

АРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ
ORGANIC CHEMISTRY

УДК 665.123

Поступила в редакцию 31.03.2017
Received 31.03.2017

М. А. Фомич¹, А. В. Бекиш², О. Л. Шарко¹, К. Н. Прохоревич³, В. В. Шманай¹

¹*Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

³*Военная академия Республики Беларусь, Минск, Беларусь*

**СИНТЕЗ КОНЬЮГАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
С ПРОИЗВОДНЫМИ 11,11-D₂-ЛИНОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ
ПО РЕАКЦИИ АЗИД-АЛКИНОВОГО ЦИКЛОПРИСОЕДИНЕНИЯ**

Аннотация. Предложен новый подход к синтезу конъюгатов олигонуклеотидов и жирных кислот, основанный на медь-катализируемой реакции циклоприсоединения азидсодержащих олигонуклеотидов к производным жирных кислот с терминальной тройной связью (CuAAC). Для демонстрации этого подхода осуществлен синтез пяти производных 11,11-D₂-линолевой кислоты, содержащих концевую тройную связь в различных частях молекулы. Разработана методика их конъюгации с азидсодержащим модельным олигонуклеотидом T₂₀, проверено влияние различных условий (времени, концентрации катализатора, избытка алкинсодержащего реагента, состава растворителя и др.) на выход продукта. Такие конъюгаты устойчивы в биологических средах, обладают повышенной способностью проникать в клетки и могут найти применение в качестве средств генной терапии.

Ключевые слова: полиненасыщенные жирные кислоты, олигонуклеотиды, биоконъюгаты, клик-химия

Для цитирования. Синтез конъюгатов олигонуклеотидов с производными 11,11-D₂-линолевой кислоты по реакции азид-алкинового циклоприсоединения / М. А. Фомич [и др.] // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2018. – Т. 54. – № 1. – С. 46–57.

M. A. Fomich¹, A. V. Bekish², O. L. Sharko¹, K. N. Prokhorevich³, V. V. Shmanai¹

¹*Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

²*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

³*Belarusian Military Academy, Minsk, Belarus*

**SYNTHESIS OF CONJUGATES OF OLIGONUCLEOTIDES AND 11,11-D₂-LINOLEIC
ACID DERIVATIVES VIA AZIDE-ALKYNE CYCLOADDITION**

Abstract. A new approach to the synthesis of oligonucleotide-fatty acid conjugates is reported. It is based on Cu-catalyzed reaction between azide oligonucleotides and fatty acid derivatives with terminal triple bond (CuAAC). To demonstrate this approach, five derivatives of 11,11-D₂-linoleic acid containing terminal alkyne group at different parts of the molecule were synthesized. A method of conjugation of alkyne 11,11-D₂-linoleic acid with azide oligonucleotide T₂₀ is developed, and the conditions (time, concentration of Cu catalyst, excess of alkyne reagent, composition of the solvent, etc.) are optimized. These conjugates are stable in biological media, have increased permeability through the cell membranes and can be used in gene therapy.

Keywords: polyunsaturated fatty acids, oligonucleotides, bioconjugates, click chemistry

For citation. Fomich M. A., Bekish A. V., Sharko O. L., Prokhorevich K. N., Shmanai V. V. Synthesis of conjugates of oligonucleotides and 11,11-D₂-linoleic acid derivatives via azide-alkyne cycloaddition. *Vestsi Natsyianal'nai akademii nauk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk=Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical series*, 2018, vol. 54, no. 1, pp. 46–57 (In Russian).

Введение. Перспективной областью биомедицины является терапевтическое использование олигонуклеотидов для подавления экспрессии тех белков, блокирование которых обычными способами – действием низкомолекулярных препаратов или белковых лекарств – затруднено. Известным примером такого применения является доставка антисмысловых олигонуклеотидов,

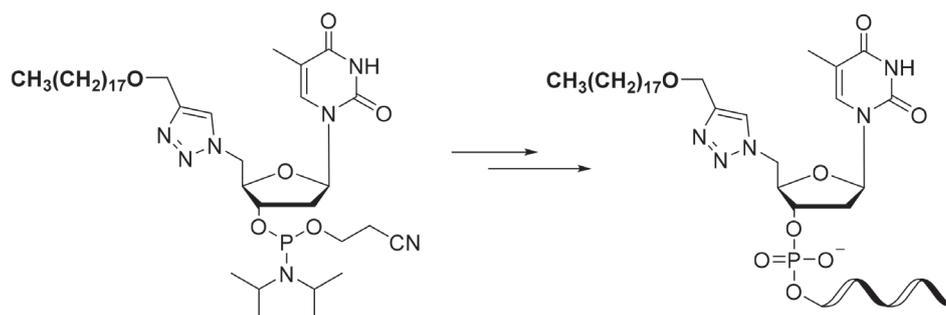


Рис. 1. Использование CuAAC для получения конъюгатов липидов с олигонуклеотидами [28]

Fig. 1. Using CuAAC to produce conjugates of lipids with oligonucleotides

селективно ингибирующих экспрессию целевых генов за счет специфичной гибридизации с мРНК или ДНК, а также нокдаун гена при помощи малых интерферирующих РНК [1–3].

Существенным препятствием для создания препаратов на основе олигонуклеотидов является то, что они практически не проникают в клетки из-за большого размера, отрицательного заряда и низкой устойчивости. Для доставки нуклеиновых кислот в клетки разработаны вирусные векторы [4, 5], а также невирусные системы: липосомы, наночастицы, мицеллы и полиплексы [6–9]. Недостатком первых является иммуногенность, а для невирусных систем доставки была обнаружена цитотоксичность [10].

Альтернативой этим подходам является конъюгация олигонуклеотидов с липидами (фосфолипидами, жирными и желчными кислотами, холестерином и жирорастворимыми витаминами), поскольку она позволяет увеличить время жизни олигонуклеотидов в плазме, улучшить их проникновение в клетки, а также повысить эффективность подавления экспрессии генов *in vivo* [11]. Обычно олигонуклеотиды конъюгируют с липидами по 3'- и 5'-положениям [12, 13], причем связывание с липидом осуществляется в ходе автоматического синтеза через тиоэфирную [14], дисульфидную, фосфатную [15] или амидофосфатную [16, 17] связь. Так, для синтеза конъюгатов, связанных через 3'-положение олигонуклеотида, предложены несколько твердофазных носителей, предварительно модифицированных липидами [18–24], а конъюгаты через 5'-положение обычно получают при помощи различных амидофосфитных и Н-фосфонатных реагентов, содержащих фрагмент липида [22, 24–27]. Один из подходов заключается в том, что в заготовку для амидофосфитного реагента по реакции азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC) заранее вводится остаток липида, после чего реагент используется в автоматическом синтезе олигонуклеотида (рис. 1) [28].

В данной работе мы предлагаем улучшенный подход, основанный на реакции CuAAC. Он отличается тем, что вначале при помощи ранее разработанных реагентов [29] мы вводим азидную группу в 3'- или 5'-положение олигонуклеотида, а лишь затем полученный олигонуклеотид с азидной группой конъюгируем с алкин-содержащим липидом. Преимущества этого подхода состоят в большей универсальности. Например, в нашем подходе для синтеза библиотеки конъюгатов требуется олигонуклеотид с азидной группой и набор липидных молекул с алкиновой группой. В предыдущем же подходе для автоматического синтеза каждый липидный остаток нужно сначала ввести в нуклеозид, затем последний превратить в малоустойчивый амидофосфитный реагент. Кроме того, некоторые функциональные группы (сложные эфиры, алкены и др.) несовместимы с условиями автоматического олигосинтеза. В качестве липидного компонента мы использовали 11,11-D₂-линолевую кислоту, которая является изотопно-усиленным аналогом природной полиненасыщенной кислоты и отличается большей устойчивостью к реакциям липидного окисления [30].

