

**БИОАРГАНИЧНАЯ ХИМИЯ**  
**BIOORGANIC CHEMISTRY**

УДК 577.11; 577.113.4; 547-305.1; 547.279.3  
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-1-36-44>

Поступила в редакцию 09.03.2023  
Received 09.03.2023

**Ю. П. Ламекина, Т. П. Северинчик, Е. А. Улащик, Т. П. Ахламёнок,  
П. Ю. Борищук, Б. В. Ронишенко, В. В. Шманай**

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

**СИНТЕЗ ТИОЛСОДЕРЖАЩИХ ДНК-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОСФОРАМИДИТНОГО РЕАГЕНТА  
НА ОСНОВЕ ТРАНС-4-ГИДРОКСИ-*L*-ПРОЛИНОЛА**

**Аннотация.** Осуществлен синтез нового фосфорамидитного реагента на основе *транс*-4-гидрокси-*L*-пролинола для получения тиолсодержащих олигонуклеотидов. Реакционная способность введенных тиольных групп была продемонстрирована на примере реакций с тиол-специфичными реагентами. Конъюгаты после модификации были очищены гель-фильтрацией и охарактеризованы с помощью ВЭЖХ-МС.

**Ключевые слова:** автоматический олигонуклеотидный синтез, фосфорамидитный метод, тиольный фосфорамидит, тиолсодержащие олигонуклеотиды, постсинтетическая модификация, тиол-специфичные реагенты

**Для цитирования.** Синтез тиолсодержащих ДНК-олигонуклеотидов с использованием фосфорамидитного реагента на основе *транс*-4-гидрокси-*L*-пролинола / Ю. П. Ламекина [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2024. – Т. 60, № 1. – С. 36–44. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-1-36-44>

**Y. P. Lamekina<sup>1</sup>, T. P. Seviarynchik<sup>1</sup>, E. A. Ulashchik<sup>1</sup>, T. P. Akhlamionok<sup>1</sup>, P. Y. Baryshchuk<sup>1</sup>,  
B. V. Ranishenka<sup>1</sup>, V. V. Shmanai<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

**SYNTHESIS OF THIOL-CONTAINING DNA-OLIGONUCLEOTIDES USING A PHOSPHORAMIDITE  
REAGENT BASED ON TRANS-4-HYDROXY-*L*-PROLINOL**

**Annotation.** In this work, a new phosphoramidite reagent for the preparation of thiol-modified oligonucleotides was synthesized. Thiol-specific reagents have been used to demonstrate the reactivity of thiol groups. After modification, conjugates were purified via gel-filtration and characterized with HPLC-MS.

**Keywords:** automated oligonucleotide synthesis, phosphoramidite method, thiol phosphoramidite, thiol-containing oligonucleotides, post-synthetic modification, thiol-specific reagents

**For citation.** Lamekina Y. P., Seviarynchik T. P., Ulashchik E. A., Akhlamionok T. P., Baryshchuk P. Y., Ranishenka B. V., Shmanai V. V. Synthesis of thiol-containing DNA-oligonucleotides using a phosphoramidite reagent based on *trans*-4-hydroxy-*L*-prolinol. *Vestsi Natsyonal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2024, vol. 60, no. 1, pp. 36–44 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-1-36-44>

**Введение.** Модификация заданных положений олигонуклеотидной цепи реакционноспособными тиольными группами открыла новые возможности для их биоконъюгации с различными лигандами, биомолекулами, наночастицами и поверхностями. Впервые тиолсодержащие олигонуклеотиды были синтезированы для введения флуоресцентных и других нерадиоактивных меток [1, 2]. Биоконъюгация тиолсодержащих олигонуклеотидов с такими ферментами, как щелочная фосфатаза или пероксидаза хрена, широко используется в дизайне молекулярных зондов для детекции ДНК-аналитов [3, 4]. Тиолсодержащие олигонуклеотиды нашли применение в иммобилизации ДНК на поверхности золота, а также для получения ДНК-функционализированных наночастиц золота [5, 6].

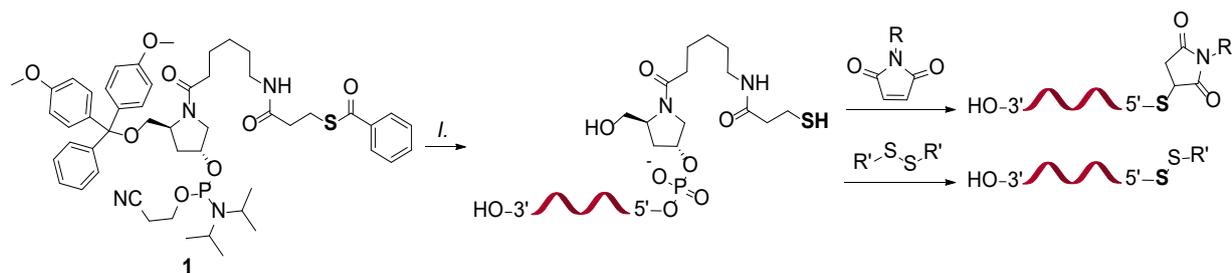


Рис. 1. Фосфорамидитный реагент **1** в синтезе тиолсодержащих ДНК-олигонуклеотидов и последующая постсинтетическая модификация тиол-специфичными реагентами (*I.* – автоматический синтез с использованием реагента **1**, выделение и очистка ДНК-олигонуклеотидов)

Fig. 1. Phosphoramidite reagent **1** in the synthesis of thiol-containing DNA-oligonucleotides and subsequent post-synthetic modification with thiol-specific reagents (*I.* – automated synthesis using reagent **1**, isolation and purification of DNA-oligonucleotides)

Цели данной работы заключались в синтезе и очистке тиолсодержащих ДНК-олигонуклеотидов, оценке реакционной способности введенных SH-групп посредством их биоконъюгации с тиол-специфичными реагентами (малеимид и дисульфид) (рис. 1). Для достижения поставленных целей была разработана схема и осуществлен синтез нового фосфорамидитного реагента **1** на основе *транс*-4-гидрокси-*L*-пролинола.

