

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ КЛИК-ХИМИИ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

В.В. Северов, А.М. Варижук, Г.Е. Позмогова

ФГБУ «НИИ физико-химической медицины ФМБА» России, Москва

E-mail: pozmge@gmail.com

В обзоре представлен анализ последних достижений в области методов конъюгации биополимеров, получивших общее название click chemistry (клик-химия). Новые возможности и перспективы использования этого подхода для изучения биологических систем продемонстрированы на ряде примеров. Рассмотрены: синтез диагностически- и терапевтически значимых производных ДНК, структурно-функциональные исследования биополимеров и механизмов биохимических реакций, а также сборка наноструктур и клеточных ассоциатов.

Ключевые слова: модификация ДНК, азид-алкиновое циклоприсоединение, триазолсодержащие олигонуклеотиды.

Key words: DNA modification, CuAAC, triazole-containing oligonucleotides.

Введение

Значительный прогресс в развитии современных диагностических подходов в медицине связан с использованием модифицированных фрагментов полинуклеотидов (ДНК-диагностика), нуклеопротеиновых, белковых и других биоконъюгатов (например, иммуно-ПЦР, ИФА и др.). Биополимеры, иммобилизованные на твердой фазе, играют особую роль в таких областях, как биомедицинская химия, эффективная медицина и ДНК-чип-технология. Однако круг химических превращений, соответствующих жестким требованиям проведения реакций с участием биомолекул, ограничен. Одна из основных проблем, препятствующих расширению области применения модифицированных биополимеров в биологии и медицине, состоит в низкой эффективности и избирательности реакций конденсации. В этой связи неподдельный интерес вызвала разработка новых методов конъюгации, получивших общее название click chemistry (клик-химия). Среди привлекательных черт методов клик-химии следует отметить мягкие условия конденсации, высокую эффективность и избирательность.

Классическим примером клик-реакции может служить азид-алкиновое циклоприсоединение с образованием

1,2,3-триазолов (рис.1), CuAAC (Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition), катализируемое солями меди (I). Несмотря на то что общий подход к 1,3-диполярному циклоприсоединению был предложен еще в середине XX в. [1, 2], его широкое использование для биомолекул стало возможным только в последние годы.

Важным шагом оказалось обнаружение каталитических свойств солей Cu(I) [3, 4], их использование позволило снизить температуру процесса и существенно сократить время протекания реакции. Однако оказалось, что соли одновалентной меди могут приводить к значительной деградации биополимеров – в первую очередь полинуклеотидных цепей [5, 6]. Резко снизить накопление побочных продуктов при CuAAC с участием ДНК удалось с помощью замены солей меди на ее комплексы с хелатирующими лигандами. Среди них наиболее популярны сегодня трис(бензилтриазилилметил)амин (ТВТА) [7–9], сульфированный батофенантролин [9, 10], бензимидазолные производные [11, 12], а также о-фенилендиамин [13].

В настоящее время ведется поиск реагентов, позволяющих полностью отказаться от катализа реакции Cu(I). Возможность клик-конъюгации в отсутствие ионов меди, например, была продемон-

стрирована взаимодействием азидов с циклооктинами [14]. Реакция с участием напряженных циклоалкинов проходит с меньшей в сравнении с CuAAC эффективностью. В то же время ее использование значительно снижает токсичность проведения модификации и перспективно для исследований *in vivo*.

Следует отметить, что концепция клик-химии объединяет несколько типов конъюгации: азид-алкиновое циклоприсоединение, реакцию Штаудингера и ряд других. В области химии биополимеров под клик-реакцией обычно принято понимать взаимодействие азидов с алкинами, приводящее к получению замещенных триазолов (см. рис. 1).

Химические аспекты применения клик-химии для получения всевозможных биоконъюгатов, лигирования, фиксации на твердой фазе, маркирования и модификации нуклеиновых кислот, их фрагментов и компонентов достаточно полно освещены в ряде обзоров последних лет [15–18].

