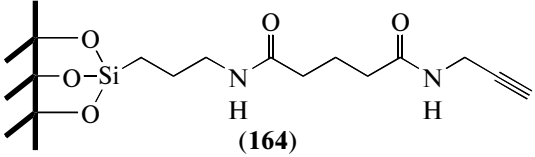
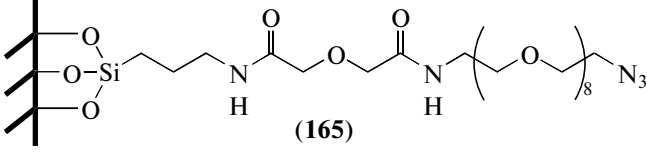
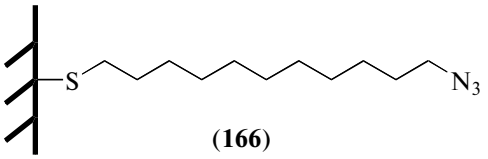
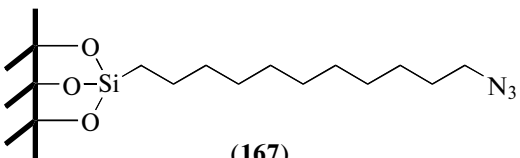
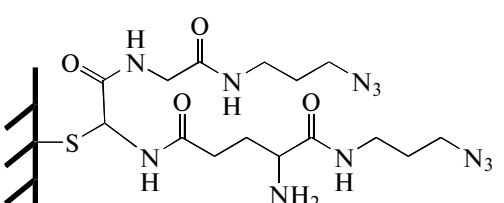
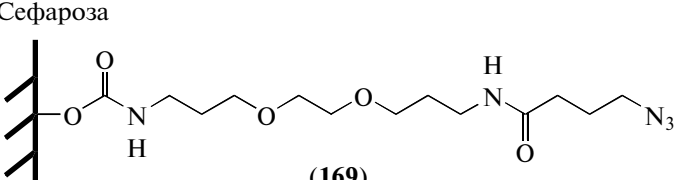
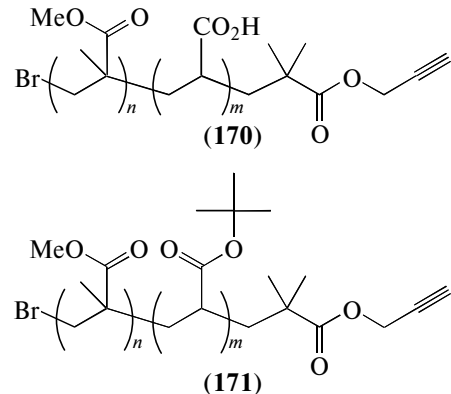
Твердая фаза	Условия иммобилизации	Ссылки
Стекло  (164)	Азидо-ДНК, CuI, DIEA, DMSO, H <sub>2</sub> O, 12 ч	[114, 115]
Стекло  (165)	Алкинил-ДНК, Cu(MeCN) <sub>4</sub> PF <sub>6</sub> , ТВТА, аскорбат, DMSO, H <sub>2</sub> O	[244]
Золото  (166)	Алкинил-ДНК, CuBF <sub>4</sub> , ТВТА, DMSO, H <sub>2</sub> O  Алкинил-ДНК, CuSO <sub>4</sub> , аскорбат, ТВТА, водный буфер	[241]  [188]
Стекло  (167)	Алкинил-ДНК, нанесение в водном буфере, высушивание, давление  Алкинил-ДНК, CuSO <sub>4</sub> , аскорбат, ТВТА, водный буфер	[194]  [120, 19]
Золото, наночастицы  (168)	Алкинил-ДНК, CuBr, ТВТА, DMSO, H <sub>2</sub> O, <i>t</i> BuOH	[281]
Сефароза  (169)	Алкинил-ДНК, CuSO <sub>4</sub> , аскорбат, ТВТА, водный буфер	[204]

Таблица. Окончание

Твердая фаза	Условия иммобилизации	Ссылки
<p>Стекло, покрытое алкинсодержащими сополимерами: акриловой кислоты и метилметакрилата (170), <i>трет</i>-бутилакрилата и метилметакрилата (171).</p> 	<p>Азидо-ДНК, Cu(MeCN)<sub>4</sub>BF<sub>4</sub>, TBTA, DMSO, H<sub>2</sub>O</p>	<p>[118]</p>

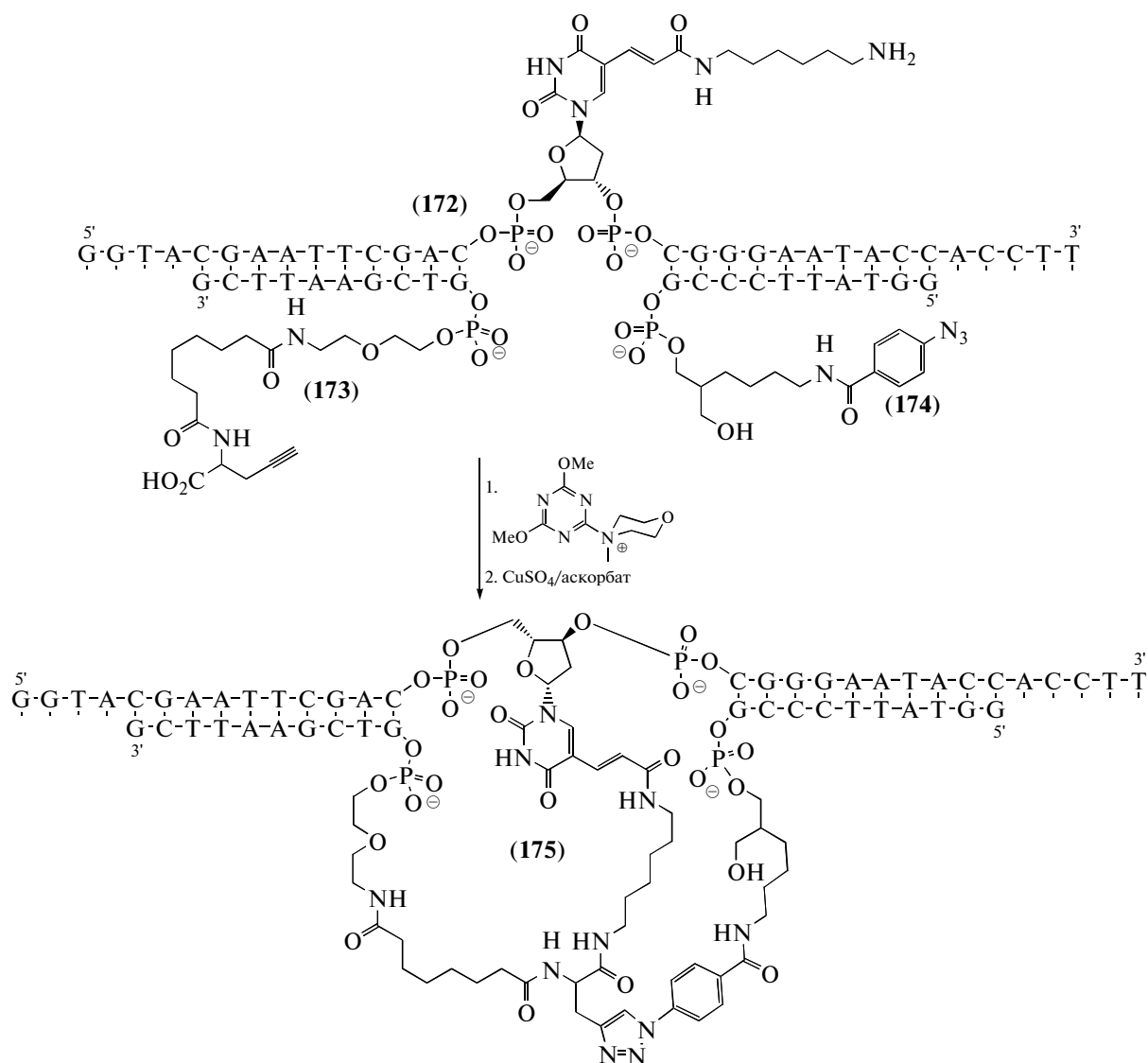


Схема 24. Ковалентная сшивка тандемного олигонуклеотидного комплекса с помощью двух последовательных реакций [122].

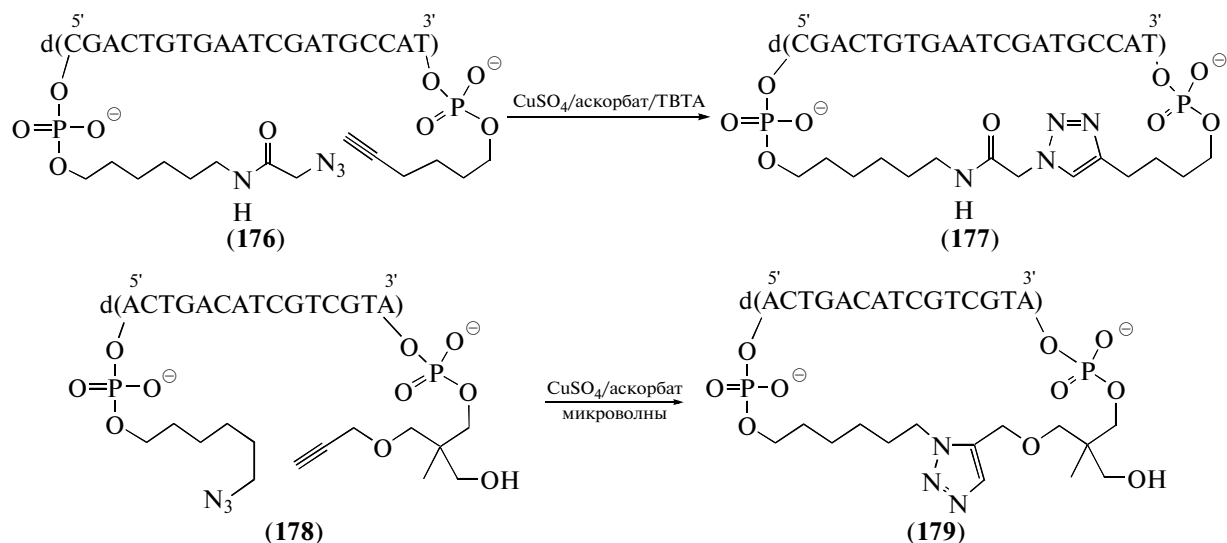


Схема 25. CuAAC-циклизация олигонуклеотидов в растворе [95, 101].

Твердофазный носитель модифицируют азидом или алкином тем или иным способом и проводят иммобилизацию алкин- или азидомодифицированной ДНК в водном или водно-органическом растворе в присутствии меди(I) и, как правило, ее хелатора, ТВТА.

Примечательна индукция циклоприсоединения давлением, описанная в работе [194]: после нанесения алкин-ДНК на гидрофобную азидоповерхность (167) и высушивания ковалентное присоединение ДНК происходит в тех местах, к которым приложено давление (матрица прижимается грузом массой 120 г). Такой способ удобен для получения высоко разрешенных рисунков из иммобилизованной ДНК. Показано, что способность к гибридизации иммобилизованной ДНК зависит от способа введения алкина: лучше сохраняется способность к гибридизации у модифицированной ДНК с алкином в терминальном положении [194]. Для контроля процесса иммобилизации используют гибридизацию с комплементарной последовательностью, плазмонный резонанс, атомно-силовую микроскопию.

## 5. МОДИФИКАЦИЯ ДНК С ПОМОЩЬЮ CuAAC В РАСТВОРЕ

### 5.1. CuAAC в синтезе конъюгатов ДНК–ДНК

Модификация ДНК и олигонуклеотидов с помощью CuAAC в растворе получила наибольшее распространение из-за удобства проведения реакции. Но в присутствии кислорода и соединений меди возможна окислительная деградация ДНК [287], что было замечено в одной из первых работ [104]. В дальнейшем использование лиганда ТВТА для стабилизации Cu(I) и проведение реакции в инертной атмосфере позволили избежать деградации ДНК и получать высокие выходы продукта конъюгации.

В растворе легко протекают внутримолекулярные реакции или реакции внутри комплементарных комплексов, что позволяет синтезировать довольно сложные конструкции, труднодоступные другими методами. Например, в одной из первых работ по CuAAC на ДНК [122] из модифицированных олигодезоксинуклеотидов (172), (173) и (174), образующих тандемный комплекс и несущих в модификации амин, алкин/карбоксил и азид, соответственно, последовательной обработкой конденсирующим реагентом (4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолинийхлоридом) и соединением меди(I) получают ковалентный конъюгат (175) с выходом 32% (схема 24).

Если поместить азид и ацетилен в терминальные положения олигонуклеотида, то можно осуществлять циклизацию. Например, после обработки конъюгата (176) катализатором был выделен циклический продукт (177) [101], а из конъюгата (178) получено вещество (179) [95] (схема 25).