#### Экспериментальная часть.

**Материалы и оборудование.** Коммерчески доступные реагенты, необходимые для выполнения данной работы, использовались без дополнительной очистки. Высушивание и очистка растворителей проводились в соответствии с описанными в литературе методами [7]. (3*R*,5*S*)-1-(6-(2,2,2-трифторацетиламино)-1-оксогексил)-5-(4,4'-диметокситритилоксиметил)пирролидин-3-ол (**2**) и *N,N*-диизопропиламино-(2-цианоэтоксид)хлорофосфин (CEP-Cl) были синтезированы по описанным в литературе методикам [8–10]. Контроль за ходом реакций осуществляли методом аналитической тонкослойной хроматографии (ТСХ) на алюминиевых пластинках Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 40–63 мкм (Merck); пятна визуализировали УФ-лампой (254 нм) и проявляли растворами перманганата калия и фосфорномолибденовой кислоты при нагревании. Колоночную хроматографию синтезированных соединений осуществляли на силикагеле Kieselgel 60, 40–63 мкм (Merck). Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) регистрировали при 500 МГц (<sup>1</sup>H), 126 МГц (<sup>13</sup>C) и 202 МГц (<sup>31</sup>P) на спектрометре Bruker Avance 500 (Bruker) и калибровали относительно сигналов остаточного растворителя (CDCl<sub>3</sub>: 7,26 м. д. для <sup>1</sup>H; CD<sub>3</sub>CN: 1,94 м. д. для <sup>1</sup>H, 1,32 м. д. для <sup>13</sup>C) или триметилфосфата как внутреннего стандарта (3,7 м. д. для <sup>31</sup>P [11]). <sup>1</sup>H-константы спин-спинового взаимодействия (*J*) указаны в герцах (Гц) и относятся к наблюдаемой мультиплетности сигналов в спектрах. Температуру плавления (*T*<sub>пл</sub>) соединения **4** определяли капиллярным методом.

Синтез 5'-тиолсодержащих ДНК-олигонуклеотидов был выполнен на автоматическом синтезаторе ASM-2000 (Biosset). Очистку олигонуклеотидов после синтеза выполняли высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на обращенно-фазовой колонке Clarity 5 мкм Oligo-RP 250 × 10 мм (Phenomenex) на приборе (Agilent) с УФ-детекцией (260 нм). Для гель-фильтрационной хроматографии конъюгатов ДНК-олигонуклеотидов после реакции с тиол-специфичными реагентами использовали Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals). Очищенные олигонуклеотиды характеризовали методом ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС) (метод ионизации – электроспрей (ESI)) на обращенно-фазовой колонке Clarity 3 мкм Oligo-RP 50 × 2 мм (Phenomenex) на приборе Ultimate 3000 (Waters). Масс-спектры ДНК-олигонуклеотидов регистрировали в отрицательном моде.

**(3*R*,5*S*)-1-(6-амино-1-оксогексил)-5-(4,4'-диметокситритилоксиметил)пирролидин-3-ол (**3**).** В раствор соединения **2** (6,00 г, 9,55 ммоль) в метаноле (144 мл) добавили карбонат калия (6,87 г, 49,7 ммоль) и воду (36 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре, после чего досуха упарили, соупарили с изопропиловым спиртом (2 × 50 мл)

и ацетонитрилом ( $2 \times 50$  мл). Остаток растворили в дихлорметане (150 мл) и осушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , осушитель отфильтровали, фильтрат упарили. Остаток после упаривания очищали колоночной хроматографией в градиенте смеси растворителей дихлорметан/метанол/триэтиламин и получили 4,72 г (93 %) соединения **3** в виде гигроскопичной пены белого цвета.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ),  $\delta$ , м. д. (смесь конформеров в соотношении  $\approx 0,7 : 0,3$ ): 7,42–7,35 (м, 2H), 7,32–7,24 (м, 6H), 7,23–7,16 (м, 1H), 6,88–6,78 (м, 4H), 4,49–4,42 (м, 0,7H), 4,38–4,32 (м, 0,3H), 4,24–4,16 (м, 0,7H), 4,16 (уш. с,  $\text{NH}_2 + \text{OH}$ ), 4,14–4,06 (м, 0,3H), 3,74 (с, 1,8H), 3,73 (с, 4,2H), 3,64–3,55 (м, 1H), 3,41 (дд,  $J = 10,5$  Гц, 2,5 Гц, 0,7H), 3,33–3,25 (м, 1H), 3,13–3,06 (м, 0,6H), 3,04 (дд,  $J = 9,0$  Гц, 3,0 Гц, 0,7H), 2,71–2,62 (м, 2H), 2,32–2,16 (м, 1,7H), 2,16–2,08 (м, 1H), 2,04–1,96 (м, 0,6H), 1,92–1,85 (м, 0,7H), 1,66–1,14 (м, 5,4H), 1,23–1,14 (м, 0,6H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ),  $\delta$ , м. д.: 173,1, 172,8, 159,7, 159,6, 146,4, 146,1, 137,3, 137,2, 136,9 (2C), 131,0, 129,0, 128,9 (2C), 128,8, 127,9, 127,7, 114,1, 114,0, 87,3, 86,6, 70,4, 69,3, 66,4, 64,4, 57,2, 56,6, 56,4, 55,9 (2C), 54,6, 41,6, 39,0, 37,2, 35,3, 33,8, 31,6 (2C), 27,0 (2C), 25,5, 25,2.