Поскольку получение ковалентных конъюгатов поли/олигонуклеотидов и модифицированных фрагментов ДНК представляют несомненный интерес для биотехнологии, диагностики и медицины, важно проанализировать новые возможности и перспективы использования клик-химии ДНК в медико-биологических исследованиях.

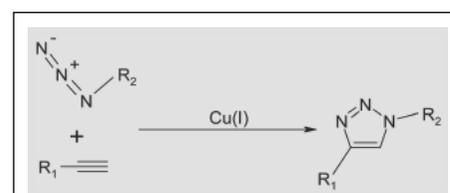


Рис. 1. Схема реакции Cu(I)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC)

Среди широкого круга работ, посвященных медико-биологическим аспектам применения клик-химии с участием нуклеиновых кислот, можно выделить ряд основных направлений: исследование супрамолекулярных структур, состоящих из фрагментов полинуклеотидов; создание новых видов диагностических и терапевтических агентов и исследование их эффективности и биосовместимости.

Задача настоящего обзора состоит в анализе последних достижений клик-химии в области нуклеиновых кислот и их фрагментов и перспектив использования этого подхода в медико-биологических исследованиях.

Диагностические и терапевтические агенты на основе клик-модифицированных фрагментов/компонентов ДНК

К терапевтическим агентам, получаемым методами клик-химии из компонентов нуклеиновых кислот, относятся в первую очередь *триазолсодержащие нуклеозиды*. Многие из них продемонстрировали высокую антибактериальную и противовирусную активность. Примерами таких соединений являются аналоги нуклеозидов триазольного ряда, обладающих активностью в отношении вирусов коровьей оспы (соединение 1, рис. 2) [19, 20] и табачной мозаики (соединение 2, см. рис. 2) [21, 22].

Использование клик-лигирования позволяет применять прием дендримеризации для конструирования соединений, потенциально обладающих пролонгирующим действием. Показано, например, что разветвленные структуры 3 (см. рис. 2), полученные в результате взаимодействия азидотимидина с алкильными линкерами, обладают противобактериальной активностью [23].

Особый интерес для моделирования свойств известных и синтеза новых биологически активных соединений направленного действия представляют *триазолсодержащие конъюгаты нуклеозидов* с заместителями различной природы.

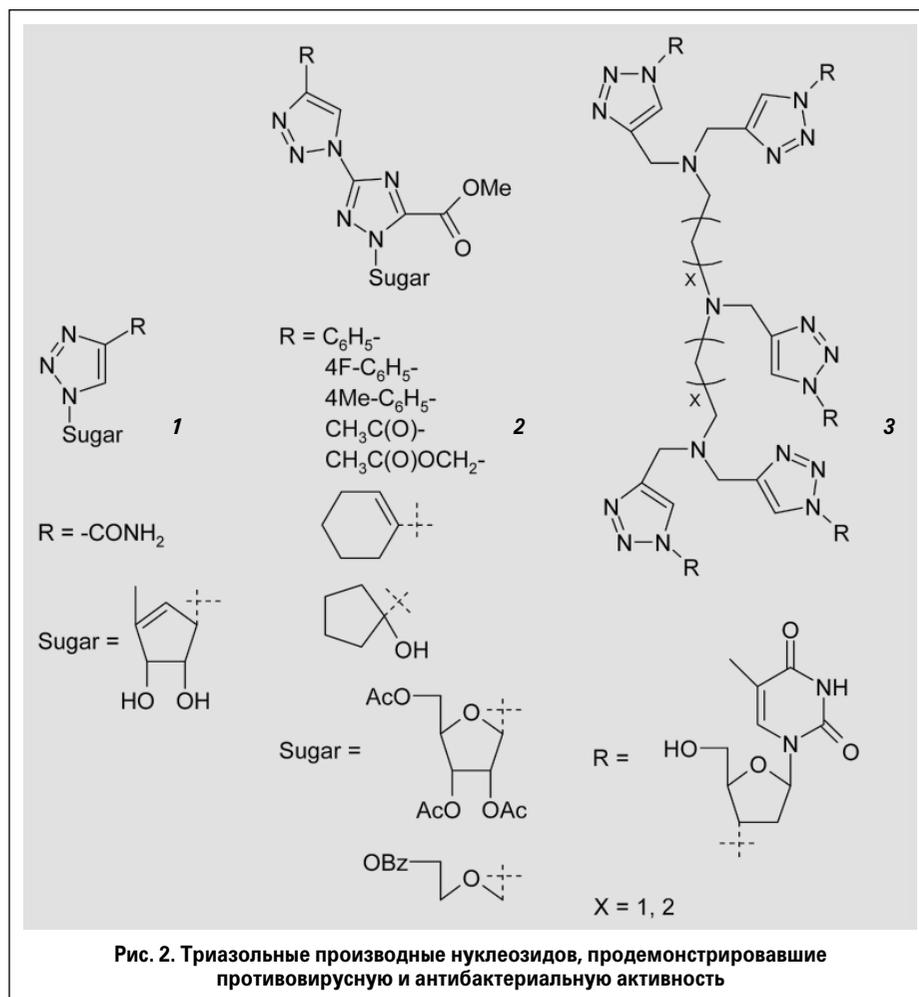
Нуклеозиды, присоединенные клик-лигированием к карборанам и металлокарборанам, рассматриваются как потенциальные агенты борнейтронзахватной терапии опухолей [24, 25].