Экспериментальная часть

Материалы и оборудование. Коммерчески доступные реактивы использовались без дополнительной очистки. Гексин-5-ол-1 получали восстановлением этил-5-гексаноата алюмогидридом лития. Соединение **12** синтезировали по описанной методике [31]. Диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид (ДМСО), триэтиламин и хлористый метилен перегоняли над СаН₂,

этилацетат (EtOAc) перегоняли над P_2O_5 , тетрагидрофуран (ТГФ) и диэтиловый эфир сушили и перегоняли над $LiAlH_4$, ацетон сушили хлоридом кальция, гексан и петролейный эфир 40/70 (ПЭ) перегоняли без осушки. 1H (500 МГц) и ^{13}C (126 МГц) спектры ЯМР были получены на приборе Bruker DRX-500 и отнесены к остаточным сигналам дейтерохлороформа (7,26 и 77,16 м. д. соответственно). Масс-спектры получены на масс-спектрометре с ионной ловушкой LCQ Fleet («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США). Аналитическую тонкослойную хроматографию выполняли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Колоночная хроматография проводилась на силикагеле Merck Kieselgel 60 (0,063–0,200 мм). Для анализа и очистки олигонуклеотидов методом ВЭЖХ использовали колонку Agilent Eclipse Plus C18 (3,5 мкм, 4,6×100 мм) в системе растворителей: CH_3CN (А) и 0,1 М $Et_3NH^+OAc^- + 5\% CH_3CN$ (В). Градиент элюции: 100 % А в течение 1 мин, затем 0→80 % В в течение 40 мин.

1-(Триизопропилсилилокси)пентин-4 (2). Реакцию проводили по опубликованной методике [32]. К раствору пентин-4-ола-1 (1) (5,00 г, 59,5 ммоль) в ДМФА (200 мл) добавили имидазол (6,07 г, 89,3 ммоль) и триизопропилхлорсилан (14,0 мл, 65,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч, добавили нас. $NaHCO_3$ (100 мл), а после окончания выделения газов – воду (100 мл). Смесь проэкстрагировали ПЭ (3×70 мл), органические фазы объединили и упарили. Остаток хроматографировали на силикагеле (50 мл) в системе этилацетат – ПЭ (1:50), получили продукт в виде бесцветной жидкости массой 14,31 г (98 %).

1H ЯМР ($CDCl_3$, 500 МГц) δ 3,77 (т, $J = 6,0$ Гц, 2H), 2,31 (тд, $J = 7,1, 2,6$ Гц, 2H), 1,93 (т, $J = 2,6$ Гц, 1H), 1,75 (м, 2H), 1,06–1,05 (м, 2H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 126 МГц) δ 84,56, 68,30, 61,85, 31,92, 18,16, 15,04, 12,12. ТСХ: R_f 0,75 (20 % EtOAc/ПЭ).

1,1-D₂-6-(Триизопропилсилилокси)гексин-2-ол-1 (3). К раствору $EtMgBr$ в ТГФ (50 мл), приготовленному в безводных условиях из $EtBr$ (5,23 мл, 70,0 ммоль) и магниевых стружек (1,68 г, 70,0 ммоль), в течение 15 мин по каплям прибавляли 1-(триизопропилсилилокси)-4-пентин (2) (14,0 г, 58,2 ммоль), после чего реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин при комнатной температуре и при 50 °С в течение часа. Затем смесь охладили до комнатной температуры в инертной атмосфере, внесли дейтеропараформ (CD_2O)_n (2,24 г, 70,0 ммоль в пересчете на формальдегид) и кипятили в течение 1,5 ч. Полученный раствор охладили, добавили нас. NH_4Cl до полного растворения осадка (400 мл) и экстрагировали смесью диэтиловый эфир–ПЭ (1:1, 2×100 мл). Объединенные органические фракции упаривали, остаток хроматографировали в 0→10 % EtOAc/ПЭ, получили продукт в виде желтоватой жидкости массой 10,30 г (65 %).

1H ЯМР ($CDCl_3$, 500 МГц) δ 3,75 (т, $J = 6,0$ Гц, 2H), 2,33 (т, $J = 7,2$ Гц, 2H), 1,73 (квint, $J = 6,7$ Гц, 2H), 1,60 (с, 1H), 1,07–1,04 (м, 2H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 126 МГц) δ 86,38, 78,44, 61,95, 31,98, 18,14, 15,34, 12,11. ТСХ: R_f 0,15 (10 % EtOAc/ПЭ).

1,1-D₂-6-(Триизопропилсилилокси)гексин-2-ил-1-метансульфонат (4). К раствору спирта 3 (10,0 г, 36,7 ммоль) и триэтиламина (6,38 мл, 45,9 ммоль) в диэтиловом эфире (100 мл) по каплям при охлаждении до 0 °С добавляли раствор мезилхлорида (3,12 мл, 40,4 ммоль) в диэтиловом эфире (10 мл). Смесь отогрели до комнатной температуры и перемешивали в течение 30 мин, добавили воду (50 мл) и ПЭ (50 мл). Органический слой отделили, а водный экстрагировали смесью ПЭ и Et_2O (1:1, 3×30 мл). Объединенные органические слои промыли нас. $NaCl$ (10 мл), упарили, остаток отфильтровали через слой силикагеля (30 мл), промыли смесью EtOAc и ПЭ (1:5). Фильтрат упарили и получили мезилат (4) в виде желтоватой жидкости массой 12,73 г (99 %).

1H ЯМР ($CDCl_3$, 500 МГц) δ 3,75 (т, $J = 6,0$ Гц, 2H), 3,11 (с, 3H), 2,38 (т, $J = 7,2$ Гц, 2H), 1,74 (квint, $J = 6,7$ Гц, 2H), 1,60 (с, 1H), 1,07–1,04 (м, 2H). ТСХ: R_f 0,20 (10 % EtOAc/ПЭ).

Этиловый эфир 11,11-D₂-16-(триизопропилсилилокси)гексадекадин-9,12-овой кислоты (5). К ДМФА (80 мл) добавили безводные CuI (13,95 г, 73,0 ммоль), NaI (16,44 г, 110 ммоль) и K_2CO_3 (15,12 г, 110 ммоль), затем одной порцией внесли этил-9-дециноат (7,23 г, 36,5 ммоль), после чего добавили мезилат 4 (12,80 г, 36,5 ммоль). Затем к смеси добавили еще 40 мл ДМФА и перемешивали в течение 24 ч с хлоркальциевой трубкой. Реакционную смесь обработали нас. NH_4Cl (60 мл), затем добавили нас. $NaCl$ (60 мл) и смесь ПЭ и EtOAc (5:1, 60 мл). Смесь перемешивали в течение 15 мин, затем отфильтровали через мелкопористый стеклянный фильтр,

несколько раз промыли осадок смесью ПЭ и EtOAc. Органический слой фильтрата отделили, водный слой промыли смесью ПЭ и EtOAc (5:1, 100 мл). Объединенные органические фракции объединили и упарили. Остаток хроматографировали на силикагеле (300 мл) в системе 0→4 % EtOAc/ПЭ (с шагом 2 %), получили продукт в виде бесцветного масла массой 13,77 г (84 %). Согласно данным ЯМР, продукт содержал примесь 10 мол. % этил-9-дециноата.

^1H ЯМР (CDCl_3 , 500 МГц) δ 4,11 (кварт, $J = 7,2$ Гц, 2H), 3,74 (т, $J = 6,1$ Гц, 2H), 2,29–2,24 (т+т, $J = 7,2$ Гц, 4H), 2,13 (т, $J = 7,1$ Гц, 2H), 1,70 (м, 2H), 1,68–1,57 (м, 2H), 1,50–1,44 (м, 2H), 1,38–1,28 (м, 6H), 1,24 (т, $J = 7,1$ Гц, 3H), 1,07–1,04 (м, 18H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3 , 126 МГц) δ 173,95, 80,48, 80,21, 74,66, 74,53, 62,07, 60,28, 34,46, 32,09, 29,13, 28,90, 28,80, 25,05, 18,82, 18,13, 15,33, 14,38, 12,11. ТСХ: R_f 0,25 (5 % EtOAc/ПЭ).

Этиловый эфир (9Z,12Z)-11,11-D₂-16-(триизопропилсилилокси)гексадекадиен-9,12-овой кислоты (6). Суспензию тетрагидрата ацетата никеля(II) (3,15 г, 12,7 ммоль) в этаноле (96 %, 40 мл) нагревали при перемешивании до 60 °С до полного растворения соли, колбу продули водородом и в течение 20 мин прикапывали раствор NaBH_4 (0,55 г, 14,5 ммоль) в этаноле (13 мл). Через 15 мин к реакционной смеси добавили этилендиамин (70 %, 3,9 мл) и раствор эфира **5** (11,43 г, 25,4 ммоль) в этаноле (20 мл). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере водорода (1 атм) до прекращения его поглощения (около 2 ч). К реакционной смеси добавили последовательно гексан (90 мл), уксусную кислоту (5,5 мл) и воду (1,5 мл), затем добавили еще 40 мл гексана и отделили органический слой. Водный слой экстрагировали смесью EtOAc/ПЭ (1:5, 4×100 мл). Объединенные органические слои промыли 1 М серной кислотой (100 мл), нас. NaHCO_3 (100 мл), нас. NaCl (100 мл) и высушили над безводным Na_2SO_4 . Растворитель удаляли при пониженном давлении. Очистку сырого продукта проводили на силикагеле с нанесенным нитратом серебра. Для этого силикагель (100 г) смешали с раствором нитрата серебра (40 г) в сухом ацетонитриле (250 мл). Растворитель удалили на роторном испарителе, силикагель сушили в вакууме в течение 4 ч при 80 °С до его легкого потемнения. Продукт хроматографировали на полученном сорбенте в 5 % Et₂O/ПЭ. Получили продукт в виде бесцветного масла массой 4,83 г (42 %).