**3-(меркаптобензоил)пропионовая кислота (4)**. Кислоту **4** синтезировали по описанной в литературе методике [12]. Получили 8,78 г (61 %) в виде белого порошка с характерным запахом, экспериментальная  $T_{\text{пл}}$  составила 49–51 °C.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ , м. д.: 7,96 (дд,  $J = 7,4$  Гц, 1,3 Гц, 2H), 7,58 (тт,  $J = 7,4$ , 1,3 Гц, 1H), 7,46 (т,  $J = 7,4$  Гц, 2H), 3,32 (т,  $J = 6,9$  Гц, 2H), 2,81 (т,  $J = 6,9$  Гц, 2H).

Физико-химические характеристики соединения **4** коррелируют с приведенными в литературе данными [11].

**(3R,5S)-1-(6-(3-(меркаптобензоил)пропанамидо)-1-оксогексил)-5-(4,4'-диметокситригилосиметил)пирролидин-3-ол (5)**. В раствор амина **3** (4,72 г, 8,87 ммоль) и DIPEA (6,2 мл, 35,5 ммоль) в дихлорметане (100 мл) последовательно добавили кислоту **4** (1,78 г, 8,45 ммоль),  $\text{EDC} \cdot \text{HCl}$  (1,94 г, 10,1 ммоль),  $\text{HOBT} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1,55 г, 10,1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона. По окончании реакции (контроль ТСХ) реакционную смесь разбавили в 2 раза дихлорметаном и промыли водой ( $2 \times 100$  мл), насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 100$  мл) и насыщенным водным раствором  $\text{NaCl}$  ( $2 \times 100$  мл). Органический слой отделили и осушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , осушитель отфильтровали, фильтрат упарили. Остаток очищали колоночной хроматографией в градиенте смеси растворителей дихлорметан/ацетон/триэтиламин и получили 5,00 г (82 %) соединения **6** в виде хрупкой пены белого цвета.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ),  $\delta$ , м. д. (смесь конформеров в соотношении  $\approx 0,7 : 0,3$ ): 7,97–7,89 (м, 2H), 7,64–7,58 (м, 1H), 7,51–7,43 (м, 2H), 7,40–7,34 (м, 2H), 7,31–7,18 (м, 7H), 6,88–6,79 (м, 4H), 6,60 (т,  $J = 5,0$  Гц, 0,7H, NH), 6,53 (т,  $J = 5,0$  Гц, 0,3H, NH), 4,50–4,43 (м, 0,7H), 4,40–4,32 (м, 0,3H), 4,24–4,16 (м, 0,7H), 4,11–4,05 (м, 0,3H), 3,77–3,72 (м, 6H), 3,63–3,53 (м, 1H), 3,43–3,22 (м, 4,6H), 3,18–2,99 (м, 3,3H), 2,51–2,42 (м, 1,7H), 2,24–2,08 (м, 3,7H), 2,04–1,96 (м, 0,3H), 1,92–1,84 (м, 0,7H), 1,60–1,27 (м, 5,7H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ),  $\delta$ , м. д.: 192,5, 172,7, 172,5, 171,3 (2C), 159,6, 159,5, 146,4, 146,1, 137,9, 137,3, 137,2, 136,9, 134,6, 130,9, 130,4, 129,9, 129,0, 128,9 (2C), 128,8, 127,9, 127,7, 126,7, 114,1, 114,0, 87,2, 86,6, 70,6, 69,4, 66,4, 64,4, 57,2, 56,5, 56,4, 55,9 (2C), 54,4, 39,7, 39,6, 39,0, 37,2, 36,4, 35,5, 33,9, 30,0, 29,9, 27,2 (2C), 25,7, 25,6, 25,2.

**(3R,5S)-1-(6-(3-(меркаптобензоил)пропанамидо)-1-оксогексил)-5-(4,4'-диметокситригилосиметил)пирролидин-3-ил N,N-диизопропил-О-(2-цианоэтил)фосфорамидит (1)**. Соединение **5** (2 г, 2,76 ммоль) предварительно соупарили со свежеперегнанным над гидридом кальция дихлорметаном ( $2 \times 25$  мл), растворили в 25 мл дихлорметана и добавили триэтиламин (960 мкл, 6,91 ммоль). Колбу с полученным раствором тщательно продули аргоном, плотно закупорили и охладили на ледяной бане, после чего в раствор по каплям вносили N,N-диизопропиламино-(2-цианоэтокси)хлорофосфин ( $\text{CEP-Cl}$ ) (784 мг, 3,31 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в инертной атмосфере при охлаждении еще 30 мин, затем в течение 2 ч при комнатной температуре. По окончании реакции (контроль ТСХ) в реакционную смесь добавили 25 мкл метанола, разбавили в 2 раза дихлорметаном и промыли насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$ .

(2 × 25 мл), насыщенным водным раствором NaCl (2 × 25 мл). Органический слой отделили и осушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, осушитель отфильтровали, фильтрат упарили. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией в градиенте смеси растворителей толуол/ацетон/триэтиламин и получили 2,20 г (86 %) фосфорамидита **1** в виде хрупкой пены белого цвета.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CD<sub>3</sub>CN), δ, м. д. (смесь конформеров в соотношении ≈ 0,7 : 0,3): 7,97–7,90 (м, 2H), 7,65–7,59 (м, 1H), 7,52–7,46 (м, 2H), 7,40–7,36 (м, 2H), 7,32–7,18 (м, 7H), 6,88–6,79 (м, 4H), 6,51 (уш. с, 0,7H), 6,44 (уш. с, 0,3H), 4,75–4,62 (м, 0,7H), 4,62–4,51 (м, 0,3H), 4,27–4,15 (м, 0,7H), 4,12–4,02 (м, 0,3H), 3,83–3,64 (м, 9H), 3,64–3,51 (м, 2,3H), 3,48 (дд, J = 10,8 Гц, 4,0 Гц, 0,3H), 3,44–3,36 (м, 0,3H), 3,36–3,21 (м, 2,7H), 3,18–3,06 (м, 2,6H), 3,05–2,99 (м, 0,7H), 2,67–2,57 (м, 2H), 2,52–2,41 (м, 2H), 2,30–2,15 (м, 3H), 2,11–1,90 (м, 0,7H), 1,64–1,25 (м, 5,7H), 1,26–1,06 (м, 12,7H).