Введение нуклеозидных заместителей в состав антибиотика плеромитилина (pleuromitilin) привело к повышению его активности и избирательности. Полученные конъюгаты продемонстрировали более высокое сродство к пептидилтрансферазному центру 50S субъединицы рибосом в сравнении с плеромитилином [26].

Помимо триазолсодержащих нуклеозидов перспективу терапевтического применения имеют триазольные аналоги олигонуклеотидов и *пептидо-олигонуклеотиды*. Локальная триазольная межнуклеотидная модификация сахара-фосфатного остова олигонуклеотидов в ряде случаев не препятствует *гибридизационным взаимодействиям* с молекулярными мишенями [27–29], поэтому такие модифицированные аналоги ДНК изучаются как возможные регуляторы генной экспрессии (антисмысловые олигонуклеотиды). Пептид-олигонуклеотиды рассматриваются как потенциальные вы-

сокоселективные мембранотропные регуляторы метаболизма, и простота проведения клик-реакции наряду с высокими выходами конденсации сделали этот метод одним из наиболее популярных способов синтеза таких соединений [30].

Значительная часть современных биоаналитических методов, в частности технология ДНК-чипов, основана на использовании гетерофазных систем. Применение CuAAC-иммобилизации олигонуклеотидов на подложке позволило сегодня не только воспроизводимо получать необходимую плотность молекул в поверхностном слое [31], но и разрабатывать новые высокотехнологичные методы сборки чипов. Недавно Rozkiewicz и соавт. был предложен вариант клик-иммобилизации ДНК без Cu(I)-катализа [32]. Циклоприсоединение в данном варианте осуществляется при давлении полидиметилсилоксанового штампа, покрытого алкинмодифицированной НК, на стекло с привитыми азидными группами.



Примером нетривиального использования ДНК-чипов, расширяющим возможности комбинаторной химии, может служить создание так называемых углеводных чипов для изучения взаимодействия олигосахаридов с лектинами [33–35]. В основе их получения лежит гибридационная иммобилизация на ДНК-чипах конъюгатов олигонуклеотидов с олигосахаридами, полученных в результате реакции азид-алкинового циклоприсоединения.

Приемы клик-химии вносят заметный вклад и в развитие технологии ПЦР – одной из ключевых составляющих множества диагностических и исследовательских методов.