^1H ЯМР (CDCl_3 , 500 МГц) δ 5,42–5,31 (м, 4H), 4,12 (кварт, $J = 7,1$ Гц, 2H), 3,68 (т, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,28 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H), 2,14 (кварт, $J = 7,1$ Гц, 2H), 2,04 (кварт, $J = 6,9$ Гц, 2H), 1,60 (м, 4H), 1,30 (м, 8H), 1,25 (т, $J = 7,1$ Гц, 3H), 1,07–1,04 (м, 18H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3 , 126 МГц) δ 174,01, 130,27, 129,74, 128,43, 128,00, 62,98, 60,29, 34,53, 33,12, 29,75, 29,34, 29,26, 27,34, 25,12, 23,74, 18,18, 14,40, 12,16. ТСХ: R_f 0,50 (10 % EtOAc/ПЭ).

Этиловый эфир (9Z,12Z)-11,11-D₂-16-гидроксигексадекадиен-9,12-овой кислоты (7). Эфир **6** (4,80 г) смешали с этанолом (80 мл), добавили воду (4 мл) и конц. H_2SO_4 (0,4 мл). Реакционную смесь кипятили в течение 40 мин, затем добавили триэтиламин (3 мл), упарили, разбавили ПЭ (150 мл) и снова упарили. Остаток хроматографировали на силикагеле (130 мл) в системе 0, 10, 20 % EtOAc/ПЭ, получили бесцветное масло массой 2,48 г (79 %).

^1H ЯМР (CDCl_3 , 500 МГц) δ 5,41–5,29 (м, 4H), 4,11 (кварт, $J = 7,1$ Гц, 2H), 3,64 (т, $J = 6,5$ Гц, 2H), 2,27 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H), 2,14 (кварт, $J = 7,1$ Гц, 2H), 2,03 (кварт, $J = 7,0$ Гц, 2H), 1,61 (м, 5H), 1,29 (м, 8H), 1,24 (т, $J = 7,1$ Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (CDCl_3 , 126 МГц) δ 174,09, 130,41, 129,33, 128,82, 127,79, 62,60, 60,32, 34,49, 32,63, 29,65, 29,24, 29,20, 29,17, 27,31, 25,07, 23,71, 14,37. ТСХ: R_f 0,10 (10 % EtOAc/ПЭ).

Этиловый эфир (9Z,12Z)-11,11-D₂-16-мезилоксигексадекадиен-9,12-овой кислоты (8). К раствору эфира **7** (2,40 г, 8,04 ммоль) в диэтиловом эфире (35 мл), содержащем триэтиламин (2,8 мл, 20,1 ммоль), при охлаждении (баня со льдом) и постоянном перемешивании добавляли мезилхлорид (1,11 г, 9,65 ммоль) в диэтиловом эфире (5 мл) в течение 10 мин. Реакционную смесь отогрели до комнатной температуры, перемешивали 30 мин, после чего добавили воду (30 мл). Органический слой отделили, водный проэкстрагировали эфиром (2×30 мл). Органические фракции упарили, остаток отфильтровали через слой силикагеля (10 мл, ПЭ/EtOAc 5:1). Упаривание дало продукт в виде бесцветного масла, который использовали в следующей стадии без очистки. Выход 2,92 г (97 %). ТСХ: R_f 0,15 (10 % EtOAc/ПЭ).

Этиловый эфир (9Z,12Z)-11,11-D₂-16-подгексадекадиен-9,12-овой кислоты (9). Мезилат **8** (2,92 г, 7,75 ммоль) растворили в ацетоне (30 мл) и прибавили иодид натрия (4,07 г, 27,1 ммоль) и небольшое количество гидрохинона. Реакционную смесь кипятили в инертной атмосфере в течение часа (ТСХ). К реакционной смеси прибавили воду (50 мл) и ПЭ (25 мл). Органический

слой отделили, из водного проводили дополнительную экстракцию ПЭ (3×15 мл). Объединенные органические слои упарили на роторном испарителе, остаток пропустили через небольшой слой силикагеля (10 мл, элюент: ПЭ – этилацетат 25:1). После удаления растворителя при пониженном давлении получили 3,08 г (97 %) продукта в виде бесцветного масла.

¹H ЯМР (CDCl₃, 500 МГц) δ 5,41–5,29 (м, 4H), 4,11 (кварт, *J* = 7,1 Гц, 2H), 3,19 (т, *J* = 6,9 Гц, 2H), 2,28 (т, *J* = 7,5 Гц, 2H), 2,14 (кварт, *J* = 7,1 Гц, 2H), 2,05 (кварт, *J* = 7,1 Гц, 2H), 1,88 (квинт, *J* = 7,0 Гц, 2H) 1,61 (м, 2H), 1,30 (м, 8H), 1,25 (т, *J* = 7,1 Гц, 3H). ¹³C ЯМР (CDCl₃, 126 МГц) δ 173,99, 130,54, 129,87, 127,69, 127,64, 60,28, 34,51, 33,42, 29,70, 29,30, 29,24, 28,09, 27,39, 25,10, 14,41, 6,71. ТСХ: *R_f* 0,72 (20 % EtOAc/ПЭ).

(9Z,12Z)-11,11-D₂-16-Иодгексадекадиен-9,12-овая кислота (10). Эфир **9** (3,04 г, 7,44 ммоль) растворили в 15 мл этанола и прибавили раствор КОН (2,00 г) в воде (3 мл). Реакционную смесь нагревали до 40–50 °С при перемешивании. После гомогенизации нагревание прекратили и выдержали 10 мин при комнатной температуре (контроль по ТСХ). К реакционной смеси добавили смесь воды (30 мл) и конц. H₂SO₄ (1,0 мл). Продукт экстрагировали смесью ПЭ и диэтилового эфира (1:1, 3×30 мл). Объединенные органические фракции промыли нас. NaCl (5 мл). Растворитель удалили при пониженном давлении, а остаток пропустили через небольшой слой силикагеля (20 мл, элюент: ПЭ, EtOAc 2:1). После удаления растворителя получили 2,73 г (96 %) продукта в виде бесцветного масла.

¹H ЯМР (CDCl₃, 500 МГц) δ 5,42–5,30 (м, 4H), 3,20 (т, *J* = 6,9 Гц, 2H), 2,35 (т, *J* = 7,5 Гц, 2H), 2,18 (кварт, *J* = 7,1 Гц, 2H), 2,05 (кварт, *J* = 7,1 Гц, 2H), 1,89 (квинт, *J* = 7,0 Гц, 2H) 1,63 (квинт, *J* = 7,2 Гц, 2H), 1,32 (м, 8H). ¹³C ЯМР (CDCl₃, 126 МГц) δ 180,24, 130,52, 129,87, 127,70 (2C), 34,19, 33,43, 29,71, 29,29, 29,22, 29,16, 28,11, 27,39, 24,80, 6,74. ТСХ: *R_f* 0,22 (20 % EtOAc/ПЭ).

(9Z,12Z)-11,11-D₂-Октадекадиен-9,12-ин-17-овая кислота (11). Суспензию ацетиленида лития (комплекс с этилендиамином) (1,89 г, 18,5 ммоль) в ДМСО (18 мл) перемешивали 5 мин при 30 °С, затем смесь охладили до 12–15 °С и по каплям вносили раствор кислоты **10** (1,95 г, 5,13 ммоль) в ДМСО (18 мл) в течение 2–3 мин. Перемешивали смесь при 30 °С в течение 15 мин. Добавили раствор уксусной кислоты (0,68 г, 11,3 ммоль) в ДМСО (3 мл) по каплям. Через минуту добавили 0,57 мл *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамина для удаления субстрата и перемешивали в течение 15 мин. Для обработки использовали раствор уксусной кислоты (3,70 г) в воде (80 мл). Продукт экстрагировали смесью Et₂O/ПЭ 1:1 (5×40 мл). Объединенные органические слои промыли разбавленной серной кислотой (0,1 М, 60 мл), водой (2×60 мл). После упаривания остаток хроматографировали на 30 мл силикагеля (EtOAc/ПЭ, 5, 10, 15 %), получили продукт массой 0,740 г (52 %) в виде бесцветного масла.