Циклоприсоединение азидов и алкинов позволяет синтезировать ДНК-наноструктуры. Описана сборка из двухцепочечной ДНК шестиугольника, каждая из сторон которого представляет из себя десятизвенный дуплекс (один виток спирали) (схема 26) [105]. Сначала был синтезирован 70-звенный олигонуклеотид (180), модифицированный по 5'-терминальному положению ацетиленом, а по 3'-терминальному положению — азидом. Добавление медного катализатора индуцирует внутримолекулярную циклизацию в растворе. Полученный продукт (181) служит матрицей для гибридизации 72-звенного олигонуклеотида, модифицированного таким же образом, как и олигомер (180). После образования комплементарного комплекса (182) проводят циклоприсоединение; в результате образуется шестиугольник (183). На

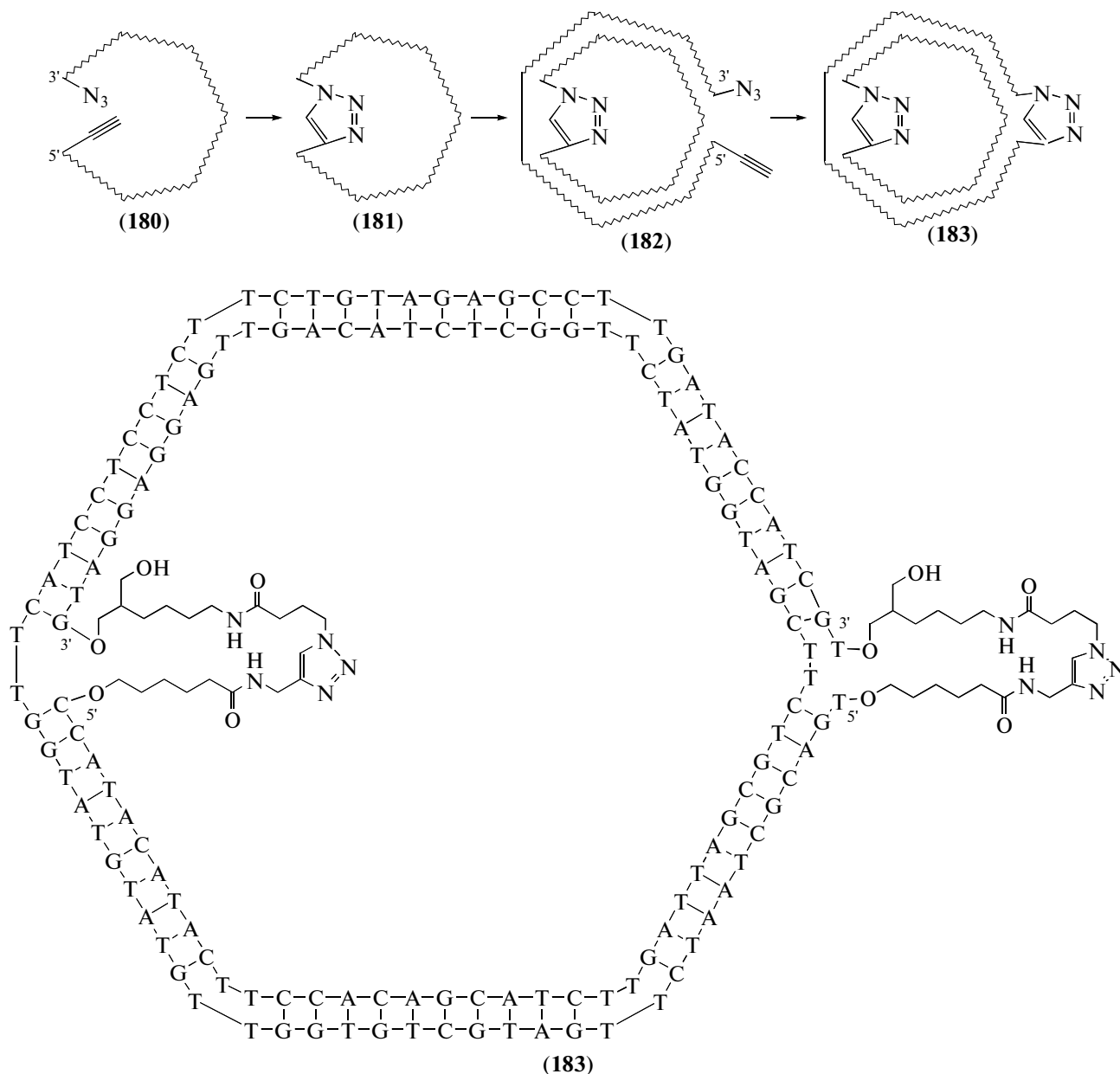


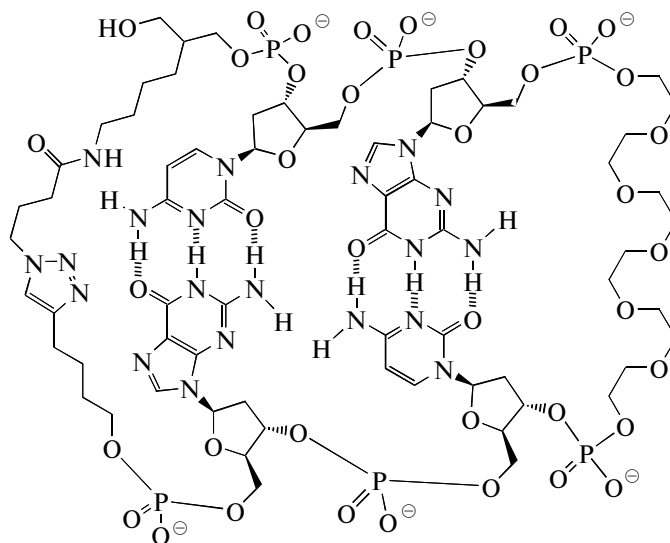
Схема 26. Получение с помощью CuAAC шестиугольника из ДНК-дуплексов [105].

схеме 26 отдельно показана нуклеотидная последовательность и структура 1,2,3-триазолсодержащих линкеров в продукте (183). Дуплексные сегменты соединены некомплементарными дитимидиновыми линкерами, которые должны обеспечивать изгиб ДНК-цепи [105].

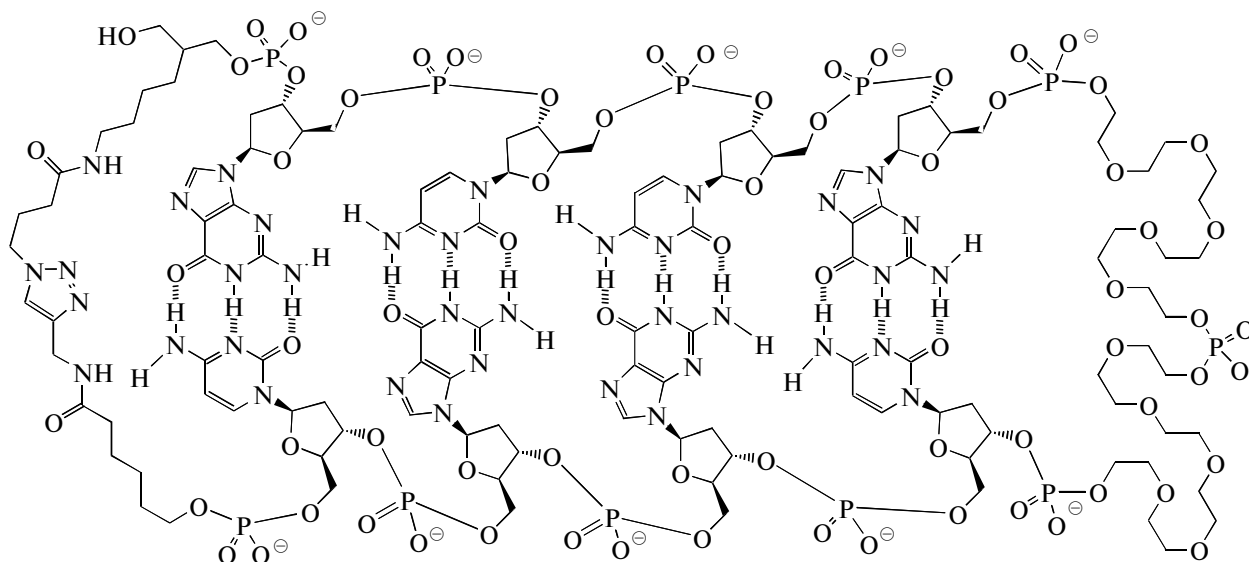
CuAAC позволяет с выходами более 60% получать замкнутые дуплексы (иногда их называют гантелеобразными), даже очень короткие. Такие структуры чрезвычайно устойчивы. Например, метод термической денатурации показывает, что температура плавления мини-дуплекса (184) в воде составляет более 75°C, а четырехзвенная структура (185)

не плавится при этой температуре даже в 20% формамиде [106, 107]. Такие мини-дуплексы удобны для изучения интеркалирующих флуорофоров и специфичности связывания с ДНК антибиотиков [107, 108]. В качестве петлевой части гантелеобразных ДНК-структур может выступать короткая нуклеотидная последовательность, а при сборке таких структур из двух комплементарных олигонуклеотидов обе петлевые части содержат триазольные фрагменты [96, 111].

Перечисленные примеры показывают, что внутримолекулярная циклизация олигонуклеотидов в растворе протекает весьма эффективно. Дополни-



(184)



(185)

тельной иллюстрацией этого может служить превращение соединения (186) под действием медного катализатора: единственным продуктом является бициклический олигонуклеотид (187) [95] (схема 27).

Описаны примеры синтеза олигонуклеотид-олигонуклеотидных конъюгатов [77, 79, 93], введения межцепочечных сшивок в ДНК-дуплексы [109], а также различные сшивки внутри ДНК-триплексов [123] и квадруплексов [119]. Таким образом, CuAAC представляет собой удобный метод синтеза разнообразных структур на основе олигонуклеотидов. Внутримолекулярные и внутрикомплексные реакции дают лучшие выходы продуктов, но реакция вполне пригодна и для использования в межмолекулярном варианте.

## 5.2. Синтез других конъюгатов ДНК

Модификация в растворе использовалась для получения конъюгатов ДНК с веществами пептидной природы — зеленым флуоресцентным белком [191], эстеразой 2 *E. coli* [117], пептидными аналогами НК [218] и пептидным антикоагулянтом бивалирудином [121]. Несмотря на немногочисленность таких примеров, можно с уверенностью утверждать, что CuAAC в ближайшие годы станет основным инструментом в синтезе ДНК-белковых конъюгатов для самых разнообразных целей.

Область конъюгатов НК с углеводами разработана значительно лучше. Многие работы посвящены модификации НК различными сахарами (иногда присоединение сахара проводят на твердой фазе): производными галактозы [97, 102, 147, 193, 203, 220,