<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} ЯМР (202 МГц, CD<sub>3</sub>CN), δ, м. д.: 148,2, 148,6, 148,9.

**Синтез, выделение и очистка тиолсодержащих ДНК-олигонуклеотидов.** Синтез модифицированных олигонуклеотидов был выполнен на автоматическом синтезаторе в масштабе 0,5 мкмоль с использованием универсального носителя с контролируемым размером пор (CPG с диаметром пор 500 Å). В качестве активатора для конденсации использовали 0,25 М раствор 5-бензилтио-1*H*-тетразола в ацетонитриле; окислитель – 0,04 М раствор йода в смеси ацетонитрил-вода-пиридин (соотношение 8 : 2 : 2). Для 5'-модификации олигонуклеотидов использовали 0,1 М раствор фосфорамидита **1** в ацетонитриле. Время конденсации – 5 мин, количество циклов конденсации – 3. После завершения синтеза колонки с олигонуклеотидами были промыты 20%-м раствором диэтиламина в ацетонитриле. Носитель с защищенными олигонуклеотидами переносили в пробирку типа эппендорф на 1,5 мл. Для снятия олигонуклеотидов со стекла использовали смесь метиламина и аммиака (соотношение 1 : 1) с добавлением ТСЕР (конечная концентрация в растворе 0,1 М) при температуре 37 °С в течение 7 ч. Затем раствор олигонуклеотида отделяли от носителя и упаривали в 2 раза с использованием вакуумного концентратора. Очистку тиолсодержащих олигонуклеотидов проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Clarity 5 мкм Oligo-RP 250 × 10 мм (Phenomenex) в градиенте ацетонитрила 10–45 % (буфер А: ацетонитрил, буфер Б: 0,2 М раствор триэтиламоний ацетата в воде с содержанием ацетонитрила 5 %, рН 7,0). Очищенные олигонуклеотиды характеризовали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС на колонке Clarity 3 мкм Oligo-RP 50 × 2 мм (Phenomenex) в градиенте ацетонитрила 0–25 % (буфер А: ацетонитрил, буфер Б: раствор 50 мМ гексафторизопропанола и 5 мМ N,N-диизопропилэтиламина в воде с содержанием ацетонитрила 5 %, рН 8,5).

**Общая методика модификации HS-олигонуклеотидов тиол-специфичными реагентами.** 0,2 ОЕ (2,96 нмоль) тиолсодержащего олигонуклеотида растворяли в 10 мкл 50 мМ фосфатного буфера с содержанием 1 мМ ЭДТА, рН 7,2. Добавляли 0,296 мкл раствора ТСЕР (14,78 нмоль, *c* = 50 мМ) в том же буфере. Перемешивали при комнатной температуре в течение 8 ч. Реакционную смесь пропускали через гель-фильтрационную колонку. К полученному раствору олигонуклеотида добавляли 1,774 мкл раствора реагента **6** (44,34 нмоль, *c* = 25 мМ) или 0,443 мкл раствора реагента **7** (44,34 нмоль, *c* = 0,1 М), выдерживали в течение 20 мин (для **6**) или 12 ч (для **7**) при комнатной температуре. Конечные продукты выделяли гель-фильтрацией и охарактеризовывали методом ВЭЖХ-МС.

**Результаты и их обсуждение.** Синтез целевого фосфорамидитного реагента **1** осуществляли из 4,4'-диметокситритилированного (DMTrO-) производного *транс*-4-гидрокси-*L*-пролинола **2** (рис. 2). Выбор соединения **2** в качестве структурного базиса для синтеза соединения **1** обусловлен его использованием в создании универсальных реагентов, позволяющих встраивать модификации как в терминальных, так и в любых других положениях олигонуклеотидной последовательности [10, 13]. Щелочной гидролиз 2,2,2-трифторацетамидной (TFA-) группы соединения **2** привел к амину **3**, который ввели в реакцию конденсации с 3-(меркаптобензоил)пропионовой кислотой (**4**) для получения амидного производного **5**. Выбор бензоильной защитной группы (Bz-) для тиольной группы был обусловлен ее совместимостью с условиями олигонуклеотидного синтеза и легкостью последующего удаления. Наконец, фосфорамидит **1** был синтезирован в реакции между соединением **5** и N,N-диизопропиламино-(2-цианоэтокси)хлорофосфином (СЕР-Cl) с выходом 86 %.