ТСХ: *R_f* 0,22 (20 % EtOAc/ПЭ).

N-Пропаргиламид 11,11-D₂-линолевой кислоты (13). 11,11-D₂-Линолевою кислоту (**12**) (141 мг, 0,50 ммоль) растворили в хлористом метиле (5 мл), добавили при перемешивании 4-(диметиламино)пиридин (73 мг, 0,60 ммоль) и дисукцинимидилкарбонат (154 мг, 0,60 ммоль) и перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре, после чего добавили пропаргиламин (33 мг, 0,60 ммоль) и перемешивали еще 1 ч. Реакционную смесь промыли водой, 1 М H₂SO₄, NaHCO₃ (нас.), NaCl (нас.) (по 5 мл) и высушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель упарили, остаток хроматографировали на силикагеле в 20 % EtOAc/ПЭ. Выход 147 мг (92 % от теор.), бесцветное масло, затвердевающее при –20 °С.

¹H ЯМР (CDCl₃, 500 МГц) δ 5,71 (с, 1H), 5,35 (м, 4H), 4,04 (дд, *J* = 5,3, 2,6 Гц, 2H), 2,22 (т, *J* = 2,6 Гц, 1H), 2,18 (т, *J* = 7,6 Гц, 2H), 2,03 (м, 4H), 1,63 (квинт, *J* = 7,4 Гц, 2H), 1,38–1,25 (м, 14H), 0,89 (т, *J* = 6,8 Гц, 3H). ¹³C ЯМР (CDCl₃, 126 МГц) δ 172,85, 130,38, 130,18, 128,06, 127,91, 79,78, 71,65, 36,58, 31,65, 29,73, 29,48, 29,35, 29,26, 29,25, 27,33, 25,67, 22,70, 14,21. ТСХ: *R_f* 0,50 (30 % EtOAc/ПЭ).

Хлорангидрид 11,11-D₂-линолевой кислоты (14). В 50 мл колбу внесли 11,11-D₂-линолевою кислоту (**12**) (4,00 г, 14,2 ммоль) и оксалилхлорид (3,2 мл, 29,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 дней, затем нагревали на водяной бане в вакууме водоструйного насоса в течение 30 мин, после чего разбавили ПЭ (100 мл), трижды промыли холодной водой, профильтровали через колонку с безводным Na₂SO₄, упарили и высушили в вакууме, получили продукт в виде желтоватой жидкости (4,24 г, 99 %).

^1H ЯМР (CDCl_3 , 500 МГц) δ 5,42–5,30 (м, 4Н), 2,88 (т, $J = 7,3$ Гц, 2Н), 2,05 (м, 4Н), 1,71 (м, 2Н), 1,38–1,27 (м, 14Н), 0,89 (т, $J = 6,9$ Гц, 3Н). ^{13}C ЯМР (CDCl_3 , 126 МГц) δ 173,95, 130,41, 130,07, 128,19, 127,89, 47,23, 31,67, 29,65, 29,49, 29,09, 28,53, 27,35, 27,27, 25,17, 22,72, 14,21.

Сложные эфиры 11,11- D_2 -линолевой кислоты (15–17). Хлорангидрид 11,11- D_2 -линолевой кислоты (**14**) (150 мг, 0,50 ммоль) растворяли в хлористом метиле (5 мл), охлаждали до 0 °С, добавляли соответствующий спирт (1,00 ммоль) и прикапывали триэтиламин (84 мкл, 0,60 ммоль) при перемешивании. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, растворитель упаривали, остаток наносили на силикагель в ПЭ и хроматографировали в 5 % $\text{EtOAc}/\text{ПЭ}$, получали продукт в виде бесцветного масла.

Пропаргиловый эфир 11,11- D_2 -линолевой кислоты (15). Выход 125 мг (78 % от теор.). ^1H ЯМР (CDCl_3 , 500 МГц) δ 5,35 (м, 4Н), 4,67 (д, $J = 2,5$ Гц, 2Н), 2,46 (т, $J = 2,5$ Гц, 1Н), 2,35 (т, $J = 7,5$ Гц, 2Н), 2,04 (м, 4Н), 1,63 (квинт, $J = 7,4$ Гц, 2Н), 1,38–1,25 (м, 14Н), 0,89 (т, $J = 6,8$ Гц, 3Н). ^{13}C ЯМР (CDCl_3 , 126 МГц) δ 173,08, 130,38, 130,19, 128,09, 127,93, 77,94, 74,83, 51,89, 34,13, 31,67, 29,72, 29,50, 29,26, 29,22, 29,17, 27,34, 24,94, 22,72, 14,22. ТСХ: R_f 0,50 (10 % $\text{EtOAc}/\text{ПЭ}$).

Гомопропаргиловый эфир 11,11- D_2 -линолевой кислоты (16). Выход 140 мг (84 % от теор.). ^1H ЯМР (CDCl_3 , 500 МГц) δ 5,35 (м, 4Н), 4,18 (т, $J = 6,8$ Гц, 2Н), 2,52 (тд, $J = 6,8$, 2,7 Гц, 2Н), 2,32 (т, $J = 7,5$ Гц, 2Н), 2,04 (м, 4Н), 1,99 (т, $J = 2,7$ Гц, 1Н), 1,62 (квинт, $J = 7,4$ Гц, 2Н), 1,38–1,25 (м, 14Н), 0,89 (т, $J = 6,8$ Гц, 3Н). ^{13}C ЯМР (CDCl_3 , 126 МГц) δ 173,70, 130,38, 130,19, 128,09, 127,93, 80,25, 69,94, 62,04, 34,32, 31,67, 29,75, 29,50, 29,30, 29,25, 29,22, 27,35, 25,06, 22,72, 14,22. ТСХ: R_f 0,50 (10 % $\text{EtOAc}/\text{ПЭ}$).

Гексин-5-иловый эфир 11,11- D_2 -линолевой кислоты (17). Выход 172 мг (95 % от теор.). ^1H ЯМР (CDCl_3 , 500 МГц) δ 5,36 (м, 4Н), 4,09 (т, $J = 6,7$ Гц, 2Н), 2,29 (т, $J = 7,5$ Гц, 2Н), 2,23 (тд, $J = 7,0$, 2,7 Гц, 2Н), 2,04 (м, 4Н), 1,95 (т, $J = 2,7$ Гц, 1Н), 1,75 (м, 2Н), 1,60 (м, 4Н), 1,38–1,25 (м, 14Н), 0,89 (т, $J = 6,8$ Гц, 3Н). ^{13}C ЯМР (CDCl_3 , 126 МГц) δ 174,02, 130,38, 130,21, 128,08, 127,94, 84,00, 68,82, 63,83, 34,48, 31,67, 29,75, 29,50, 29,32, 29,27, 27,86, 27,35, 25,12, 22,72, 18,23, 14,22. ТСХ: R_f 0,50 (10 % $\text{EtOAc}/\text{ПЭ}$).

Получение конъюгатов ON2-ON5. В пробирке смешали олигонуклеотид **ON1** (0,7 о. е., 4 нмоль) в воде (72 мкл), 2 М триэтиламмонийацетатный буфер (20 мкл, pH 7,5), ДМСО (80 мкл) и 10 мМ раствор липида **11** или **13** в ДМСО (1 мкл, 10 нмоль). В отдельной пробирке смешали 10 мМ сульфат меди (10 мкл), 10 мМ трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин (ТНРТА) (11 мкл) и 10 мМ аскорбат натрия (10 мкл) и добавили к реакционной смеси, после чего тщательно продули ее аргоном и оставили на ночь. К смеси добавили 0,5 М раствора перхлората лития (50 мкл) и ацетон до 1,5 мл. Смесь охлаждали при –20 °С в течение 30 мин, отцентрифугировали, жидкость декантировали, остаток промывали ацетоном и высушили. К олигонуклеотиду добавили 1 мл воды и измерили поглощение, которое составило от 0,6 до 0,7 о. е. (выход > 85 %). Чистоту определяли, анализируя половину каждого образца (0,3–0,35 о. е.) методом ВЭЖХ. Для достижения максимального выхода в случае липидов **15–17** использовали 5 мкл их 10 мМ растворов в ДМСО, а количество CuSO_4 , ТНРТА и аскорбата натрия увеличивали в три раза.