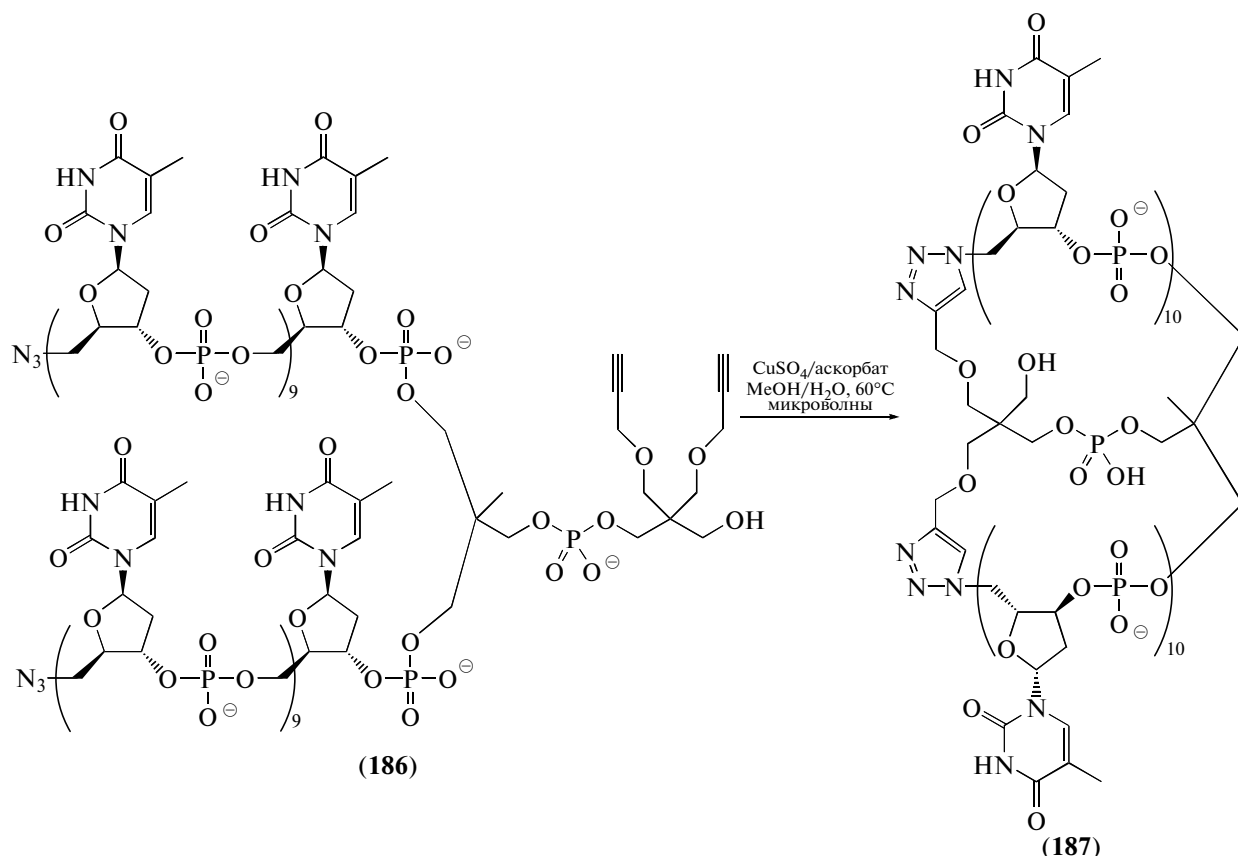


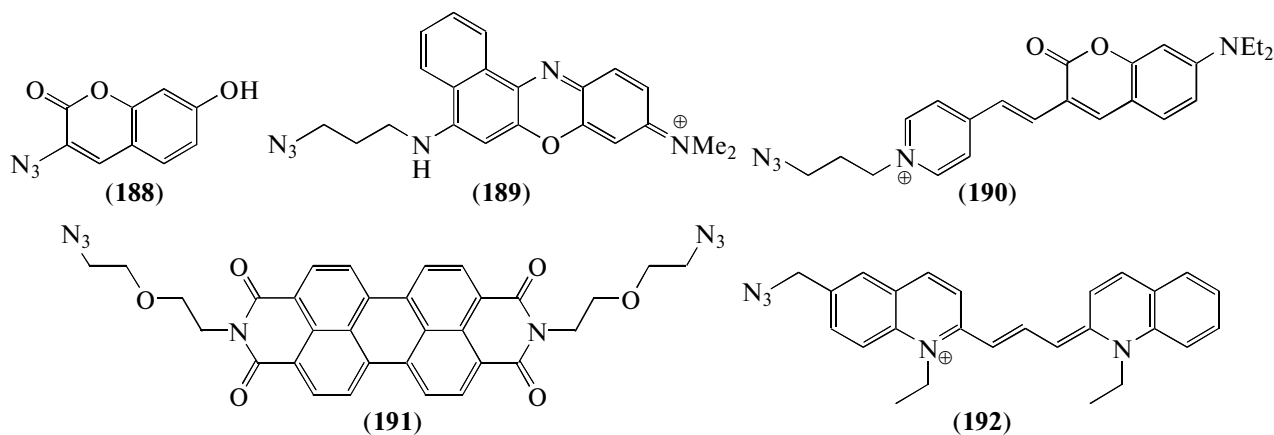
Схема 27. Получение бициклического производного из модифицированного разветвленного олигонуклеотида с помощью CuAAC в растворе [95].

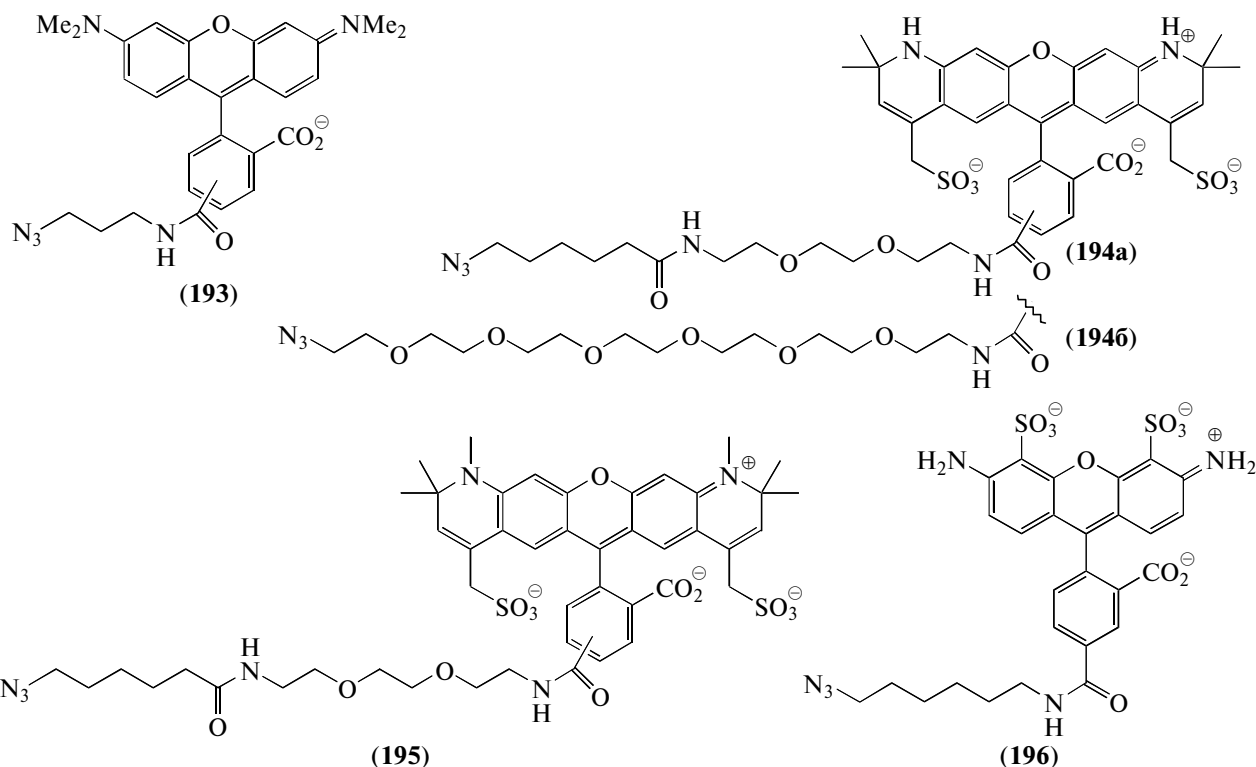
239, 240, 258, 279, 282, 283], маннозы [86, 97, 102, 240], фукозы [193, 200] и неамина (неомицина А) [86]. Область применения олигонуклеотид-углеводных конъюгатов довольно обширна [288]. Полученные с помощью CuAAC углеводные производные ДНК использовались преимущественно для получения лектинсвязывающих гликочипов [102, 200, 203, 240] и для направленной металлизации двухцепочечной ДНК [258, 283].

В качестве аффинной метки циклоприсоединением в ДНК вводили биотин [195, 231, 233].

Флуоресцентные красители весьма популярны для мечения ДНК. Описаны модификации олигонуклеотидов дансилом [87], пиреном [195, 227, 285], периленом [205], флуоресцеином [195, 220], тетраметилродамином и индокарбоцианином  $Cu_3$  [195].

3-Азидо-7-гидроксикумарин (188) интересен тем, что он практически не обладает флуоресценцией, а после реакции с алкиновыми производными ДНК появляется интенсивная эмиссия при 478 нм [225, 228–230, 233, 235, 243]. В ДНК вводили производные феноксазиния (189) и кумарина (190) и изу-





чали зависимость интенсивности флуоресценции конъюгатов от способа присоединения красителя [196]. Диазидопроизводное перилендиимида (**191**) позволяет получать конъюгаты, в которых к одному остатку красителя присоединены два олигонуклеотида [197, 198]. Цианиновый краситель (**192**) служит фотосенсибилизатором и позволяет детектировать на фотобумаге до 0.3 фмоль ДНК [226].

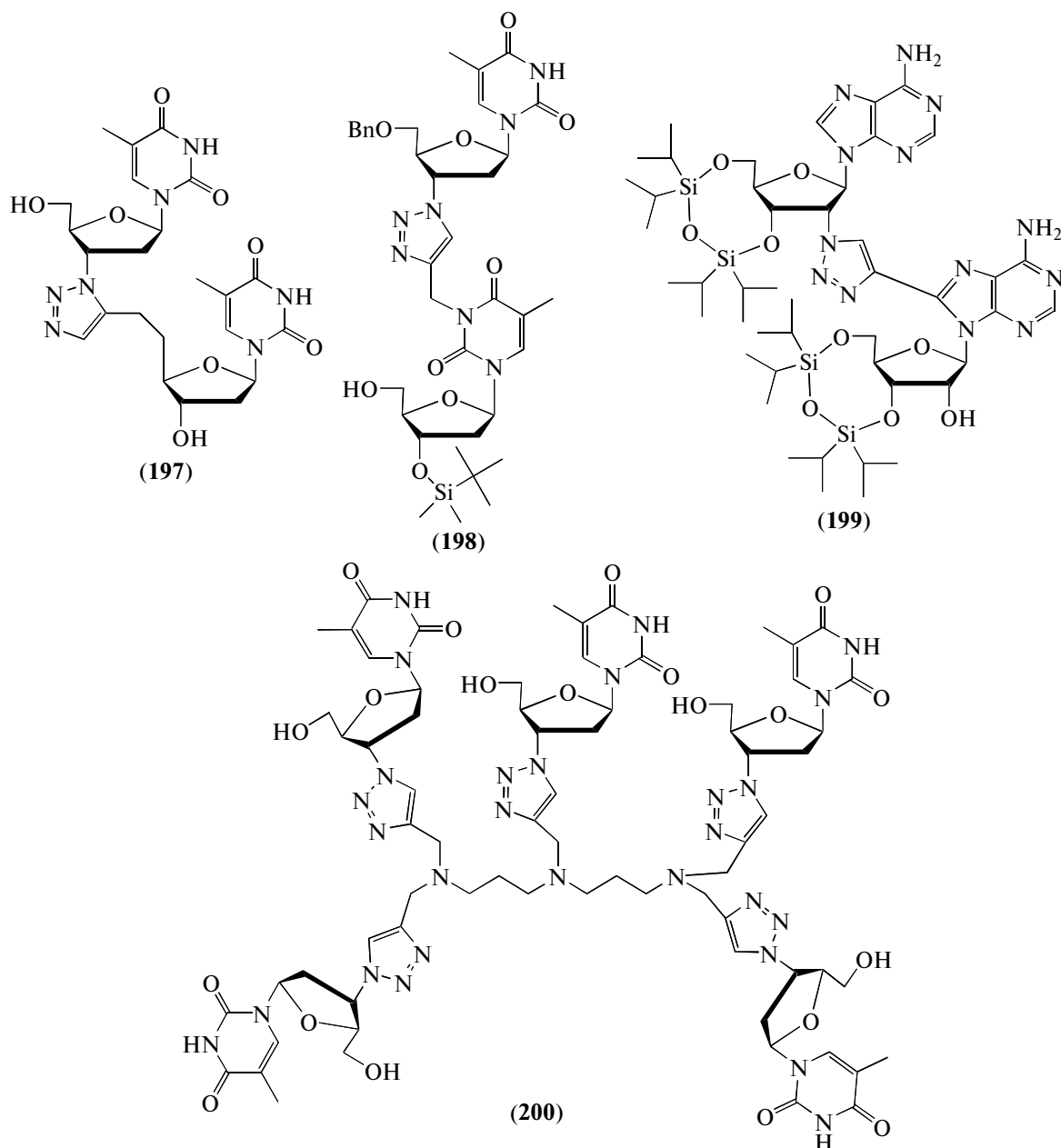
Упомянутая в разделе 3.3 детекция включения 5-этинил-2'-дезоксиридина (**148**) в ДНК/РНК, синтезирующуюся в живой клетке, может также быть условно отнесена к мечению в растворе. Для ковалентного присоединения синтезированы разнообразные азиды флуорофоров, например, производные тетраметилпродамина (**193**), красителей Alexa Fluor 568 (**194a,б**) и Alexa Fluor 594 (**195**) [253, 275]. Но обычно используют коммерческие азиды; среди них наиболее употребительным является Alexa Fluor 488 (**196**), полоса эмиссии которого по положению близка к полосе эмиссии флуоресцеина.

## 6. CuAAC В СИНТЕЗЕ АНАЛОГОВ ОЛИГОМЕРОВ ДНК

Поскольку среди многочисленных аналогов нуклеозидов были получены как азидо-, так и алкинопроизводные, применение реакции [3 + 2]-циклоприсоединения для синтеза производных нуклеозидов не заставило себя ждать. Рассмотрение всех модифицированных нуклеозидов, содержащих 1,2,3-триазольную группу, выходит за рамки цели данного обзора. Следует отметить только примене-

ние триазольного линкера для присоединения нуклеозидов друг к другу. Первое упоминание о том, что встраивание динуклеозида (**197**) в олигонуклеотидную цепь приводит к снижению температуры плавления дуплекса с комплементарной последовательностью, относится к 1997 г. [234]; триазольные модификации встраивали в олигонуклеотиды с помощью соответствующих динуклеозидных производных [289]. В последующие годы были описаны синтезы динуклеозидных производных (**198**) [290] и (**199**) [291], а также нуклеозидных кластеров типа (**200**) [292], (**201**) [293] и (**202**) [294].