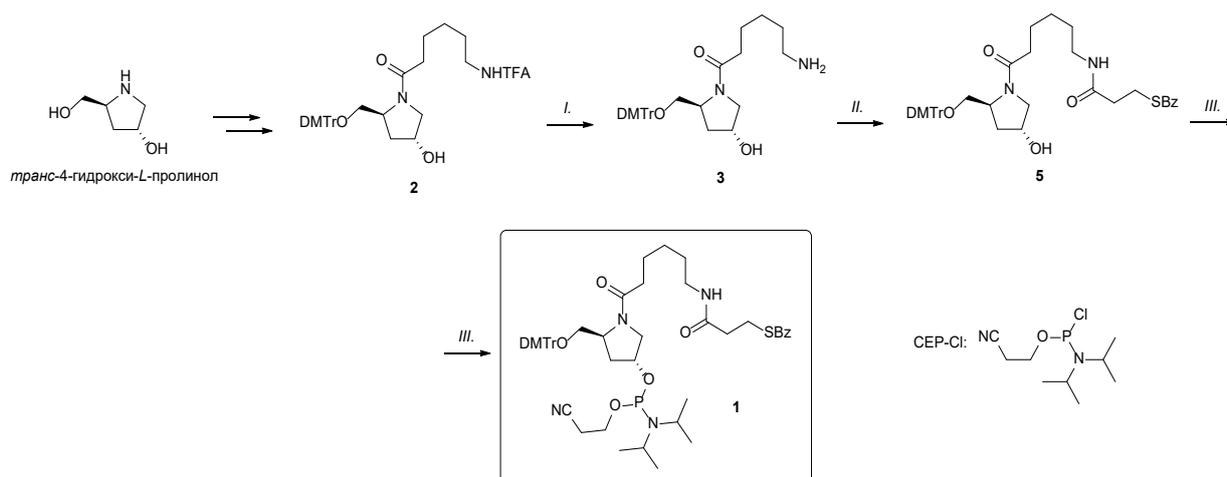


Рис. 2. Схема синтеза фосфорамидита **1** (условия реакций: I.:  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , к. т., 12 ч, 93 %; II.: **4**,  $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{HOBT}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{DIPEA}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , к. т., 3 ч, 82 %; III.:  $\text{CEP}\cdot\text{Cl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$  – к. т., 2,5 ч, 86 %

Fig. 2. Synthetic route to phosphoramidite **1** (reaction conditions: I.:  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , r. t., 12 h, 93 %; II.: **4**,  $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{HOBT}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{DIPEA}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r. t., 3 h, 82 %; III.:  $\text{CEP}\cdot\text{Cl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$  – r. t., 2.5 h, 86 %

Все синтезированные соединения были охарактеризованы  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопией. Существование соединений **1**, **3** и **5** в виде конформеров привело к дублированию самых резонансных сигналов в  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектрах. Фосфорамидит **1** также существует в виде пары диастереомеров, что проявилось в дублировании сигналов не только в  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , но и  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектрах и усложнило их расшифровку [13]. Чистота реагента **1** оценивалась по  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектру и составила свыше 99 %.

Синтез 5'-тиолсодержащих ДНК-олигонуклеотидов был выполнен на автоматическом синтезаторе. Обнаружено, что в процессе хранения олигонуклеотидов, полученных с использованием реагента **1**, тиольные группы (вне зависимости от положения в олигонуклеотидной последовательности) образуют дисульфидные связи. Для восстановления реакционной способности введенных функциональных групп целевые олигонуклеотиды перед работой обрабатывали восстанавливающим реагентом ТСЕР (табл. 1, рис. 3).

Т а б л и ц а 1. Данные масс-спектрометрии тиолсодержащих ДНК-олигонуклеотидов

T a b l e 1. Mass spectrometry data for thiol-containing DNA-oligonucleotides

Олигонуклеотид	$M_{\text{расч}}$ , Да	$M_{\text{набл}}$ , Да
Димер $\text{dA}_{11}\text{-SH}$	7 525,46	7 524,51
$\text{dA}_{11}\text{-SH}$	3 763,74	3 763,44

Далее олигонуклеотиды ( $\text{dA}_{11}$ ) очищали от остатков низкомолекулярных компонентов гель-фильтрацией и вводили в реакцию с реактивом Элмана (**6**) и 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексановой кислотой (**7**). Выходы реакций оценивали согласно данным ВЭЖХ-МС (табл. 2, рис. 4, 5).

Т а б л и ц а 2. Данные масс-спектрометрии тиолсодержащих ДНК-олигонуклеотидов после модификации тиол-специфичными реагентами

T a b l e 2. Mass spectrometry data for thiol-bearing DNA oligonucleotides after modification with thiol-specific reagents

Олигонуклеотид	$M_{\text{расч}}$ , Да	$M_{\text{набл}}$ , Да
$\text{dA}_{11}\text{-SH} + \mathbf{6}$	3 960,88	3 960,35
$\text{dA}_{11}\text{-SH} + \mathbf{7}$	3 974,96	3 974,22