ON1. Масс-спектр: расч. 6313 кДа, набл. 6310 кДа.

ON2. Масс-спектр: расч. 6590 кДа, набл. 6589 кДа.

ON3. Масс-спектр: расч. 6631 кДа, набл. 6628 кДа.

Результаты и их обсуждение

Синтез олигонуклеотида с азидной группой. Для модификации олигонуклеотида производными 11,11- D_2 -линолевой кислоты по реакции CuAAC необходимо предварительно ввести в молекулы азидную и алкиновую группу. Задача введения азидных групп в олигонуклеотид решена нами ранее [29]. В данной работе мы использовали 20-мерный олигонуклеотид T_{20} с азидной группой в 3'-положении (**ON1**).

Синтез липидов с алкиновой группой. Алкиновая группа вводилась в жирную кислоту несколькими способами с целью получения конъюгатов с различными свойствами: между атомами C17 и C18 или через карбоксильную группу путем образования амида либо сложного эфира.

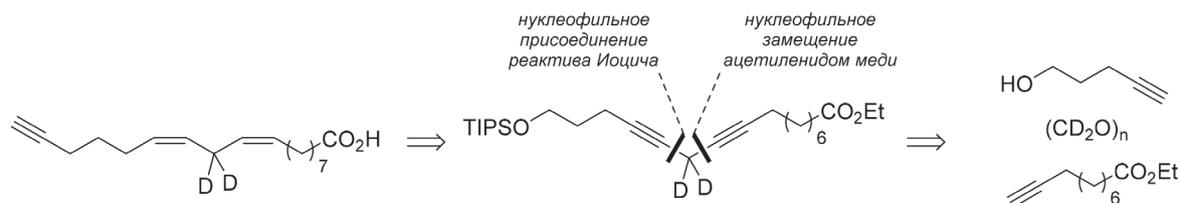


Рис. 2. Полиацетиленовый подход в синтезе производного 11,11-D₂-линолевой кислоты с терминальной тройной связью
 Fig. 2. Polyacetylene approach in the synthesis of 11,11-D₂-linoleic acid derivative with a terminal alkyne group

Производное 11,11-D₂-линолевой кислоты, содержащее терминальную тройную связь, было синтезировано через полиацетиленовый подход, заключающийся в синтезе 1,4-диеновой кислоты через 1,4-диеновый предшественник (рис. 2).

В качестве заготовки для жирного фрагмента кислоты служил пентин-4-ол-1 (**1**), гидроксильную группу которого защищали триизопропилсилильным (TIPS) остатком, превращали в магниевый ацетиленид (реактив Иоцича) и вводили в реакцию с дейтеропараформом (CD₂O)_n (рис. 3). В полученном спирте гидроксильную группу превращали в мезилатную и замещали этил-9-дециноатом в виде ацетиленида меди(I). Далее диеновый фрагмент в соединении **5** восстанавливали до диена водородом в присутствии Ni-P2, получая продукт **6** (диастереомерная чистота 88 %) с примесью *транс*-изомерных аналогов и продуктов избыточного гидрирования.

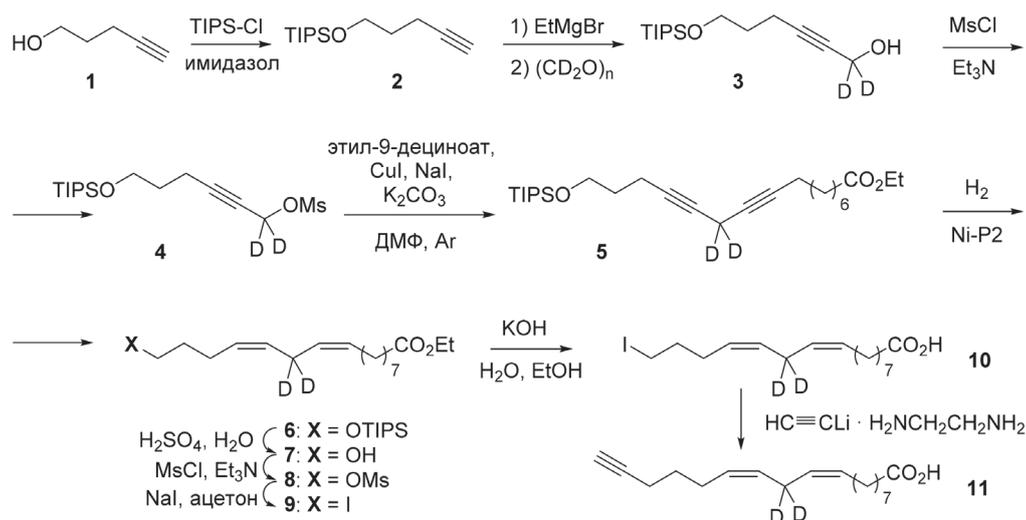


Рис. 3. Схема синтеза производного 11,11-D₂-линолевой кислоты с терминальной тройной связью
 Fig. 3. Synthesis of 11,11-D₂-linoleic acid derivative with a terminal alkyne group

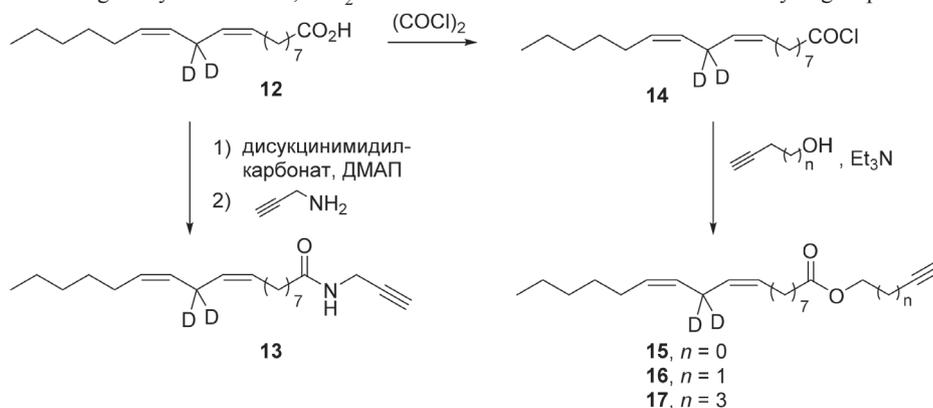


Рис. 4. Схема синтеза производных 11,11-D₂-линолевой кислоты по карбоксильной группе
 Fig. 4. Synthesis of 11,11-D₂-linoleic acid derivatives by the carboxyl group

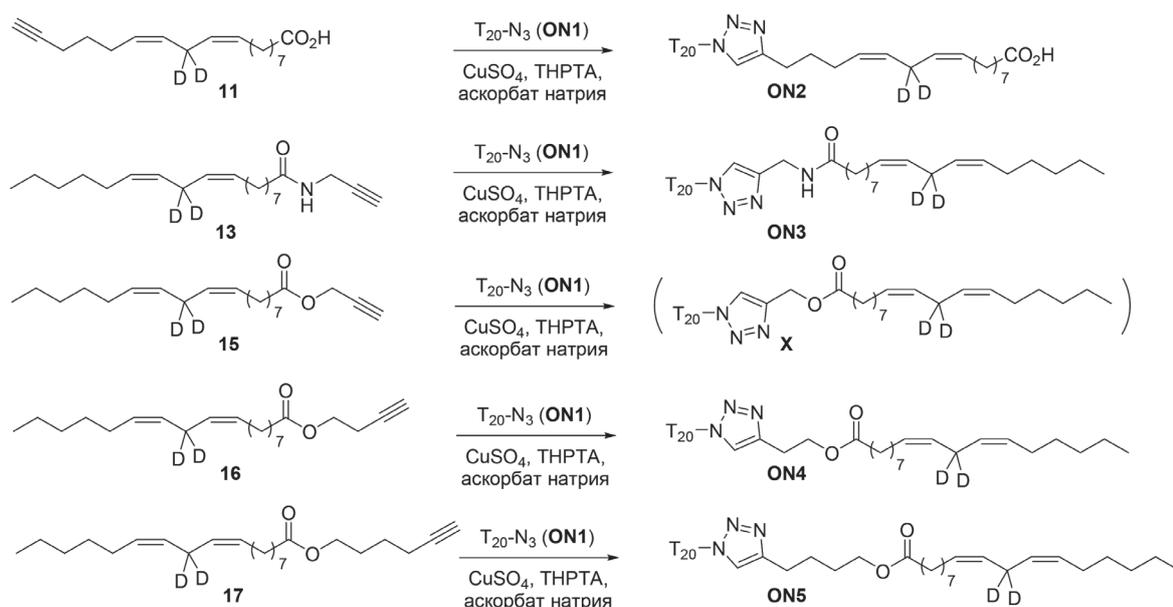


Рис. 5. Схема синтеза олигонуклеотидных конъюгатов

Fig. 5. Synthesis of oligonucleotide conjugates

Очистка на силикагеле, импрегнированном нитратом серебра, позволила выделить эфир **6** с чистотой 99 % (ГЖХ) и выходом 42 %. Затем в ходе ряда превращений защищенную гидроксильную группу превращали в иодид, который после гидролиза сложноэфирной группы замещали ацетиленидом лития для введения терминальной тройной связи.