Недавно возникла идея использовать триазол-содержащий линкер в синтезе аналогов олигонуклеотидов. Поскольку медькатализируемое циклоприсоединение происходит региоспецифично и с высокими выходами, этот метод подходит для пошагового наращивания цепи. Были разработаны три варианта такого подхода и синтезированы соответствующие тиминсодержащие олигомеры (**203**) [295], (**204**) [296–298], (**206**) [299, 300]. Из этих соединений только олигомер (**204**) продемонстрировал способность связываться с комплементарной ДНК-последовательностью, причем температура плавления дуплекса более чем на 40°C превысила температуру плавления дуплекса соответствующего декатимидилата [297]. Авторы работы [297] объясняют этот факт электронейтральностью скелета цепи и его соответствие природной ДНК по числу атомов в межнуклеозидном линкере.

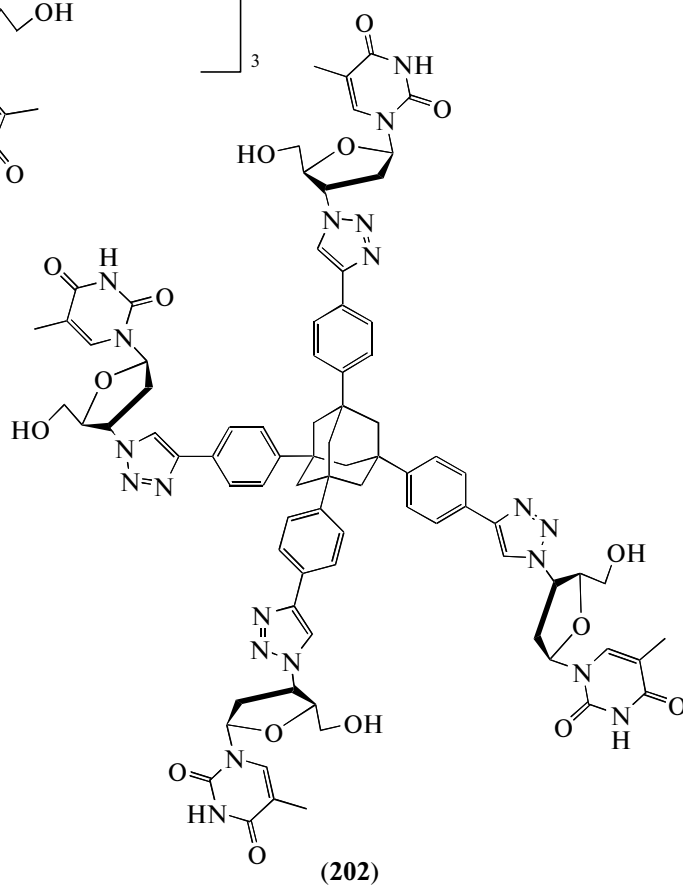
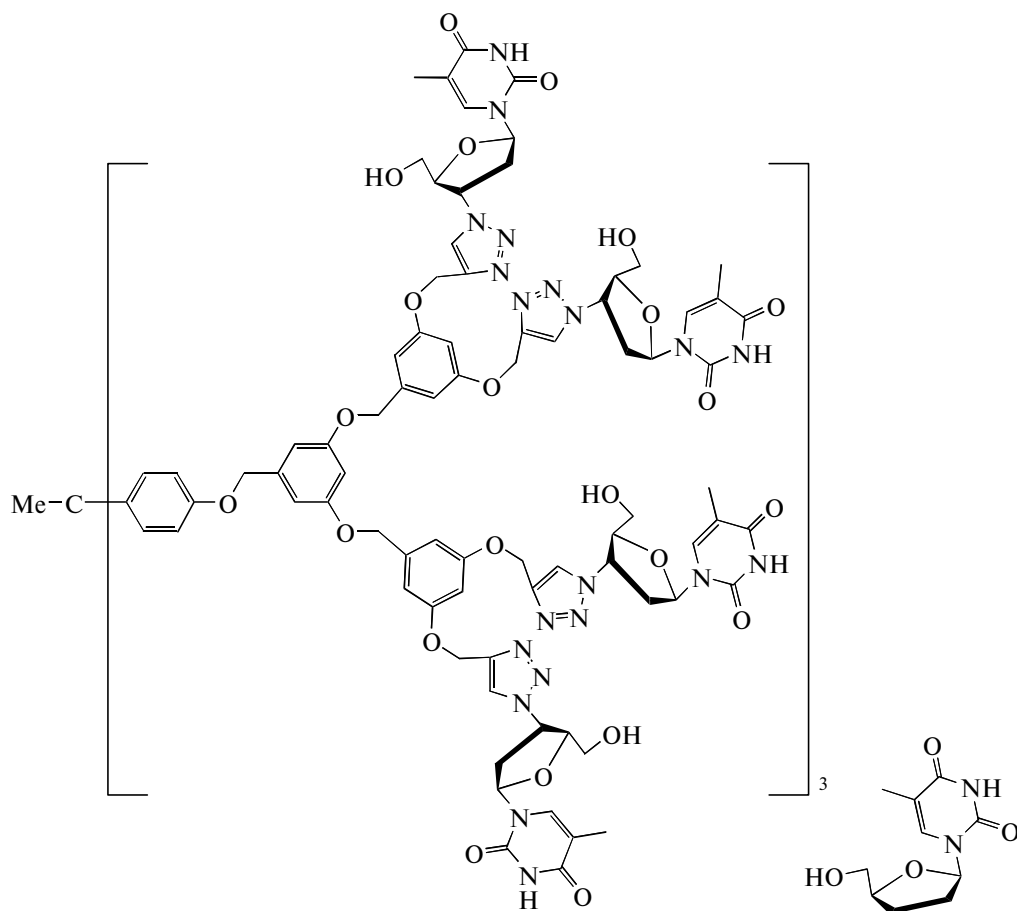


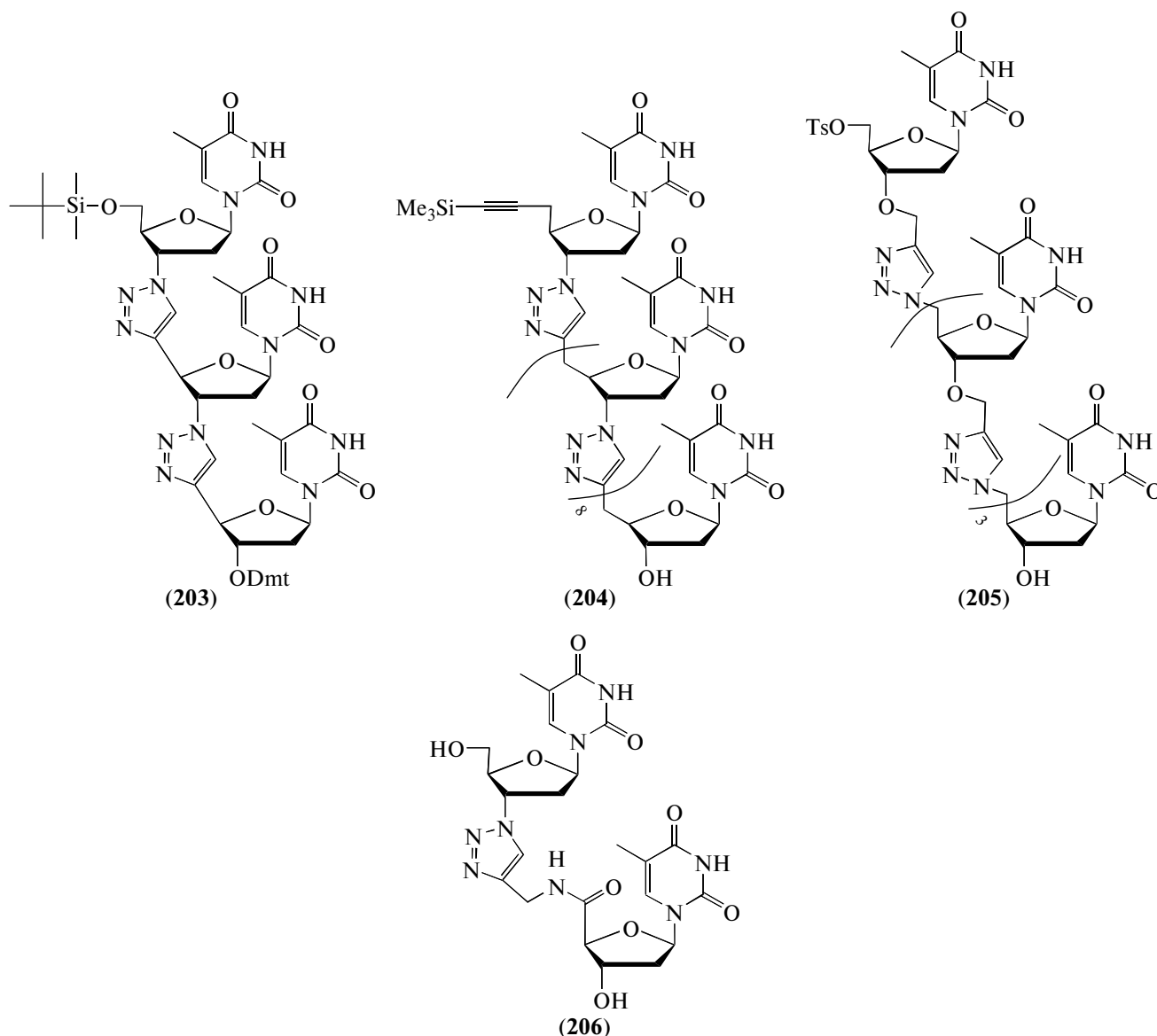
Следует отметить еще одну интересную особенность триазольного линкера. Была исследована ПЦР-амплификация матрицы, полученной CuAAC-лигированием азид- и алкинмодифицированных олигонуклеотидов и содержащей в результате внутри цепи динуклеозид (**206**) [79]. Оказалось, что в ПЦР-продукте фрагмент (**206**) заменяется на единичный тимидин, причем это имеет место для различных ДНК-полимераз. Авторы отмечают, что обнаружение такого специфично амплифицируемого продукта химического лигирования открывает новые возможности в биологии и нанотехнологии.

## 7. ПРИСОЕДИНЕНИЕ К АЗИДАМ АЛКИНОВ, АКТИВИРОВАННЫХ НАПРЯЖЕНИЕМ ЦИКЛА

В циклооктинах (**207**) тройная связь напряжена, поэтому собственно циклооктин реагирует с азидами очень быстро [301, 302]. Этот факт послужил отправной точкой для идеи Бертоцци и сотр. ввести в циклооктин функциональные группы и использовать эту реакцию для биоконъюгации [303] (схема 28).

Начиная с 2004 г. было синтезировано несколько функциональных производных циклооктинов — кислоты (**209**) [303], (**210**)–(**212**) [304], (**213**) [305],





(214), (215) [306], (216) [307], производное азациклооктина (217) [308] и активированное производное дибензоциклооктина (218) [309]. Недавно описано фотоиндуцируемое образование дибензоциклооктина из соответствующего циклопропена [310]. Из циклооктиновых кислот были получены биотиновые производные, а также производные флуоресцентных красителей – Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594,

Alexa Fluor 647, которые использовались для визуализации различных азидов [311, 312], в том числе на эмбрионах [313].