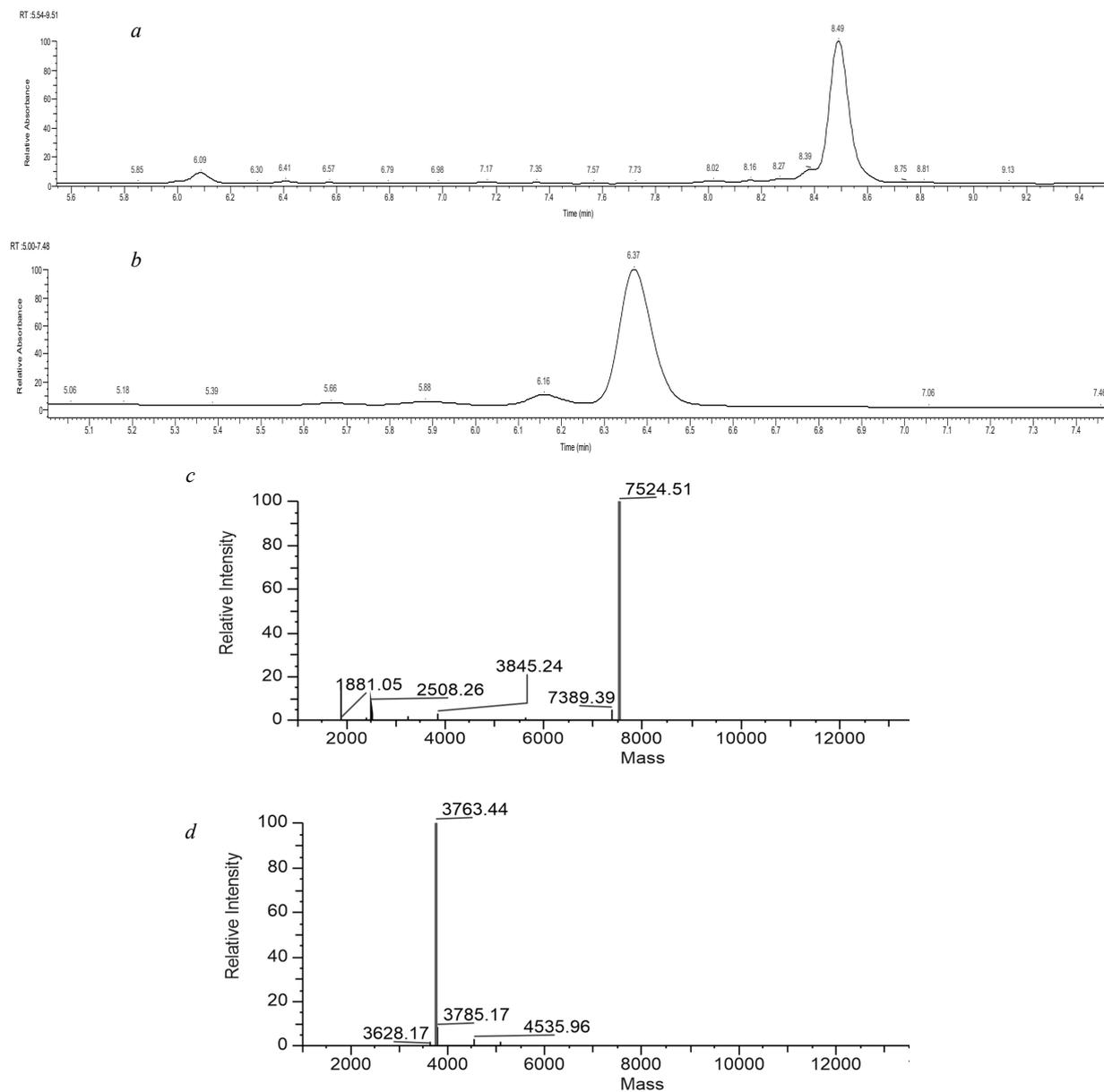


Рис. 3. Хроматограммы (*a, b*) и масс-спектры (*c, d*) тиолсодержащих ДНК-олигонуклеотидов: (*a, c*) – после хранения; (*b, d*) – после обработки TCEP

Fig. 3. Chromatograms (*a, b*) and mass spectra (*c, d*) of thiol-bearing DNA-oligonucleotides: (*a, c*) – after aging; (*b, d*) – after treatment with TCEP

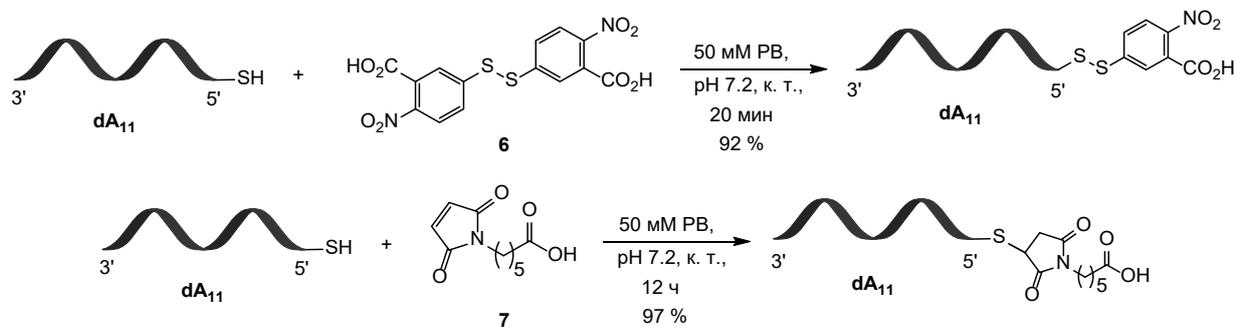


Рис. 4. Схемы реакций 5'-тиолсодержащих ДНК-олигонуклеотидов с тиол-специфичными реагентами  
Fig. 4. Reaction schemes of 5'-thiol-containing DNA-oligonucleotides with thiol-specific reagents