N-Пропаргиламид 11,11- D_2 -линолевой кислоты (**13**) получали активацией кислоты дисукцинимидилкарбонатом и последующей обработкой пропаргиламином (рис. 4). Сложные эфиры (пропаргиловый, гомопротаргиловый и гексин-5-иловый) получали через хлорангидрид **14**, вводя его в реакцию с соответствующими спиртами в присутствии триэтиламина.

Оптимизация синтеза конъюгатов. Алкинсодержащие липиды **11**, **13**, **15**–**17** использовали для получения конъюгатов с олигонуклеотидом **ON1** (рис. 5). Оптимизацию условий проводили, вводя в реакцию 4 нмоль **ON1** с двухкратным избытком алкина **11** в смеси ДМСО–вода в присутствии 0,5 мМ Cu^+ в течение 16 ч. Полученный продукт высаждали ацетоном, анализировали и очищали методом ВЭЖХ.

В указанных условиях выход составлял 92 % (таблица, № 1). В отсутствие катализатора или при уменьшении его концентрации в 10 раз реакция не протекала вовсе (№ 2 и 3). Увеличение его концентрации в 2 раза также отрицательно влияло на выход, снижая его до 82 % (№ 4). Увеличение концентрации липида **11** существенно не влияло на выход (№ 5), зато повышение концентрации аскорбата, которое мы предпринимали для предотвращения потенциально возможной потери активности катализатора в связи с его возможным окислением до $Cu(II)$, напротив, привело к снижению выхода до 80 % (№ 6). Отсутствие в реакции THPTA, к нашему удивлению, не помешало протеканию реакции (№ 7). Вероятно, это связано с достаточно эффективным дегазированием реакционной смеси аргоном, вследствие чего катализатор не окисляется даже без лиганда. Также выяснилось, что содержание ДМСО в реакционной смеси не влияет на выход (№ 8–10): даже в его отсутствие реакция протекает с высоким выходом. Это позволяет выделять целевой олигонуклеотид не только высаживанием, но и гель-фильтрацией, не опасаясь попадания ДМСО в конечный продукт. Время между смешиванием реагентов и добавлением ацетона для высаживания продукта можно уменьшить с 16 ч до 15 мин: при этом соотношение **ON2** к **ON1**, по данным ВЭЖХ, составляет 98:2. Однако, поскольку выделение продукта в таком случае занимает гораздо большее время, чем проведение реакции, получить надежные данные о влиянии времени реакции не удалось, особенно в отсутствие гарантии, что вместе с олигонуклеотидом частично не осаждаются соединения меди.

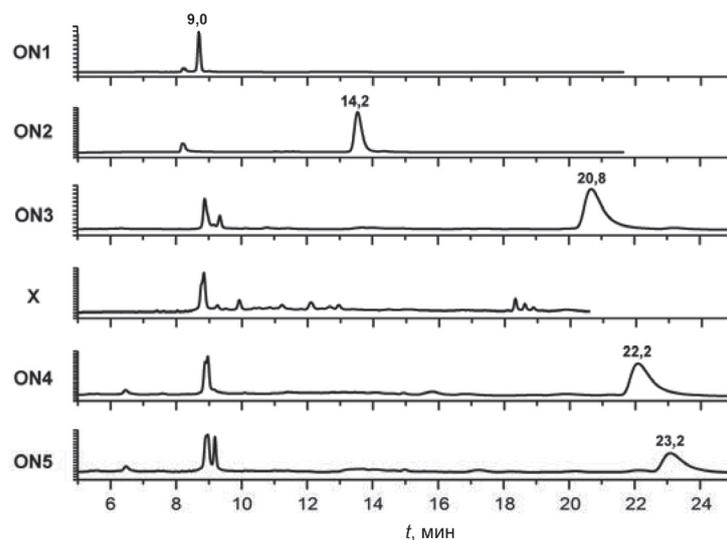


Рис. 6. Хроматограммы полученных конъюгатов

Fig. 6. Chromatograms of the obtained conjugates

Оптимизация условий конъюгирования Optimization of conjugation conditions

Номер образца	C(Cu ²⁺), мМ	C(ТНРТА), мМ	C(аск. Na), мМ	ДМСО, об. %	Экв. 11	Выход ON2, %
1	0,5	0,55	0,5	40	2	92
2	0	0	0	40	2	0
3	0,05	0,055	0,05	40	2	0
4	1,0	1,1	1,0	40	2	82
5	0,5	0,55	0,5	40	10	90
6	0,5	0,55	2,5	40	2	80
7	0,5	0	0,5	40	2	96
8	0,5	0,55	0,5	20	2	95
9	0,5	0,55	0,5	10	2	94
10	0,5	0,55	0,5	0	2	94

Получение конъюгатов ON2-ON5. Конъюгат **ON2** был получен и очищен ВЭЖХ, как было описано выше. Применение тех же условий к реакции **ON1** и пропаргиламида **13** дало конъюгат **ON3** с выходом 84 %. Однако пропаргиловый эфир 11,11-D₂-линолевой кислоты **15** в тех же условиях дал не ожидаемый конъюгат, а смесь многих продуктов (рис. 6, X). Мы предположили, что ацильный остаток – до или после циклоприсоединения пропаргилового эфира и азидной группы – смещается на нуклеофильные атомы азота тимидина, чему, вероятно, способствует координация катионов меди с тройной связью соединения **15**, что повышает электрофильность ацила. Для сравнения: простое смешение олигонуклеотида **ON1** с пропаргиловым эфиром 11,11-D₂-линолевой кислоты без добавления катализатора не приводило к какой-либо реакции. В случае этилового эфира 11,11-D₂-линолевой кислоты, в котором тройная связь отсутствует, также не наблюдался перенос ацильного остатка ни в присутствии катализатора, ни в его отсутствие. Из этих фактов мы делаем вывод, что побочные процессы в данной реакции наблюдаются лишь при наличии обоих факторов: эфир должен быть пропаргиловым, а в реакционную смесь необходимо добавлять медный катализатор. Точная природа образующихся продуктов нуждается в дополнительном исследовании. Неудача с соединением **15** побудила нас синтезировать сложные эфиры **16** и **17**, в которых ацильный фрагмент удален от тройной связи. Оба соединения дали ожидаемые конъюгаты **ON4** и **ON5**, хотя их выход был немного ниже, чем в случае **ON2** (79 и 69 % соответственно).

Заклучение. Таким образом, в данной работе осуществлен синтез конъюгатов олигонуклеотид-полиненасыщенная жирная кислота методом постсинтетической модификации по реакции азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC) с использованием липидных модификаций разной природы и проведена оптимизация условий реакции.

Благодарности. Авторы благодарят Т. С. Зацепина («Сколтех», Москва) за помощь в регистрировании масс-спектров конъюгатов.

Acknowledgements. Authors are grateful to T. S. Zastepin («Skoltech», Moscow) for his help in registering mass spectra of the conjugates.