Эффективность биоконъюгации с помощью реакции циклооктинов с азидом уступает таковой для методов с использованием CuAAC. Но метод циклоприсоединения без медного катализатора имеет большие перспективы, поскольку эту реак-

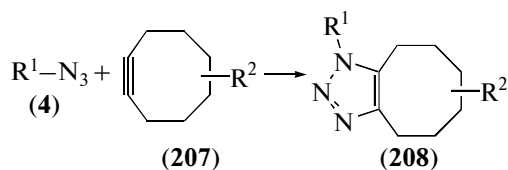
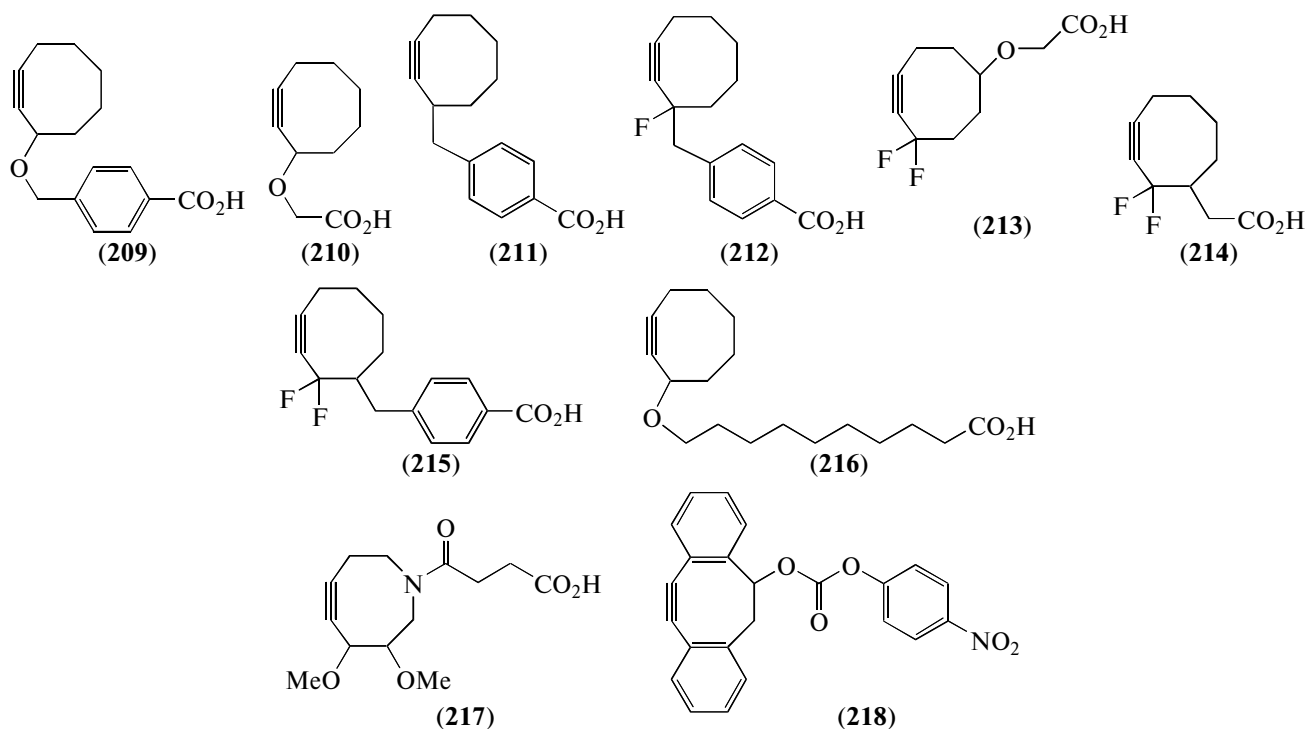


Схема 28. Присоединение циклооктинов к азидам в отсутствие медного катализа.



цию можно проводить в живых системах, где соединения меди могут оказаться токсичными. К настоящему времени описан единственный пример использования циклооктинов для получения производных НК. Аминомодифицированные олигонуклеотиды модифицировали активированным эфиром кислоты (215), а затем иммобилизовали на азидомодифицированную поверхность клеток [314]. Такая функционализация поверхности олигонуклеотидами открывает возможности сборки с помощью гибридизации различных структур с контролируемым взаимным расположением клеток.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, реакция циклоприсоединения азидов и алкинов, особенно в медь (I)-катализируемом варианте, является мощным методом биоконъюгации, ортогональным по отношению к большинству других реакций и функциональных групп. Эта реакция имеет огромные перспективы использования в области исследования и биотехнологии НК, поскольку к настоящему времени разработаны многочисленные методы введения азидов и терминальных алкинов в эти макромолекулы.

За время подготовки данного обзора к печати в литературе появились новые сообщения о модификации ДНК с помощью реакции циклоприсоединения азидов и алкинов [315–324].

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davy E. // Ann. Pharm. 1837. V. 23. P. 144–146.

- Grieff P. // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 1864. V. 154. P. 733–755.
- Michael A. // J. Prakt. Chem. 1893. V. 48. P. 94–95.
- Huisgen R. // Angew. Chem. Int. Ed. 1963. V. 2. P. 565–598.
- Huisgen R. // Angew. Chem. Int. Ed. 1963. V. 2. P. 633–645.
- Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M. // J. Org. Chem. 2002. V. 67. P. 3057–3064.
- Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B. // Angew. Chem. Int. Ed. 2002. V. 41. P. 2596–2599.
- Himo F., Lovell T., Hilgraf R., Rostovtsev V.V., Noodleman L., Sharpless K.B., Fokin V.V. // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 210–216.
- Rodionov V.O., Fokin V.V., Finn M.G. // Angew. Chem. Int. Ed. 2005. V. 44. P. 2210–2215.
- Straub B.F. // Chem. Commun. 2007. P. 3868–3870.
- Ahlquist M., Fokin V.V. // Organometallics. 2007. V. 26. P. 4389–4390.
- Hein J.E., Tripp J.C., Krasnova L.B., Sharpless K.B., Fokin V.V. // Angew. Chem. Int. Ed. 2009. V. 48. P. 8018–8021.
- Wang Q., Chan T.R., Hilgraf R., Fokin V.V., Sharpless K.B., Finn M.G. // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 3192–3193.
- Chan T.R., Hilgraf R., Sharpless K.B., Fokin V.V. // Org. Lett. 2004. V. 6. P. 2853–2855.
- Lewis W.G., Magallon F.G., Fokin V.V., Finn M.G. // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126. P. 9152–9153.

16. Gupta S.S., Kuzelka J., Singh P., Lewis W.G., Manchester M., Finn M.G. // *Bioconjugate Chem.* 2005. V. 16. P. 1572–1579.
17. Rodionov V.O., Presolski S.I., Gardinier S., Lim Y.-H., Finn M.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 12696–12704.
18. Rodionov V.O., Presolski S.I., Diaz D.D., Fokin V.V., Finn M.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 12705–12712.
19. Baron A., Blériot Y., Sollogoub M., Vauzeilles B. // *Org. Biomol. Chem.* 2008. V. 6. P. 1898–1901.
20. Bergbreiter D.E., Hamilton P.N., Koshti N.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 10666–10667.
21. Candelon N., Lastécouères D., Diallo A.K., Aranzaes J.R., Astruc D., Vincent J.-M. // *Chem. Commun.* 2008. P. 741–743.
22. Акимова Г.С., Чистоклетов В.Н., Петров А.А. // *Журн. орг. химии.* 1965. Т. 1. С. 2077–2078.
23. Акимова Г.С., Чистоклетов В.Н., Петров А.А. // *Журн. орг. химии.* 1967. Т. 3. С. 968–974.
24. Акимова Г.С., Чистоклетов В.Н., Петров А.А. // *Журн. орг. химии.* 1967. Т. 3. С. 2241–2247.
25. Акимова Г.С., Чистоклетов В.Н., Петров А.А. // *Журн. орг. химии.* 1968. Т. 4. С. 389–394.
26. Krasinski A., Fokin V.V., Sharpless K.B. // *Org. Lett.* 2004. V. 6. P. 1237–1240.
27. Zhang L., Chen X., Xue P., Sun H.H.Y., Williams I.D., Sharpless K.B., Fokin V.V., Jia G. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 15998–15999.
28. Rasmussen L.K., Boren B.C., Fokin V.V. // *Org. Lett.* 2007. V. 9. P. 5337–5339.
29. Boren B.C., Narayan S., Rasmussen L.K., Zhang L., Zhao H., Lin Z., Jia G., Fokin V.V. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 8923–8930.
30. Kolb H.C., Sharpless K.B. // *Drug Discov. Today.* 2003. V. 8. P. 1128–1137.
31. Wang Q., Chittaboina S., Barnhill H.N. // *Lett. Org. Chem.* 2005. V. 2. P. 293–301.
32. Hawker C.J., Wooley K.L. // *Science.* 2005. V. 309. P. 1200–1205.
33. Binder W.H., Kluger C. // *Curr. Org. Chem.* 2006. V. 10. P. 1791–1815.
34. Bock V.D., Hiemstra H., van Maarseveen J.H. // *Eur. J. Org. Chem.* 2006. P. 51–68.
35. Santoyo-González F., Hernández-Mateo F. // *Top. Heterocycl. Chem.* 2007. V. 7. P. 133–177.
36. Wu P., Fokin V.V. // *Aldrichimica Acta.* 2007. V. 40. P. 7–17.
37. Jean-François L. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. V. 46. P. 1018–1025.
38. Wolfbeis O.S. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. V. 46. P. 2980–2982.
39. Fokin V.V. // *ACS Chemical Biology.* 2007. V. 2. P. 775–778.
40. Evans R.A. // *Aust. J. Chem.* 2007. V. 60. P. 384–395.
41. Nandivada H., Jiang X., Lahann J. // *Adv. Mater.* 2007. V. 19. P. 2197–2208.
42. Aprahamian I., Miljanić O.Š., Dichtel W.R., Isoda K., Yasuda T., Kato T., Stoddart J.F. // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2007. V. 80. P. 1856–1869.
43. Dondoni A. // *Chem. Asian J.* 2007. V. 2. P. 700–708.
44. Moses J.E., Moorhouse A.D. // *Chem. Soc. Rev.* 2007. V. 36. P. 1249–1262.
45. Fournier D., Hoogenboom R., Schubert U.S. // *Chem. Soc. Rev.* 2007. V. 36. P. 1369–1380.
46. Angell Y.L., Burgess K. // *Chem. Soc. Rev.* 2007. V. 36. P. 1674–1689.
47. Binder W.H., Sachsenhofer R. // *Macromol. Rapid Commun.* 2007. V. 28. P. 15–54.
48. Dedola S., Nepogodieva S.A., Field R.A. // *Org. Biomol. Chem.* 2007. V. 5. P. 1006–1017.
49. Gil M.V., Arévalo M.J., López Ó. // *Synthesis.* 2007. P. 1589–1620.
50. Dirks A.J., Cornelissen J.J.L.M., van Delft F.L., van Herst J.C.M., Nolte R.J.M., Rowan A.E., Rutjes F.P.J.T. // *QSAR Comb. Sci.* 2007. V. 26. P. 1200–1210.
51. Lutz J.-F., Zarafshani Z. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. V. 60. P. 958–970.
52. Meldal M., Tornøe C.W. // *Chem. Rev.* 2008. V. 108. P. 2952–3015.
53. Meldal M. // *Macromol. Rapid Commun.* 2008. V. 29. P. 1016–1051.
54. Johnson J.A., Finn M.G., Koberstein J.T., Turro N.J. // *Macromol. Rapid Commun.* 2008. V. 29. P. 1052–1072.
55. Droumaguet B.L., Velonia K. // *Macromol. Rapid Commun.* 2008. V. 29. P. 1073–1089.
56. Binder W.H., Sachsenhofer R. // *Macromol. Rapid Commun.* 2008. V. 29. P. 952–981.
57. Tron G.C., Pirali T., Billington R.A., Canonico P.L., Sorba G., Genazzani A.A. // *Med. Res. Rev.* 2008. V. 28. P. 278–308.
58. Lutz J.-F., Börner H.G. // *Prog. Polym. Sci.* 2008. V. 33. P. 1–39.
59. Hein C.D., Liu X.-M., Wang D. // *Pharm. Res.* 2008. V. 25. P. 2216–2230.
60. Bräse S., Friedrich A., Gartner M., Schröder T. // *Top. Heterocycl. Chem.* 2008. V. 12. P. 45–115.
61. Sletten E.M., Bertozzi C.R. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. V. 48. P. 6974–6998.
62. Best M.D. // *Biochemistry.* 2009. V. 48. P. 6571–6584.
63. van Dijk M., Rijkers D.T.S., Liskamp R.M.J., van Nostrum C.F., Hennink W.E. // *Bioconjugate Chem.* 2009. V. 20. P. 2001–2016.
64. Iha R.K., Wooley K.L., Nyström A.M., Burke D.J., Kade M.J., Hawker C.J. // *Chem. Rev.* 2009. V. 109. P. 5620–5686.
65. *Click Chemistry for Biotechnology and Material Science* / Ed. Lahann J. Chichester: Wiley, 2009.
66. *Schilling C., Jung N., Bräse S. // Organic Azides: Syntheses and Applications* / Eds S. Bräse, K. Banert. Chichester: Wiley, 2010. P. 269–284.