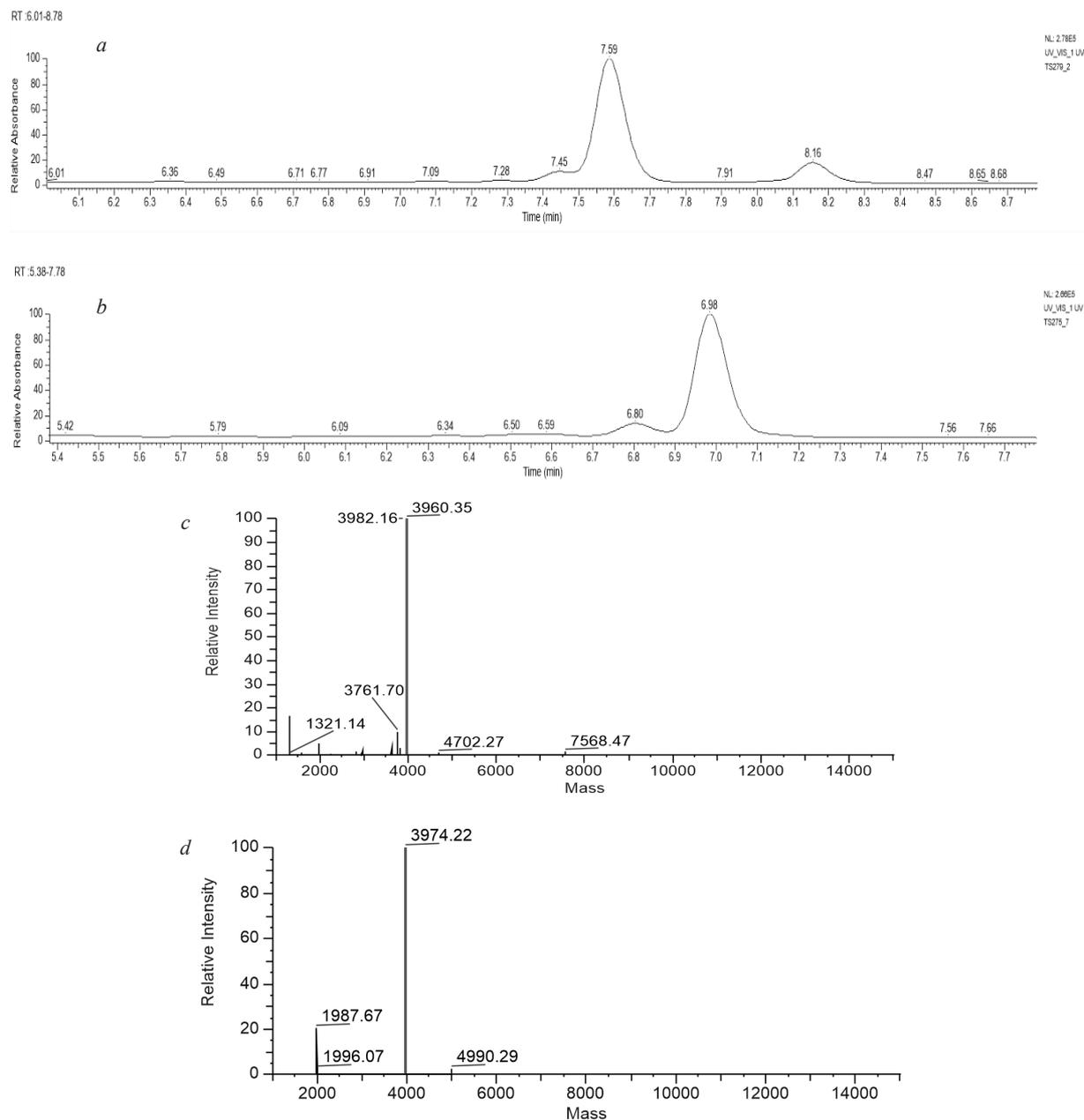


Рис. 5. Хроматограммы (a, b) и масс-спектры (c, d) тиолсодержащих ДНК-олигонуклеотидов после модификации: (a, c) реагентом 6; (b, d) реагентом 7

Fig. 5. Chromatograms (a, b) and mass spectra (c, d) of thiol-bearing DNA-oligonucleotides after modification: (a, c) – with reagent 6; (b, d) – with reagent 7

**Заключение.** Был синтезирован новый фосфорамидитный реагент для введения тиольной группы в олигонуклеотиды в условиях автоматического олигонуклеотидного синтеза. С использованием нового реагента успешно были получены ДНК-олигонуклеотиды, модифицированные тиольными группами по 5'-положению. Было показано, что в результате хранения тиольные группы в олигонуклеотидах способны к образованию дисульфидных связей. Продемонстрирована возможность модификации полученных олигонуклеотидов тиол-специфичными реагентами после восстановления дисульфидных групп до тиольных. Полученные конъюгаты были очищены гель-фильтрацией и охарактеризованы с помощью ВЭЖХ-МС.

**Благодарности.** Работа была выполнена при поддержке гранта БРФФИ-РФФИ (договор № X21PM-107).

**Acknowledgements.** The work was supported by BRFFR-RFFR (agreement № X21PM-107).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Connolly, B. A. Chemical synthesis of oligonucleotides containing a free sulphhydryl group and subsequent attachment of thiol specific probes / B. A. Connolly, P. Rider // *Nucleic Acids Res.* – 1985. – Vol. 13, № 12. – P. 4485–4502. <https://doi.org/10.1093/nar/13.12.4485>
2. Beaucage, S. L. The functionalization of oligonucleotides via phosphoramidite derivatives / S. L. Beaucage, R. P. Iyer // *Tetrahedron.* – 1993. – Vol. 49, № 10. – P. 1925–1963. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)86295-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86295-5)
3. Preparation of enzyme-conjugated DNA probe and application to the universal probe system / S. Nakagami [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1991. – Vol. 198, № 1. – P. 75–79. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90508-q](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90508-q)
4. Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugate hybridization probes / S. S. Ghosh [et al.] // *Bioconjugate Chem.* – 1990. – Vol. 1, № 1. – P. 71–76. <https://doi.org/10.1021/bc00001a009>
5. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles / L. M. Demers [et al.] // *Anal. Chem.* – 2000. – Vol. 72, № 22. – P. 5535–5541. <https://doi.org/10.1021/ac0006627>
6. Lee, J. S. Colorimetric detection of mercuric ion (Hg<sup>2+</sup>) in aqueous media using DNA-functionalized gold nanoparticles / J. S. Lee, M. S. Han, C. A. Mirkin // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2007. – Vol. 46, № 22. – P. 4093–4096. <https://doi.org/10.1002/anie.200700269>
7. Armarego, W. L. F. Purification of laboratory chemicals / W. L. F. Armarego, C. L. L. Chai. – 6<sup>th</sup> ed. – Burlington: Butterworth-Heinemann, Elsevier Inc., 2009. – 752 p.
8. Bannwarth, W. A simple and effective chemical phosphorylation procedure for biomolecules / W. Bannwarth, A. Trzeciak // *Helv. Chim. Acta.* – 1987. – Vol. 70, № 1. – P. 175–186. <https://doi.org/10.1002/hlca.19870700122>
9. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method / M. H. Caruthers [et al.] // *Methods Enzymol.* – 1987. – Vol. 154. – P. 287–313. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)54081-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)54081-2)
10. Phosphoramidite reagents and solid-phase supports based on hydroxyprolinol for the synthesis of modified oligonucleotides / M. Yu. Tatulchenkov [et al.] // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2017. – Vol. 43, № 4. – P. 386–396. <https://doi.org/10.1134/s1068162017040148>
11. Streck, R. Solvent effects on infrared, <sup>13</sup>C and <sup>31</sup>P NMR spectra of trimethyl phosphate: Part I. Single solvent systems / R. Streck, A. J. Barnes // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 1999. – Vol. 55, № 5. – P. 1049–1057. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(98\)00277-7](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(98)00277-7)
12. Tecilla, P. Synthetic hydrogen bonding receptors as models of transacylase enzymes / P. Tecilla, V. Jubian, A. D. Hamilton // *Tetrahedron.* – 1995. – Vol. 51, № 2. – P. 435–448. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(94\)00907-C](https://doi.org/10.1016/0040-4020(94)00907-C)
13. Azide phosphoramidite in direct synthesis of azide-modified oligonucleotides / M. A. Fomich [et al.] // *Org. Lett.* – 2014. – Vol. 16, № 17. – P. 4590–4593. <https://doi.org/10.1021/ol502155g>