Список использованных источников

1. Modifications in Therapeutic Oligonucleotides Improving the Delivery / I. Dovydenko [et al.]. – 2016. – P. 319–337.
2. Molecular aptamers for drug delivery / W. Tan [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2011. – Vol. 29, № 12. – P. 634–640.
3. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update / S. L. Ginn [et al.] // *J. Gene Med.* – 2013. – Vol. 15, № 2. – P. 65–77.
4. Walther, W. Viral Vectors for Gene Transfer / W. Walther, U. Stein // *Drugs.* – 2000. – Vol. 60, № 2. – P. 249–271.
5. Thomas, C. E. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy / C. E. Thomas, A. Ehrhardt, M. A. Kay // *Nat. Rev. Genet.* – 2003. – Vol. 4, № 5 – P. 346–358.
6. Kay, M. A. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead / M. A. Kay // *Nat. Rev. Genet.* – 2011. – Vol. 12, № 5. – P. 316–328.
7. Recent advances in characterization of nonviral vectors for delivery of nucleic acids: impact on their biological performance / C. Oliveira [et al.] // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2015. – Vol. 12, № 1. – P. 27–39.
8. Balazs, D. A. Liposomes for Use in Gene Delivery / D. A. Balazs, W. Godbey // *J. Drug Deliv.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 1–12.
9. Dizaj, S. A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors / S. Dizaj, S. Jafari, A. Khosroushahi // *Nanoscale Res. Lett.* – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 252.
10. Kuo, W.-T. Intracellular trafficking, metabolism and toxicity of current gene carriers. / W.-T. Kuo, H.-Y. Huang, Y.-Y. Huang // *Curr. Drug Metab.* – 2009. – Vol. 10, № 8. – P. 885–894.
11. Lipid Conjugated Oligonucleotides: A Useful Strategy for Delivery / M. Raouane [et al.] // *Bioconjug. Chem.* – 2012. – Vol. 23, № 6. – P. 1091–1104.
12. Synthesis of Oligonucleotides Carrying Amino Lipid Groups at the 3'-End for RNA Interference Studies / S. Grijalvo [et al.] // *J. Org. Chem.* – 2010. – Vol. 75, № 20. – P. 6806–6813.
13. Synthesis of Lipid-Oligonucleotide Conjugates for RNA Interference Studies / S. Grijalvo [et al.] // *Chem. Biodivers.* – 2011. – Vol. 8, № 2. – P. 287–299.
14. Synthesis, Characterization, and in Vivo Delivery of siRNA-Squalene Nanoparticles Targeting Fusion Oncogene in Papillary Thyroid Carcinoma / M. Raouane [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 54, № 12. – P. 4067–4076.
15. Efficient In Vivo Delivery of siRNA to the Liver by Conjugation of α -Tocopherol / K. Nishina [et al.] // *Mol. Ther.* – 2008. – Vol. 16, № 4. – P. 734–740.
16. Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture. / R.L. Letsinger [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1989. – Vol. 86, № 17.
17. Lung Delivery Studies Using siRNA Conjugated to TAT(48–60) and Penetratin Reveal Peptide Induced Reduction in Gene Expression and Induction of Innate Immunity / S.A. Moschos [et al.] // *Bioconjug. Chem.* – 2007. – Vol. 18, № 5. – P. 1450–1459.
18. Synthesis and silencing properties of siRNAs possessing lipophilic groups at their 3'-termini / Y. Ueno [et al.] // *Nucleic Acids Symp. Ser.* – 2008. – Vol. 52, № 1. – P. 503–504.
19. Habus, I. Synthesis, hybridization properties, nuclease stability, and cellular uptake of the oligonucleotide-amino-beta-cyclodextrins and adamantane conjugates. / I. Habus, Q. Zhao, S. Agrawal // *Bioconjug. Chem.* – Vol. 6, № 4. – P. 327–331.
20. 3'-End conjugates of minimally phosphorothioate-protected oligonucleotides with 1-O-hexadecylglycerol: synthesis and anti-ras activity in radiation-resistant cells / A. Rait [et al.] // *Bioconjug. Chem.* – Vol. 11, № 2. – P. 153–160.
21. Acridine- and cholesterol-derivatized solid supports for improved synthesis of 3'-modified oligonucleotides. / M. W. Reed [et al.] // *Bioconjug. Chem.* – Vol. 2, № 4. – P. 217–225.
22. Synthesis of cholesteryl supports and phosphoramidites containing a novel peptidyl linker for automated synthesis of triple-helix forming oligonucleotides (TFOs). / H. Vu [et al.] // *Nucleic Acids Symp. Ser.* – 1993, № 29. – P. 19–20.
23. Vu, H. Synthesis and Properties of Cholesteryl-Modified Triple-Helix Forming Oligonucleotides Containing a Triglycyl Linker / H. Vu, T.S. Hill, K. Jayaraman // *Bioconjug. Chem.* – 1994. – Vol. 5, № 6. – P. 666–668.
24. Will, D. W. Attachment of vitamin E derivatives to oligonucleotides during solid-phase synthesis / D. W. Will, T. Brown // *Tetrahedron Lett.* – 1992. – Vol. 33, № 19. – P. 2729–2732.
25. Synthesis and physical properties of anti-HIV antisense oligonucleotides bearing terminal lipophilic groups. / C. MacKellar [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – Vol. 20, № 13. – P. 3411–347.
26. Structure-activity relationships of cytotoxic cholesterol-modified DNA duplexes. / M. W. Reed [et al.] // *J. Med. Chem.* – 1995. – Vol. 38, № 22. – P. 4587–4596.

27. Matysiak, S. Acetal Oligonucleotide Conjugates in Antisense Strategy / S. Matysiak, R. Frank, W. Pfeleiderer // *Nucleosides and Nucleotides*. – 1997. – Vol. 16, № 5–6. – P. 855–861.
28. Godeau, G. Lipid-Conjugated Oligonucleotides via “Click Chemistry” Efficiently Inhibit Hepatitis C Virus Translation / G. Godeau, C. Staedel, P. Barthélémy // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51, № 15. – P. 4374–4376.
29. Azide Phosphoramidite in Direct Synthesis of Azide-Modified Oligonucleotides / M. A. Fomich [et al.] // *Org. Lett.* – 2014. – Vol. 16, № 17. – P. 4590–4593.
30. Isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids protect mitochondria from oxidative stress / A. Y. Andreyev [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2015. – Vol. 82. – P. 63–72.
31. Small amounts of isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids suppress lipid autoxidation / S. Hill [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – Vol. 53, № 4. – P. 893–906.
32. Dussault, P. H. Total Synthesis of the Alkoxydioxines (+)- and (–)-Chondrillin and (+)- and (–)-Plakorin via Singlet Oxygenation/Radical Rearrangement / P. H. Dussault, C. T. Eary, K. R. Woller // *J. Org. Chem.* – 1999. – Vol. 64, № 6. – P. 1789–1797.