67. *Tornøe C.W., Meldal M.* // Organic Azides: Syntheses and Applications / Eds S. Bräse, K. Banert. Chichester: Wiley, 2010. P. 285–310.
68. *Sumerlin B.S., Vogt A.P.* // *Macromolecules*. 2010. V. 43. P. 1–13.
69. *Hermanson G.T.* *Bioconjugate Techniques*. 2<sup>nd</sup> Ed. San Diego: Acad. Press, 2008.
70. *Gramlich P.M.E., Wirges C.T., Manetto A., Carell T.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008. V. 47. P. 8350–8358.
71. *Amblard F., Cho J.H., Schinazi R.F.* // *Chem. Rev.* 2009. V. 109. P. 4207–4220.
72. *Seo T.S., Li Z., Ruparel H., Ju J.* // *J. Org. Chem.* 2003. V. 68. P. 609–612.
73. *Li Z., Seo T.S., Ju J.* // *Tetrahedron Lett.* 2004. V. 45. P. 3143–3146.
74. *Staudinger H., Meyer J.* // *Helv. Chim. Acta.* 1919. V. 2. P. 635–646.
75. *Gololobov Y.G., Zhmurova I.N., Kasukhin L.F.* // *Tetrahedron*. 1981. V. 37. P. 437–472.
76. *Meier C., Huynh-Dinha T.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1991. V. 1. P. 527–530.
77. *Jawalekar A.M., Meeuwenoord N., Cremers J.(S.)G.O., Overkleef H.S., van der Marel G.A., Rutjes F.P.J.T., van Delft F.L.* // *J. Org. Chem.* 2008. V. 73. P. 287–290.
78. *Polushin N.N., Smirnov I.P., Verentchikov A.N., Coull J.M.* // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 19. P. 3227–3230.
79. *El-Sagheer A., Brown T.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 3958–3964.
80. *Efimov V.A., Molchanova N.S., Chakhmakhcheva O.G.* // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2007. V. 26. P. 1087–1093.
81. *Efimov V.A., Aralov A.V., Fedunin S.V., Klykov V.N., Chakhmakhcheva O.G.* // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2009. V. 35. P. 250–253 (*Ефимов В.А., Аралов А.В., Федюнин С.В., Клыков В.Н., Чухмахчева О.Г.* // *Биоорганическая химия*. 2009. Т. 35. С. 270–273).
82. *Efimov V.A., Aralov A.V., Klykov V.N., Chakhmakhcheva O.G.* // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2009. V. 28. P. 846–865.
83. *Esipov D.S., Esipova O.V., Korobko V.G.* // *Nucleosides Nucleotides*. 1998. V. 17. P. 1697–1704.
84. *Ötvös L., Bajor Z., Kraicsovits F., Sági G., Tegyei S.* // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2002. V. 21. P. 79–92.
85. *Wada T., Mochizuki A., Higashiya S., Tsuruoka H., Kawahara S., Ishikawa M., Sekine M.* // *Tetrahedron Lett.* 2001. V. 42. P. 9215–9219.
86. *Kiviniemi A., Virta P., Lönnberg H.* // *Bioconjugate Chem.* 2008. V. 19. P. 1726–1734.
87. *Pourceau G., Meyer A., Vasseur J.-J., Morvan F.* // *J. Org. Chem.* 2009. V. 74. P. 6837–6842.
88. *Jentsch E., Mokhir A.* // *Inorg. Chem.* 2009. V. 48. P. 9593–9595.
89. *Shchepinov M.S., Stetsenko D.A.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997. V. 9. P. 1181–1184.
90. *Miller G.P., Kool E.T.* // *J. Org. Chem.* 2004. V. 69. P. 2404–2410.
91. *Miller G.P., Kool E.T.* // *Org. Lett.* 2002. V. 4. P. 3599–3601.
92. *Xu Y., Kool E.T.* // *Tetrahedron Lett.* 1997. V. 32. P. 5595–5598.
93. *Alvira M., Eritja R.* // *Chem. Biodiv.* 2007. V. 4. P. 2798–2809.
94. *Lietard J., Meyer A., Vasseur J.-J., Morvan F.* // *Tetrahedron Lett.* 2007. V. 48. P. 8795–8798.
95. *Lietard J., Meyer A., Vasseur J.-J., Morvan F.* // *J. Org. Chem.* 2008. V. 73. P. 191–200.
96. *Nakane M., Ichikawa S., Matsuda A.* // *J. Org. Chem.* 2008. V. 73. P. 1842–1851.
97. *Pourceau G., Meyer A., Vasseur J.-J., Morvan F.* // *J. Org. Chem.* 2009. V. 74. P. 1218–1222.
98. *Pourceau G., Meyer A., Vasseur J.-J., Morvan F.* // *Curr. Prot. Nucl. Acid Chem.* 2009. P. 4.38.1–4.38.25.
99. *Wu X., Pitsch S.* // *Bioconjugate Chem.* 1999. V. 10. P. 921–924.
100. *Wu X., Pitsch S.* // *Helv. Chim. Acta.* 2000. V. 83. P. 1127–1144.
101. *Grajkowski A., Cieslak J., Kauffman J.S., Duff R.J., Norris S., Freedberg D.I., Beaucage S.L.* // *Bioconjugate Chem.* 2008. V. 19. P. 1696–1706.
102. *Zhang J., Pourceau G., Meyer A., Vidal S., Praly J.-P., Souteyrand E., Vasseur J.-J., Morvan F., Chevolut Y.* // *Biosensors Bioelectronics*. 2009. V. 24. P. 2515–2521.
103. *Ouyang X., Shestopalov I.A., Sinha S., Zheng G., Pitt C.L.W., Li W.-H., Olson A.J., Chen J.K.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 13255–13269.
104. *Kanan M.W., Rozenman M.M., Sakurai K., Snyder T.M., Liu D.R.* // *Nature*. 2004. V. 431. P. 545–549.
105. *Kumar R., El-Sagheer A., Tumpene J., Lincoln P., Wilhelmsson L. M., Brown T.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 6859–6864.
106. *El-Sagheer A., Brown T.* // *Curr. Prot. Nucl. Acid Chem.* 2008. P. 4.33.1–4.33.21.
107. *El-Sagheer A.H., Kumar R., Findlow S., Werner J.M., Lane A.N., Brown T.* // *ChemBioChem*. 2008. V. 9. P. 50–52.
108. *Nordell P., Westerlund F., Reymar A., El-Sagheer A., Brown T., Nordén B., Lincoln P.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 14651–14658.
109. *Kočalka P., El-Sagheer A., Brown T.* // *ChemBioChem*. 2008. V. 9. P. 1280–1285.
110. *Rozenman M.M., Kanan M.W., Liu D.R.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 14933–14938.
111. *El-Sagheer A.H.* // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2009. V. 28. P. 315–323.
112. *Gorin D.J., Kamlet A.S., Liu D.R.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 9189–9191.
113. *Wang C.-Y., Seo T.S., Li Z., Ruparel H., Ju J.* // *Bioconjugate Chem.* 2003. V. 14. P. 697–701.
114. *Seo T.S., Bai X., Ruparel H., Li Z., Turro N.J., Ju J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 5488–5493.



115. *Seo T.S., Bai X., Kim D.H., Meng Q., Shi S., Ruparel H., Li Z., Turro N.J., Ju J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 5926–5931.
116. *Inkster J.A.H., Adam M.J., Storr T., Ruth T.J.* // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2009. V. 28. P. 1131–1143.
117. *Humenik M., Huang Y., Wang Y., Sprinzl M.* // ChemBioChem. 2007. V. 8. P. 1103–1106.
118. *Chen L., Rengifo H.R., Grigoras C., Li X., Li Z., Ju J., Koberstein J.T.* // Biomacromolecules. 2008. V. 9. P. 2345–2352.
119. *Xu Y., Suzuki Y., Komiyama M.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2009. V. 48. P. 3281–3284.
120. *Alemán E.A., Pedini H.S., Rueda D.* // ChemBioChem. 2009. V. 10. P. 2862–2866.
121. *Chao J., Huang W.-Y., Wang J., Xiao S.-J., Tang Y.-C., Liu J.-N.* // Biomacromolecules. 2009. V. 10. P. 877–883.
122. *Gartner Z.J., Grubina R., Calderone C.T., Liu D.R.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2003. V. 42. P. 1370–1375.
123. *Jacobsen M.F., Ravnsbæk J.B., Gothelf K.V.* // Org. Biomol. Chem. 2010. V. 8. P. 50–52.
124. *Gibson K.J., Benkovic S.E.* // Nucleic Acids Res. 1987. V. 15. P. 6455–6467.
125. *Podkowinski J., Gornicki P.* // Nucleic Acids Res. 1991. V. 19. P. 801–808.
126. *Muralikrishna P., Cooperman B.* // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 5421–5428.
127. *Capson T.L., Benkovic S.E., Nossal N.G.* // Cell. 1991. V. 65. P. 249–258.
128. *Добриков М.И., Зарытова В.Ф., Комарова Н.И., Левина А.С., Лохов С.А., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М.* // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 540–549.
129. *Mitchell P., Stade K., Oswald M., Brimacombe R.* // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. P. 887–896.
130. *Oh B.-K., Pacel N.R.* // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 4087–4094.
131. *Muralikrishna P., Cooperman B.S.* // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 1392–1398.
132. *Mullen M.A., Wang H., Wilcox K., Herman T.* // DNA Cell Biol. 1994. V. 13. P. 521–530.
133. *Казанцев А.В., Максакова Г.А., Федорова О.С.* // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 767–773.
134. *Годовикова Т.С., Березовский М.В., Кнорре Д.Г.* // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 858–867.
135. *Capson T.L., Benkovic S.J., Nossal N.G.* // Meth. Enzymol. 1995. V. 262. P. 449–456.
136. *Babaylova E., Graifer D., Malygin A., Stahl J., Shatsky I., Karpova G.* // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. P. 1141–1151.
137. *Towbin H., Elson D.* // Nucleic Acids Res. 1978. V. 5. P. 3389–3407.
138. *Dobrikov M.I., Gaidamakov S.A., Gainutdinov T.I., Koshkin A.A., Vlassov V.V.* // Antisense Nucl. Acids Drug Dev. 1997. V. 7. P. 309–317.
139. *Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Гайнутдинов Т.И., Иванова Т.М., Власов В.В.* // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 137–146.
140. *Dobrikov M.I., Gainutdinov T.I., Ivanova T.I., Vlassov V.V.* // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2000. V. 26. P. 553–558 (Добриков М.И., Гайнутдинов Т.И., Иванова Т.М., Власов В.В. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 617–622).
141. *Гайнутдинов Т.И., Шестова О.Е., Якубов Л.А., Добриков М.И., Власов В.В.* // Изв. АН. Сер. хим. Т. 51. № 7. С. 1108–1112.
142. *Duca M., Guianvarc’h D., Oussedik K., Halby L., Garbesi A., Dauzonne D., Monneret C., Osheroff N., Giovannangeli C., Arimondo P.B.* // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34. P. 1900–1911.
143. *Liu J., Fan Q.R., Sodeoka M., Lane W.S., Verdine G.L.* // Chem. Biol. 1994. V. 1. P. 47–55.
144. *Weisbrod S.H., Marx A.* // Chem. Commun. 2008. P. 5675–5685.
145. *Weisbrod S.H., Vaccaro A., Marx A.* // Nucleic Acids Symp. Ser. 2008. V. 52. P. 383–384.
146. *Vaccaro A., Weisbrod S.H., Marx A.* // Synthesis. 2007. P. 1949–1954.
147. *Gierlich J., Gutsmedl K., Gramlich P.M.E., Schmidt A., Burley G.A., Carell T.* // Chem. Eur. J. 2007. V. 13. P. 9486–9494.
148. *Prober J.M., Trainor G.L., Dam R.J., Hobbs F.W., Robertson C.W., Zagursky R.J., Cocuzza A.J., Jensen M.A., Baumeister K.* // Science. 2007. V. 238. P. 336–341.
149. *Confalone P.N.* // J. Heterocycl. Chem. 1990. V. 27. P. 31–46.
150. *Heidenreich O., Kruhoffer M., Grosse F., Eckstein F.* // Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. P. 621–625.
151. *Zavgorodny S., Polianski M., Besidsky E., Kriukov V., Sannin A., Pokrovskaya M., Gurskaya G., Lönnberg H., Azhaev A.* // Tetrahedron Lett. 1991. V. 32. P. 7593–7596.
152. *Zavgorodny S.G., Pechenov A.E., Shvets V.I., Miroshnikov A.I.* // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2000. V. 19. P. 1977–1991.
153. *Guo J., Xu N., Li Z., Zhang S., Wu J., Kim D.H., Marta M.S., Meng Q., Cao H., Li X., Shi S., Yu L., Kalachikov S., Russo J.J., Turro N.J., Ju J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 9145–9150.
154. *Bentley D.R., Balasubramanian S., Swerdlow H.P., Smith G.P., Milton J., Brown C.G., Hall K.P., Evers D.J., Barnes C.L., Bignell H.R. et al. (>100 co-authors)* // Nature. 2008. V. 456. P. 53–59.
155. *Milton J., Wu X., Smith M., Brennan J., Barnes C., Liu X., Ruediger S.* // Pat. WO/2004/018487.
156. *Milton J., Liu X.* // US Pat. 7,592,435. 2009.
157. *Comstock L.R., Rajski S.R.* // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. P. 1644–1652.
158. *Comstock L.R., Rajski S.R.* // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 14136–14137.
159. *Evans R.K., Johnson J.D., Haley B.E.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 83. P. 5382–5386.