## References

1. Connolly B. A., Rider P. Chemical synthesis of oligonucleotides containing a free sulphhydryl group and subsequent attachment of thiol specific probes. *Nucleic Acids Research*, 1985, vol. 13, no. 12, pp. 4485–4502. <https://doi.org/10.1093/nar/13.12.4485>
2. Beaucage S. L., Iyer R. P. The functionalization of oligonucleotides via phosphoramidite derivatives. *Tetrahedron*, 1993, vol. 49, no. 10, pp. 1925–1963. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)86295-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86295-5)
3. Nakagami S., Matsunaga H., Oka N., Yamane A. Preparation of enzyme-conjugated DNA probe and application to the universal probe system. *Analytical Biochemistry*, 1991, vol. 198, no. 1, pp. 75–79. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90508-q](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90508-q)
4. Ghosh S. S., Kao P. M., McCue A. W., Chappelle H. L. Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugate hybridization probes. *Bioconjugate Chemistry*, 1990, vol. 1, no. 1, pp. 71–76. <https://doi.org/10.1021/bc00001a009>
5. Demers L. M., Mirkin C. A., Mucic R. C., Reynolds R. A. 3<sup>rd</sup>, Letsinger R. L., Elghanian R., Viswanadham G. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 2000, vol. 72, no. 22, pp. 5535–5541. <https://doi.org/10.1021/ac0006627>
6. Lee J. S., Han M. S., Mirkin C. A. Colorimetric detection of mercuric ion (Hg<sup>2+</sup>) in aqueous media using DNA-functionalized gold nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, vol. 46, no. 22, pp. 4093–4096. <https://doi.org/10.1002/anie.200700269>
7. Armarego W. L. F., Chai C. L. L. *Purification of laboratory chemicals*. 6<sup>th</sup> ed. Burlington, Butterworth-Heinemann, Elsevier Inc., 2009. 752 p.
8. Bannwarth W., Trzeciak A. A simple and effective chemical phosphorylation procedure for biomolecules. *Helvetica Chimica Acta*, 1987, vol. 70, no. 1, pp. 175–186. <https://doi.org/10.1002/hlca.19870700122>
9. Caruthers M. H., Barone A. D., Beaucage S. L., Dodds D. R., Fisher E. F., McBride L. J., Matteucci M., Stabinsky Z., Tang J.-Y. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. *Methods in Enzymology*, 1987, vol. 154, pp. 287–313. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)54081-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)54081-2)
10. Tatulchenkov M. Yu., Prokhorenko I. A., Kvach M. V., Navakouski M. E., Stepanova I. A., Pilchenko N. V., Gontarev S. V., Sharko O. L., Korshun V. A., Shmanai V. V. Phosphoramidite reagents and solid-phase supports based

on hydroxyprolinol for the synthesis of modified oligonucleotides. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2017, vol. 43, no. 4, pp. 386–396. <https://doi.org/10.1134/s1068162017040148>

11. Streck R., Barnes A. J. Solvent effects on infrared,  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of trimethyl phosphate: Part 1. Single solvent systems. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1999, vol. 55, no. 5, pp. 1049–1057. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(98\)00277-7](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(98)00277-7)

12. Tecilla P., Jubian V., Hamilton A. D. Synthetic hydrogen bonding receptors as models of transacylase enzymes. *Tetrahedron*, 1995, vol. 51, no. 2, pp. 435–448. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(94\)00907-C](https://doi.org/10.1016/0040-4020(94)00907-C)

13. 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. <https://doi.org/10.1021/ol502155g>

### Информация об авторах

*Ламекина Юлия Петровна* – научный сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [yplamekina@gmail.com](mailto:yplamekina@gmail.com)

*Северинчик Татьяна Петровна* – научный сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [tanyaseverinchik@gmail.com](mailto:tanyaseverinchik@gmail.com)

*Улащик Егор Александрович* – научный сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [ulaschick@gmail.com](mailto:ulaschick@gmail.com)

*Ахлამёнок Татьяна Петровна* – младший научный сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [t.akhlamionak@gmail.com](mailto:t.akhlamionak@gmail.com)

*Борищук Полина Юрьевна* – младший научный сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [contact.polina@yandex.by](mailto:contact.polina@yandex.by)

*Ронищенко Богдан Вячеславович* – кандидат химических наук, научный сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [ranishenka@gmail.com](mailto:ranishenka@gmail.com)

*Шманай Вадим Владимирович* – кандидат химических наук, заведующий лабораторией. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [shmanai@ifoch.bas-net.by](mailto:shmanai@ifoch.bas-net.by)

### Information about the authors

*Lamekina Yuliya P.* – Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [yplamekina@gmail.com](mailto:yplamekina@gmail.com)

*Seviarynchik Tatsiana P.* – Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [tanyaseverinchik@gmail.com](mailto:tanyaseverinchik@gmail.com)

*Ulashchik Egor A.* – Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [ulaschick@gmail.com](mailto:ulaschick@gmail.com)

*Akhlamionok Tatsiana P.* – Junior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [t.akhlamionak@gmail.com](mailto:t.akhlamionak@gmail.com)

*Baryshchuk Palina Y.* – Junior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [contact.polina@yandex.by](mailto:contact.polina@yandex.by)

*Ranishenka Bahdan V.* – Ph. D. (Chemistry), Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [ranishenka@gmail.com](mailto:ranishenka@gmail.com)

*Shmanai Vadim V.* – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory. 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](mailto:shmanai@ifoch.bas-net.by)