Для ПЦР в реальном масштабе времени наиболее привлекательная сторона использования клик-химии связана с возможностью синтеза новых ДНК-зондов. Стабильность алкинов в условиях автоматического синтеза олигонуклеотидов и постсинтетических обработок позволяет вводить алкинсодержащие звенья в любую позицию фрагмента полинуклеотида в процессе элонгации цепи. На сегодняшний день коммерчески доступны алкинсодержащие амидофосфитные производные различного строения [16]. Разработаны стратегии синтеза, позволяющие с помощью клик-реакции вводить в состав одной ДНК-молекулы несколько различных меток или функциональных групп [36]. Высокая эффективность клик-конденсации

синтетических алкин-олигонуклеотидов с азидсодержащими красителями и гасителями флуоресценции расширяет возможности создания мультиплексных систем ПЦР-диагностики наследственных и инфекционных заболеваний.

Альтернативным способом введения в состав полинуклеотидов функциональных групп для последующей клик-конъюгации или маркирования ДНК является проведение ПЦР с азид- или алкинсодержащими нуклеозидтрифосфатами [37]. Показано, что наиболее эффективно Таq-полимеразой включаются нуклеозидтрифосфаты 5-азид-/алкин-замещенных производных дезоксиуридина.

В отдельное направление можно выделить исследования влияния триазольных межнуклеотидных модификаций на темплатные свойства ДНК в условиях ферментативных реакций.

Для двух типов триазолсодержащих аналогов олигонуклеотидов была показана возможность их использования в качестве ПЦР-матриц. Браун и соавт. исследовали поведение олигонуклеотидов с двумя различными триазольными межнуклеотидными линкерами [38, 39] (структура модифицированных звеньев приведена на рис. 3).

Показано, что олигомеры с триазольным линкером X (см. рис. 3) успешно амплифицируются полимеразой Pfu, GoTaq и фрагментом Кленова, в то время как продукты амплификации аналогов,

несущих триазольный линкер большей длины (Y на рис. 3), содержат делецию аденина в соответствующей позиции. Вероятно, фермент не способен распознать оба нуклеотида в составе дитимидинового фрагмента с модификацией Y.

Несмотря на многообразие известных модификаций межнуклеотидных связей, не препятствующих проведению ПЦР, большое значение придается именно ПЦР на триазолсодержащей матрице, которая может быть получена клик-лигированием олигонуклеотидов. Внимание исследователей к данной проблеме обусловлено тем, что эффективное химическое лигирование с последующей амплификацией теоретически позволяет получать многокопийные полинуклеотидные конструкции, в том числе из повторяющихся фрагментов. Ферментативное лигирование в случае совпадающих фрагментов привело бы к набору полинуклеотидов разной длины, тогда как химическое лигирование создает возможность контролируемой сборки за счет чередования стадий активации и собственно присоединения.

Особый интерес представляет клик-лигирование с последующей амплификацией *in vivo*. Для олигонуклеотидов с модификацией X (см. рис. 3) помимо ПЦР-амплификации доказана возможность *in vivo* репликации [39] и *in vitro* транскрипции [40].

В *in vivo* экспериментах [39] Браун и соавт. продемонстрировали совместимость триазолмодифицированной ДНК с клеточным аппаратом *E. coli*. Триазолсодержащие фрагменты встраивали в плазмидную ДНК в области гена устойчивости к антибиотику, клонировали плазмиду в *E. coli* и по выживаемости колоний в среде с антибиотиком судили о функциональности модифицированного гена. Правильность репликации (отсутствие замен, делеций в области триазольного фрагмента) подтверждали данными секвенирования клонированных плазмид.