160. *Evans R.K., Haley B.E.* // *Biochemistry*. 1987. V. 26. P. 269–276.
161. *Lee D.K., Evans R.K., Blanco J., Gottesfeld J., Johnson J.D.* // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 16478–16484.
162. *Woody A.-Y. M., Evans R.K., Woody W.W.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 150. P. 917–924.
163. *Meffert R., Dose K.* // *FEBS Lett.* 1988. V. 239. P. 190–194.
164. *Meffert R., Rathgeber G., Schäfer H.-J., Dose K.* // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 6633–6636.
165. *Ettner N., Haak U., Niederweis M., Hillen W.* // *Nucleosides Nucleotides*. 1993. V. 12. P. 757–771.
166. *Hanna M.M., Dissinger S., Williams B.D., Colston J.E.* // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 5814–5820.
167. *Dissinger S., Hanna M.M.* // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 219. P. 11–25.
168. *Hanna M.M., Zhang Y., Reidling J.C., Thomas M.J., Jou J.* // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. P. 2073–2079.
169. *Bartholomew B., Kassavetis G.A., Braun B.R., Geiduschek E.P.* // *EMBO J.* 1990. V. 9. P. 2197–2205.
170. *Bartholomew B., Tinker R.L., Kassavetis G.A., Geiduschek E.P.* // *Meth. Enzymol.* 1995. V. 262. P. 476–494.
171. *Wlassoff W.A., Dobrikov M.I., Safronov I.V., Dudko R.Y., Bogachev V.S., Kandaurova V.V., Shishkin G.V., Dymshits G.M., Lavrik O.I.* // *Bioconjugate Chem.* 1995. V. 6. P. 352–360.
172. *Lavrik O.I., Nasheuer H.-P., Weisshart K., Wold M.S., Prasad R., Beard W.A., Wilson S.H., Favre A.* // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 602–607.
173. *Kolpashchikov D.M., Alexandrova L.A., Zakirova N.F., Khodyreva S.N., Lavrik O.I.* // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2000. V. 26. P. 134–137 (*Колпащиков Д.М., Александрова Л.А., Закирова Н.Ф., Ходырева С.Н., Лаврик О.И.* // *Биоорганическая химия*. 2000. Т. 26. С. 151–155).
174. *Kolpashchikov D.M., Ivanova T.M., Boghachev V.S., Nasheuer H.-P., Weisshart K., Favre A., Pestryakov P.E., Lavrik O.I.* // *Bioconjugate Chem.* 2000. V. 11. P. 445–451.
175. *Сафронов И.В., Щербик Н.В., Ходырева С.Н., Власов В.А., Добриков М.И., Шишкин Г.В., Лаврик О.И.* // *Биоорганическая химия*. 1997. Т. 23. С. 576–585.
176. *Lavrik O.I., Prasad R., Sobol R.W., Horton J.K., Ackerman E.J., Wilson S.H.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 25541–25548.
177. *Drachkova I.A., Petruseva I.O., Safronov I.V., Zakharenko A.L., Shishkin G.V., Lavrik O.I., Khodyreva S.N.* // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2001. V. 27. P. 173–179 (*Драчкова И.А., Петрусева И.О., Сафронов И.В., Захаренко А.Л., Шишкин Г.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н.* // *Биоорганическая химия*. 2001. Т. 27. С. 197–204).
178. *Safronov I.V., Drachkova I.A., Petruseva I.O., Khodyreva S.N., Dobrikov M.I., Ivanova T.I., Shishkin G.V., Lavrik O.I.* // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2001. V. 27. P. 330–339 (*Сафронов И.В., Драчкова И.А., Петрусева И.О., Ходырева С.Н., Добриков М.И., Иванова Т.И., Шишкин Г.В., Лаврик О.И.* // *Биоорганическая химия*. 2001. Т. 27. С. 372–382).
179. *Dezhurov S.V., Grin I.R., Safronov I.V., Shishkin G.V., Lavrik O.I., Khodyreva S.N.* // *Russ. Chem. Bull.* 2005. V. 54. P. 1311–1321.
180. *Dezhurov S.V., Khodyreva S.N., Plekhanova E.S., Lavrik O.I.* // *Bioconjugate Chem.* 2005. V. 16. P. 215–222.
181. *Dyrkheeva N.S., Khodyreva S.N., Lavrik O.I.* // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2008. V. 34. P. 192–200 (*Дырхеева Н.С., Ходырева С.Н., Лаврик О.И.* // *Биоорганическая химия*. 2008. Т. 34. С. 210–219).
182. *Belousova E.A., Crespan E., Lebedeva N.A., Rechkunova N.J., Hübscher U., Maga G., Lavrik O.I.* // *Med. Chem.* 2008. V. 4. P. 155–162.
183. *Khlimankov D.Yu., Petruseva I.O., Rechkunova N.I., Belousova E.A., Kolpashchikov D.M., Khodyreva S.N., Lavrik O.I.* // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2001. V. 27. P. 180–183 (*Хлиманков Д.Ю., Петрусева И.О., Речкунова Н.И., Белоусова Е.А., Колпащиков Д.М., Ходырева С.Н., Лаврик О.И.* // *Биоорганическая химия*. 2001. Т. 27. С. 205–209).
184. *Dezhurov S.V., Khodyreva S.N., Rechkunova N.I., Kolpashchikov D.M., Lavrik O.I.* // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2003. V. 29. P. 66–72 (*Дежуров С.В., Ходырева С.Н., Речкунова Н.И., Колпащиков Д.М., Лаврик О.И.* // *Биоорганическая химия*. 2003. Т. 29. С. 75–82).
185. *Demeshkina N.A., Laletina E.S., Meschaninova M.I., Repkova M.N., Ven'yaminova A.G., Graifer D.M., Karpova G.G.* // *Molecular Biology*. 2003. V. 37. P. 132–139.
186. *Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., Dezhurov S.V., Degtyarev S.Kh., Lavrik O.I.* // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2004. V. 30. P. 332–336 (*Лебедева Н.А., Речкунова Н.И., Дежуров С.В., Дегтярев С.Х., Лаврик О.И.* // *Биоорганическая химия*. 2004. Т. 30. С. 369–374).
187. *Khodyreva S.N., Lavrik O.I.* // *Curr. Med. Chem.* 2005. V. 12. P. 641–655.
188. *Cañete S.J.P., Yang W., Lai R.Y.* // *Chem. Commun.* 2009. P. 4835–4837.
189. *Chung M., Lowe R.D., Chan Y.-H.M., Ganesan P.V., Boxer S.G.* // *J. Struct. Biol.* 2009. V. 168. P. 190–199.
190. *Erdem S.S., Nesterova I.V., Soper S.A., Hammer R.P.* // *J. Org. Chem.* 2009. V. 74. P. 9280–9286.
191. *Duckworth B.P., Chen Y., Wollack J.W., Sham Y., Mueller J.D., Taton T.A., Distefano M.D.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. V. 46. P. 8819–8822.
192. *Singh I., Vyle J.S., Heaney F.* // *Chem. Commun.* 2009. P. 3276–3278.
193. *Morvan F., Meyer A., Pourceau G., Vidal S., Chevolut Y., Souteyrand E., Vasseur J.-J.* // *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2008. V. 52. P. 47–48.
194. *Rozkiewicz D.I., Gierlich J., Burley G.A., Gutmiedl K., Carell T., Ravoo B.J., Reinhoudt D.N.* // *ChemBioChem*. 2007. V. 8. P. 1997–2002.

195. Gramlich P. M. E., Warncke S., Gierlich J., Carell T. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008. V. 47. P. 3442–3444.
196. Berndl S., Herzig N., Kele P., Lachmann D., Li X., Wolfbeis O. S., Wagenknecht H.-A. // *Bioconjugate Chem.* 2009. V. 20. P. 558–564.
197. Ustinov A.V., Dubnyakova V.V., Korshun V.A. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2007. V. 26. P. 751–754.
198. Ustinov A.V., Dubnyakova V.V., Korshun V.A. // *Tetrahedron.* 2008. V. 64. P. 1467–1473.
199. Pourceau G., Meyer A., Vasseur J.J., Morvan F. // *J. Org. Chem.* 2008. V. 73. P. 6014–6017.
200. Morvan F., Meyer A., Jochum A., Sabin C., Chevolut Y., Imberty A., Praly J.-P., Vasseur J.-J., Souteyrand E., Vidal S. // *Bioconjugate Chem.* 2007. V. 18. P. 1637–1643.
201. Dioubankova N.N., Malakhov A.D., Stetsenko D.A., Gait M.J., Korshun V.A. // *Tetrahedron.* 2006. V. 62. P. 6762–6773.
202. Nakahara M., Kuboyama T., Izawa A., Hari Y., Imanishi T., Obika S. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009. V. 19. P. 3316–3319.
203. Moni L., Pourceau G., Zhang J., Meyer A., Vidal S., Souteyrand E., Dondoni A., Morvan F., Chevolut Y., Vasseur J.-J., Marra A. // *ChemBioChem.* 2009. V. 10. P. 1369–1378.
204. Kvach M.V., Prokhorenko I.A., Ustinov A.V., Gontarev S.V., Korshun V.A., Shmanai V.V. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2007. V. 26. P. 809–813.
205. Устинов А.В., Коршун В.А. // *Известия АН. Сер. хим.* 2006. № 6. С. 1220–1226.
206. Géci I., Filichev V.V., Pedersen E.B. // *Bioconjugate Chem.* 2006. V. 17. P. 950–957.
207. Géci I., Filichev V.V., Pedersen E.B. // *Chem. Eur. J.* 2007. V. 13. P. 6379–6386.
208. Grötli M., Douglas M., Beijer B., García R.G., Eritja R., Sproat B. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1.* 1997. P. 2779–2788.
209. Grötli M., Douglas M., Eritja R., Sproat B. // *Tetrahedron.* 1998. V. 54. P. 5899–5914.
210. Korshun V.A., Stetsenko D.A., Gait M.J. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1.* 2002. P. 1092–1104.
211. Korshun V.A., Stetsenko D.A., Gait M.J. // *Current Prot. Nucleic Acids Chem.* 2003. P. 4.21.1–4.21.25.
212. Buff R., Hunziker J. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998. V. 8. P. 521–524.
213. Buff R., Hunziker J. // *Synlett.* 1999. P. 905–908.
214. Buff R., Hunziker J. // *Nucleosides Nucleotides.* 1999. V. 18. P. 1387–1388.
215. Buff R., Hunziker J. // *Helv. Chim. Acta.* 2002. V. 85. P. 224–254.
216. Nadler A., Diederichsen U. // *Eur. J. Org. Chem.* 2008. P. 1544–1549.
217. Hrdlicka P.J., Kumar T.S., Wengel J. // *Eur. J. Org. Chem.* 2005. P. 5184–5188.
218. Gogoi K., Mane M.V., Kunte S.S., Kumar V.A. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. e139.
219. Graham D., Parkinson J.A., Brown T. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1.* 1998. P. 1131–1138.
220. Gierlich J., Burley G.A., Gramlich P.M.E., Hammond D.M., Carell T. // *Org. Lett.* 2006. V. 8. P. 3639–3642.
221. Gorodetsky A.A., Green O., Yavin E., Barton J.K. // *Bioconjugate Chem.* 2007. V. 18. P. 1434–1441.
222. Seela F., Sirivolu V.R. // *Chem. Biodiv.* 2006. V. 3. P. 509–514.
223. Seela F., Sirivolu V.R. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2007. V. 26. P. 597–601.
224. Seela F., Sirivolu V.R. // *Helv. Chim. Acta.* 2007. V. 90. P. 535–552.
225. Seela F., Sirivolu V.R., Chittepu P. // *Bioconjugate Chem.* 2008. V. 19. P. 211–224.
226. Hammond D.M., Manetto A., Gierlich J., Azov V.A., Gramlich P.M.E., Burley G.A., Maul M., Carell T. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. V. 46. P. 4184–4187.
227. Seela F., Ingale S.A. // *J. Org. Chem.* 2010. V. 75. P. 284–295.
228. Seela F., Ming X. // *Helv. Chim. Acta.* 2008. V. 91. P. 1181–1200.
229. Ming X., Leonard P., Heindl D., Seela F. // *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2008. V. 52. P. 471–472.
230. Seela F., Xiong H., Leonard P., Budow S. // *Org. Biomol. Chem.* 2009. V. 7. P. 1374–1387.
231. Ami T., Fujimoto K. // *ChemBioChem.* 2008. V. 9. P. 2071–2074.
232. Ami T., Yoshimura Y., Matsuzaki T., Fujimoto K. // *J. Photopolym. Sci. Technol.* 2009. V. 22. P. 262–272.
233. Sirivolu V. R., Chittepu P., Seela F. // *ChemBioChem.* 2008. V. 9. P. 2305–2316.
234. Freier S.M., Altmann K.-H. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4429–4443.
235. Skorobogaty M.V., Malakhov A.D., Pchelintseva A.A., Turban A.A., Bondarev S.L., Korshun V.A. // *ChemBioChem.* 2006. V. 7. P. 810–816.
236. Seela F., Sirivolu V.R. // *Org. Biomol. Chem.* 2008. V. 6. P. 1674–1687.
237. Woo J., Meyer R.B., Gamper H.B. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 2470–2475.
238. Meyer A., Bouillon C., Vidal S., Vasseura J.-J., Morvan F. // *Tetrahedron Lett.* 2006. V. 47. P. 8867–8871.
239. Bouillon C., Meyer A., Vidal S., Jochum A., Chevolut Y., Cloarec J.-P., Praly J.-P., Vasseur J.J., Morvan F. // *J. Org. Chem.* 2006. V. 71. P. 4700–4702.
240. Chevolut Y., Bouillon C., Vidal S., Morvan F., Meyer A., Cloarec J.-P., Jochum A., Praly J.-P., Vasseur J.-J., Souteyrand E. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. V. 46. P. 2398–2402.
241. Devaraj N.K., Miller G.P., Ebina W., Kakaradov B., Collman J.P., Kool E.T., Chidsey C.E.D. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 8600–8601.
242. Filichev V.V., Pedersen E.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 14849–14858.