References

1. Dovydenko I., Venyaminova A., Pyshnyi D., Tarassov I., Entelis N., “Modifications in Therapeutic Oligonucleotides Improving the Delivery”, in Jurga S., Erdmann V. A., Barciszewski J. (eds.), *Modified Nucleic Acids in Biology and Medicine*, Springer, 2016, pp. 319–337.
2. Tan W., Wang H., Chen Y., Zhang X., Zhu H., Yang C., Yang R., Liu C., “Molecular aptamers for drug delivery”, *Trends in Biotechnology*, 2011, vol. 29, no. 12, pp. 634–640.
3. Ginn S. L., Alexander I. E., Edelstein M. L., Abedi M. R., Wixon J., “Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update”, *Journal Of Gene Medicine*, 2013, vol. 15, no. 2, pp. 65–77.
4. Walther W., Stein U., “Viral Vectors for Gene Transfer”, *Drugs*, 2000, vol. 60, no. 2, pp. 249–271.
5. Thomas C. E., Ehrhardt A., Kay M. A., “Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy”, *Nature Reviews Genetics*, 2003, vol. 4, no. 5, pp. 346–358.
6. Kay M. A., “State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead”, *Nature Reviews Genetics*, 2011, vol. 12, no. 5, pp. 316–328.
7. Oliveira C., Silveira I., Veiga F., Ribeiro A. J., “Recent advances in characterization of nonviral vectors for delivery of nucleic acids: impact on their biological performance”, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2015, vol. 12, no. 1, pp. 27–39.
8. Balazs D. A., Godbey W., “Liposomes for Use in Gene Delivery”, *Journal of Drug Delivery*, 2011, vol. 2011, pp. 1–12.
9. Dizaj S., Jafari S., Khosroushahi A., “A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors”, *Nanoscale Research Letters*, 2014, vol. 9, no. 1, p. 252.
10. Kuo W.-T., Huang H.-Y., Huang Y.-Y., “Intracellular trafficking, metabolism and toxicity of current gene carriers”, *Current Drug Metabolism*, 2009, vol. 10, no. 8, pp. 885–94.
11. Raouane M., Desmaële D., Urbinati G., Massaad-Massade L., Couvreur P., “Lipid Conjugated Oligonucleotides: A Useful Strategy for Delivery”, *Bioconjugate Chemistry*, 2012, vol. 23, no. 6, pp. 1091–1104.
12. Grijalvo S., Ocampo S. M., Perales J. C., Eritja R., “Synthesis of Oligonucleotides Carrying Amino Lipid Groups at the 3'-End for RNA Interference Studies”, *Journal of Organic Chemistry*, 2010, vol. 75, no. 20, pp. 6806–6813.
13. Grijalvo S., Ocampo S. M., Perales J. C., Eritja R., “Synthesis of Lipid-Oligonucleotide Conjugates for RNA Interference Studies”, *Chemistry & Biodiversity*, 2011, vol. 8, no. 2, pp. 287–299.
14. Raouane M., Desmaële D., Gilbert-Sirieix M., Gueutin C., Zouhri F., Bourgaux C., Lepeltier E., Gref R., Ben Salah R., Clayman G., Massaad-Massade L., Couvreur P., “Synthesis, Characterization, and in Vivo Delivery of siRNA-Squalene Nanoparticles Targeting Fusion Oncogene in Papillary Thyroid Carcinoma”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, vol. 54, no. 12, pp. 4067–4076.
15. Nishina K., Unno T., Uno Y., Kubodera T., Kanouchi T., Mizusawa H., Yokota T., “Efficient In Vivo Delivery of siRNA to the Liver by Conjugation of α -Tocopherol”, *Molecular Therapy*, 2008, vol. 16, no. 4, pp. 734–740.
16. Letsinger R. L., Zhang G. R., Sun D. K., Ikeuchi T., Sarin P. S., “Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, vol. 86, no. 17, pp. 6553–6556.
17. Moschos S. A., Jones S. W., Perry M. M., Williams A. E., Erjefält J. S., Turner J. J., Barnes P. J., Sproat B. S., Gait M. J., Lindsay M. A., “Lung Delivery Studies Using siRNA Conjugated to TAT(48–60) and Penetratin Reveal Peptide Induced Reduction in Gene Expression and Induction of Innate Immunity”, *Bioconjugate Chemistry*, 2007, vol. 18, no. 5, pp. 1450–1459.
18. Ueno Y., Kawada K., Shibata A., Yoshikawa K., Wataya Y., Kitade Y., “Synthesis and silencing properties of siRNAs possessing lipophilic groups at their 3'-termini”, *Nucleic Acids Symposium Series*, 2008, vol. 52, no. 1, pp. 503–504.
19. Habus I., Zhao Q., Agrawal S., “Synthesis, hybridization properties, nuclease stability, and cellular uptake of the oligonucleotide-amino-beta-cyclodextrins and adamantane conjugates”, *Bioconjugate Chemistry*, 1995, vol. 6, no. 4, pp. 327–331.
20. Rait A., Pirolo K., Will D. W., Peyman A., Rait V., Uhlmann E., Chang E. H., “3'-End conjugates of minimally phosphorothioate-protected oligonucleotides with 1-O-hexadecylglycerol: synthesis and anti-ras activity in radiation-resistant cells”, *Bioconjugate Chemistry*, 2000, vol. 11, no. 2, pp. 153–160.
21. Reed M. W., Adams A. D., Nelson J. S., Meyer R. B., “Acridine- and cholesterol-derivatized solid supports for improved synthesis of 3'-modified oligonucleotides”, *Bioconjugate Chemistry*, 2010, vol. 21, no. 4, pp. 217–225.

22. Vu H., Singh P., Joyce N., Hogan M. E., Jayaraman K., “Synthesis of cholesteryl supports and phosphoramidites containing a novel peptidyl linker for automated synthesis of triple-helix forming oligonucleotides (TFOs)”, *Nucleic Acids Symposium Series*, 1993, no. 29, pp. 19–20.
23. Vu H., Hill T. S., Jayaraman K., “Synthesis and Properties of Cholesteryl-Modified Triple-Helix Forming Oligonucleotides Containing a Triglycyl Linker”, *Bioconjugate Chemistry*, 1994, vol. 5, no. 6, pp. 666–668.
24. Will D. W., Brown T., “Attachment of vitamin E derivatives to oligonucleotides during solid-phase synthesis”, *Tetrahedron Letters*, 1992, vol. 33, no. 19, pp. 2729–2732.
25. MacKellar C., Graham D., Will D. W., Burgess S., Brown T., “Synthesis and physical properties of anti-HIV antisense oligonucleotides bearing terminal lipophilic groups”, *Nucleic Acids Research*, 1992, vol. 20, no. 13, pp. 3411–3417.
26. Reed M. W., Lukhtanov E. A., Gorn V. V., Lucas D. D., Zhou J. H., Pai S. B., Cheng Y. C., Meyer R. B., “Structure-activity relationships of cytotoxic cholesterol-modified DNA duplexes”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1995, vol. 38, no. 22, pp. 4587–4596.
27. Matysiak S., Frank R., Pfeleiderer W., “Acetal Oligonucleotide Conjugates in Antisense Strategy”, *Nucleosides and Nucleotides*, 1997, vol. 16, no. 5-6, pp. 855–861.
28. Godeau G., Staedel C., Barthélémy P., “Lipid-Conjugated Oligonucleotides via “Click Chemistry” Efficiently Inhibit Hepatitis C Virus Translation”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, vol. 51, no. 15, pp. 4374–4376.
29. Fomich M. A., Kvach M. V., Navakouski M. J., Weise C., Baranovsky A. V., Korshun V. A., Shmanai V. V., “Azide Phosphoramidite in Direct Synthesis of Azide-Modified Oligonucleotides”, *Organic Letters*, 2014, vol. 16, no. 17, pp. 4590–4593.
30. Andreyev A. Y., Tsui H. S., Milne G. L., Shmanai V. V., Bekish A. V., Fomich M. A., Pham M. N., Nong Y., Murphy A. N., Clarke C. F., Shchepinov M. S., “Isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids protect mitochondria from oxidative stress”, *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, vol. 82, pp. 63–72.
31. Hill S., Lamberson C. R., Xiu L., To R., Tsui H. S., Shmanai V. V., Bekish A. V., Awad A. M., Marbois B. N., Cantor C. R., Porter N. A., Clarke C. F., Shchepinov M. S., “Small amounts of isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids suppress lipid autoxidation”, *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, vol. 53, no. 4, pp. 893–906.
32. Dussault P. H., Eary C. T., Woller K. R., “Total Synthesis of the Alkoxydioxines (+)- and (–)-Chondrillin and (+)- and (–)-Plakorin via Singlet Oxygenation/Radical Rearrangement”, *Journal of Organic Chemistry*, 1999, vol. 64, no. 6, pp. 1789–1797.

Інфармацыя аб аўторах

Фоміч Максім Александровіч – науч. супрацоўнік, Інстытут фізіка-арганічнай хіміі НАН Беларусі (ул. Сурганова, 13, 220072, Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: mfomich@gmail.com

Бекіш Андрэй Валер’евіч – канд. хім. навук, доцэнт, Беларуска-Руска-Французскі ўніверсітэт (ул. Ленінградская, 14, 220030, Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: andreibekish@yahoo.com

Шарко Ольга Леонідаўна – канд. хім. навук, ст. науч. супрацоўнік, Інстытут фізіка-арганічнай хіміі НАН Беларусі (ул. Сурганова, 13, 220072, Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: sharko@ifoch.bas-net.by

Пракоўрэвіч Канстанцін Ніколаевіч – канд. хім. навук, доцэнт, Ваенная акадэмія Рэспублікі Беларусь (пр. Незавісímости, 220, 220057, Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: kprokhorevich@yahoo.com

Шманай Вадім Владиміравіч – канд. хім. навук, зав. лаб. хіміі біокана’югатаў, Інстытут фізіка-арганічнай хіміі НАН Беларусі (ул. Сурганова, 13, 220072, Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by

Information about the authors

Maksim A. Fomich – Researcher, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mfomich@gmail.com

Andrei V. Bekish – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andreibekish@yahoo.com

Olga L. Sharko – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sharko@ifoch.bas-net.by

Prokhorevich Konstantin Nikolaevich – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Belarusian Military Academy (220, Nezavisimosti Ave., 220057, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kprokhorevich@yahoo.com

Vadim V. Shmanai – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory of Bioconjugate Chemistry, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by