243. Hong V., Presolski S.I., Ma C., Finn M.G. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. V. 48. P. 9879–9883.
244. Ju J., Kim D.H., Bi L., Meng Q., Bai X., Li Z., Li X., Marma M.S., Shi S., Wu J., Edwards J.R., Romu A., Turro N.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 19635–19640.
245. Perman J., Sharma R.A., Bobek M. // *Tetrahedron Lett.* 1976. P. 2427–2430.
246. Коршун В.А., Манасова Е.В., Берлин Ю.А. // *Биоорганич. химия.* 1997. Т. 23. С. 324–387.
247. Biala E., Jones A.S., Walker R.T. // *Tetrahedron.* 1980. V. 36. P. 155–158.
248. Ötvös L., Szécsi J., Sági J., Kovács T. // *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1987. V. 18. P. 125–129.
249. Kovács T., Ötvös L. // *Tetrahedron Lett.* 1988. V. 29. P. 4525–4528.
250. Dolbeare F. // *Histochem. J.* 1995. V. 27. P. 339–369.
251. Dolbeare F. // *Histochem. J.* 1996. V. 28. P. 531–575.
252. Taupin P. // *Brain Res. Rev.* 2007. V. 53. P. 198–214.
253. Dolbeare F. // *Histochem. J.* 1995. V. 27. P. 923–964.
254. Salic A., Mitchison T.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 2415–2420.
255. Buck S.B., Bradford J., Gee K.R., Agnew B.J., Clarke S.T., Salic A. // *BioTechniques.* 2008. V. 44. P. 927–929.
256. Cappella P., Gasparri F., Pulici M., Moll J. // *Current Prot. Cytometry.* 2008. P. 7.34.1–7.34.13.
257. Cappella P., Gasparri F., Pulici M., Moll J. // *Cytometry Part A.* 2008. V. 73A. P. 626–636.
258. Burley G.A., Gierlich J., Mofid M.R., Nir H., Tal S., Eichen Y., Carell T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 1398–1399.
259. Chehrehasa F., Meedeniya A.C.B., Dwyer P., Abrahamson G., Mackay-Sim A. // *J. Neurosci. Meth.* 2009. V. 177. P. 122–130.
260. Klein R.M., Aplin A.E. // *Cancer Res.* 2009. V. 69. P. 2224–2233.
261. Scheef E.A., Sorenson C.M., Sheibani N. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008. V. 296. P. C724–C734.
262. Szafran A.T., Szwarc M., Marcelli M., Mancini M.A. // *PLoS One.* 2008. V. 3. e3605.
263. Bonaguidi M.A., Peng C.-Y., McGuire T., Falciglia G., Gobeske K.T., Czeisler C., Kessler J.A. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. P. 9194–9204.
264. Hitomi M., Yang K., Stacey A.W., Stacey D.W. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. P. 5478–5493.
265. Jensen U.B., Yan X., Triel C., Woo S.-H., Christensen R., Owens D.M. // *J. Cell Sci.* 2008. V. 121. P. 609–617.
266. Huang Q., Sheibani N. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008. V. 295. P. C1647–C1657.
267. Walters K.-A., Syder A.J., Lederer S.L., Diamond D.L., Paepfer B., Rice C.M., Katze M.G. // *PLoS One.* 2009. V. 5. e1000269.
268. Oberst M.D., Beberman S.J., Zhao L., Yin J.J., Ward Y., Kelly K. // *BMC Cancer.* 2008. V. 8. P. 189.
269. Diermeier-Daucher S., Clarke S.T., Hill D., Vollmann-Zwerenz A., Bradford J.A., Brockhoff G. // *Cytometry Part A.* 2009. V. 75A. P. 535–546.
270. Hamelik R.M., Krishan A. // *Cytometry Part A.* 2009. V. 75A. P. 862–865.
271. Yu Y., Arora A., Min W., Roifman C.M., Grunebaum E. // *J. Immunol. Methods.* 2009. V. 350. P. 29–35.
272. Kaiser C.L., Kamien A.J., Shah P.A., Chapman B.J., Cotanche D.A. // *The Laryngoscope.* 2009. V. 119. P. 1770–1775.
273. Ferullo D.J., Cooper D.L., Moore H.R., Lovett S.T. // *Methods.* 2009. V. 489. P. 8–13.
274. Aparicio T., Guillou E., Coloma J., Montoyaand G., Méndez J. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 2087–2095.
275. Vidal-Cardenas S.L., Greider C.W. // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. P. 284–295.
276. Warren M., Puskarczyk K., Chapman S.C. // *Dev. Dynam.* 2009. V. 238. P. 944–949.
277. Limsirichaikul S., Niimi A., Fawcett H., Lehmann A., Yamashita S., Ogi T. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. e31.
278. Jao C.Y., Salic A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 15779–15784.
279. Gramlich P.M.E., Wirges C.T., Gierlich J., Carell T. // *Org. Lett.* 2008. V. 10. P. 249–251.
280. Macíčková-Cahová H., Hocek M. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. P. 7612–7622.
281. Fischler M., Sologubenko A., Mayer J., Clever G., Burley G., Gierlich J., Carell T., Simon U. // *Chem. Commun.* 2008. P. 169–171.
282. Wirges C.T., Gramlich P.M.E., Gutmiedl K., Gierlich J., Burley G.A., Carell T. // *QSAR Comb. Sci.* 2007. V. 26. P. 1159–1164.
283. Fischler M., Simon U., Nir H., Eichen Y., Burley G.A., Gierlich J., Gramlich P.M.E., Carell T. // *Small.* 2007. V. 3. P. 1049–1055.
284. Lin N., Yan J., Huang Z., Altier C., Li M., Carrasco N., Suyemoto M., Johnston L., Wang S., Wang Q., Fang H., Caton-Williams J., Wang B. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 1222–1229.
285. Weller R.L., Rajski S.R. // *Org. Lett.* 2005. V. 7. P. 2141–2144.
286. Punna S., Kuzelka J., Wang Q., Finn M.G. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005. V. 44. P. 2215–2220.
287. Burrows C.J., Muller J.G. // *Chem. Rev.* 1998. V. 98. P. 1109–1151.
288. Zatsepin T.S., Oretskaya T.S. // *Chem. Biodiv.* 2004. P. 1401–1417.
289. von Matt P., Lochmann T., Altmann K.-H. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997. V. 7. P. 1549–1552.
290. Lazrek H.B., Engels J.W., Pfeleiderer W. // *Nucleosides Nucleotides.* 1998. V. 17. P. 1851–1856.
291. O'Mahony G., Ehrman E., Grötli M. // *Tetrahedron Lett.* 2005. V. 46. P. 6745–6748.
292. Jin P.-Y., Jin P., Ruan Y.-A., Ju Y., Zhao Y.-F. // *Synlett.* 2007. P. 3003–3006.

293. Malkoch M., Schleicher K., Drockenmuller E., Hawker C.J., Russell T.P., Wu P., Fokin V.V. // *Macromolecules*. 2007. V. 38. P. 3663–3678.
294. Plietzsch O., Schilling C.I., Tolev M., Nieger M., Richert C., Muller T., Bräse S. // *Org. Biomol. Chem.* 2009. V. 7. P. 4734–4743.
295. Nuzzi A., Massi A., Dondoni A. // *QSAR Comb. Sci.* 2007. V. 26. P. 1191–1199.
296. Fujino T., Marine G., Nakamura E., Isobe H. // *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2007. V. 51. P. 267–268.
297. Isobe H., Fujino T., Yamazaki N., Guillot-Nieckowski M., Nakamura E. // *Org. Lett.* 2008. V. 10. P. 3729–3732.
298. Fujino T., Yamazaki N., Isobe H. // *Tetrahedron Lett.* 2009. V. 50. P. 4101–4103.
299. Lucas R., Neto V., Bouazza A.H., Zerrouki R., Granet R., Krausz P., Champavier Y. // *Tetrahedron Lett.* 2008. V. 49. P. 1004–1007.
300. Lucas R., Zerrouki R., Granet R., Krausz P., Champavier Y. // *Tetrahedron*. 2008. V. 64. P. 5467–5471.
301. Blomquist A.T., Liu L.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1953. V. 75. P. 2153–2154.
302. Wittig G., Krebs A. // *Chem. Ber.* 1961. V. 94. P. 3260–3275.
303. Agard N.J., Prescher J.A., Bertozzi C.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 15046–15047.
304. Agard N.J., Baskin J.M., Prescher J.A., Lo A., Bertozzi C.R. // *ACS Chem. Biol.* 2006. V. 1. P. 644–648.
305. Baskin J.M., Prescher J.A., Laughlin S.T., Agard N.J., Chang P.V., Miller I.A., Lo A., Codelli J.A., Bertozzi C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 16793–16797.
306. Codelli J.A., Baskin J.M., Agard N.J., Bertozzi C.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 11486–11493.
307. Neef A.B., Schultz C. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. V. 48. P. 1498–1500.
308. Sletten E.M., Bertozzi C.R. // *Org. Lett.* 2008. V. 10. P. 3097–3099.
309. Ning X., Guo J., Wolfert M.A., Boons G.-J. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008. V. 47. P. 2253–2255.
310. Poloukhine A.A., Mbua N.E., Wolfert M.A., Boons G.-J., Popik V.V. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 15769–15776.
311. Fernández-Suárez M., Baruah H., Martínez-Hernández L., Xie K.T., Baskin J.M., Bertozzi C.R., Ting A.Y. // *Nature Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 1483–1487.
312. Laughlin S.T., Bertozzi C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 12–17.
313. Laughlin S.T., Baskin J.M., Amacher S.L., Bertozzi C.R. // *Science*. 2008. V. 320. P. 664–667.
314. Gartner Z.J., Bertozzi C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 4606–4610.
315. Lin G., Huang Y.-C., Shindel A.W., Banie L., Wang G., Lue T.F., Lin C.-S. // *Cytherapy*. 2009. V. 11. P. 864–873.
316. Ande S.R., Moulik S., Mishra S. // *PLoS One*. 2009. V. 4. e4586.
317. Guo J., Yu L., Turro N., Ju J. // *Acc. Chem. Res.* 2010. V. 43. P. 551–563.
318. Karskela M., Helkear M., Virta P., Lönnberg H. // *Bioconjugate Chem.* 2010. V. 21. P. 748–755.
319. Yamaguchi K., Sakai M., Shimokawa T., Yamada Y., Nakamura Y., Furukawa Y. // *Br. J. Cancer*. 2010. V. 102. P. 325–331.
320. Beyer C., Wagenknecht H.-A. // *Chem. Commun.* 2010. V. 46. P. 2230–2231.
321. Cutler J.I., Zheng D., Xu X., Giljohann D.A., Mirkin C.A. // *Nano Lett.* 2010. V. 10. P. 1477–1480.
322. Voigt N.V., Tørring T., Rotaru A., Jacobsen M.F., Ravnsbæk J.B., Subramani R., Mamdouh W., Kjems J., Mokhir A., Besenbacher F., Gothelf K.V. // *Nature Nanotechnol.* 2010. V. 5. P. 200–203.
323. Jewett J.C., Bertozzi C.R. // *Chem. Soc. Rev.* 2010. V. 39. P. 1272–1279.
324. El-Sagheer A.H., Brown T. // *Chem. Soc. Rev.* 2010. V. 39. P. 1388–1405.

## Modification of Nucleic Acids Using [3+2] Dipolar Cycloaddition of Azides and Alkynes

A. V. Ustinov\*, I. A. Stepanova\*, V. V. Dubnyakova\*, T. S. Zatsepin\*\*,\*\*\*,  
E. V. Nozhevnikova\*, V. A. Korshun\*\*

#Phone/fax: +7 (495) 429-87-10; e-mail: korshun@ibch.ru

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow

\*\*\* Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

The use of the reaction of azide and alkyne cycloaddition for the synthesis of nucleic acid conjugates and DNA oligomer analogues is considered. The data on chemical and enzymatic techniques of azides and alkynes introduction into DNA are summarized.

Key words: azides, alkynes, cycloaddition, nucleic acids, oligonucleotides, modification