In vitro транскрипцию триазольных олигонуклеотидов изучали на 83-мерах РНК; в эксперименте использовали РНК-полимеразу T7. Примечательно, что триазольная замена в кодирующей области матрицы не препятствовала транскрипции, тогда как модификация промотора блокировала синтез РНК. Можно предположить, что фермент более чувствителен

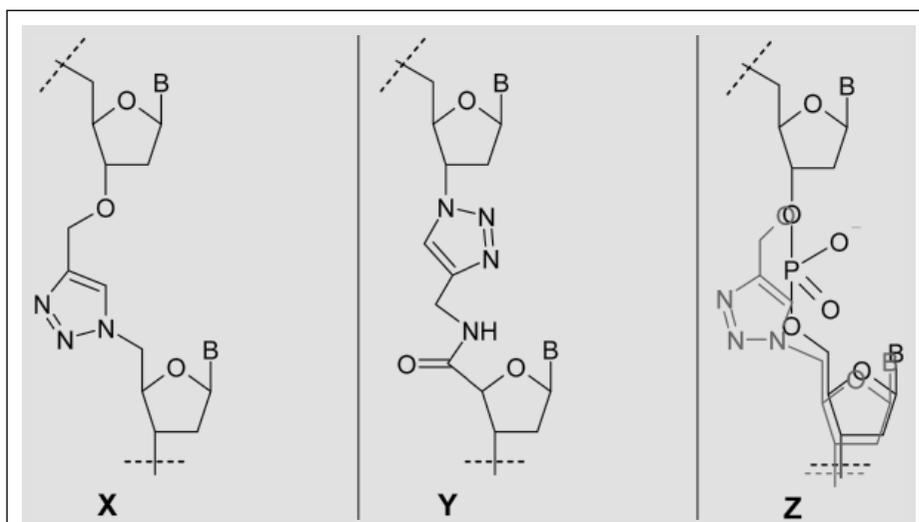


Рис. 3. Структура триазольных межнуклеотидных линкеров. X, Y – фрагменты олигонуклеотидов с триазольной модификацией, для которых показана возможность ПЦР-амплификации; Z – наложение структур динуклеотидных фрагментов с триазольным и фосфодизфирным линкерами

к локальным изменениям структуры в промотерной области.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что триазолсодержащие аналоги олигонуклеотидов сохраняют многие функциональные свойства ДНК в биосистемах [39].

Изучение влияния структуры триазольного линкера в составе олигонуклеотидов на функциональные свойства фрагментов полинуклеотидов стало проводиться лишь в последние годы, поэтому литературные данные по этому вопросу весьма ограничены. Работы Брауна и соавт. [38–40] являются единственным на сегодняшний день примером последовательного, поэтапного исследования в данной области. К сожалению, предложенные ими модификации межнуклеотидных связей (X и Y на рис. 3) вызывают локальное нарушение структуры и, следовательно, дестабилизацию ДНК-дуплексов ввиду большей длины триазольного межнуклеотидного линкера по сравнению с природным фосфодиэфирным (Z на рис. 3). В этой связи представляется целесообразным исследование биофункциональности других триазолсодержащих олигомеров с более короткими триазольными линкерами, описанных Isobe и соавт. [28], Nuzzi и соавт. [41] и др. Для таких олигомеров известны лишь отдельные физико-химические характеристики; сравнение их с природными НК проводилось только на основании гибридационных данных. Между тем обоснованной оценке перспектив медико-биологического применения таких соединений должны предшествовать накопление и анализ данных по их мембранотропности, скорости нуклеазного расщепления и другим параметрам, определяющим эффективность функционирования синтетических НК в биосистемах.

Всестороннее изучение свойств триазольных аналогов НК тем более актуально, что основные нетриазольные аналоги НК с межнуклеотидными модификациями (пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК), тиофосфонаты и С-фосфонаты [42–47]), отвечающие требованиям биостабильности и высокой гибридационной способности, имеют ограничения. ПНК склонны к самоагрегации, и лишь отдельные представители данного типа аналогов демонстрируют удовлетворительную

мембранотропность. С-фосфонаты не нашли практического применения ввиду сложности их синтеза, связанной с необходимостью обеспечения оптической чистоты, а тио-аналоги характеризуются достаточно высокой токсичностью.

Таким образом, работы по изучению биосовместимости, токсичности и устойчивости к биодegradации триазолсодержащих производных нуклеозидов, олиго- и полинуклеотидов только начинаются. В то же время их уже известные характеристики (низкая токсичность и биостабильность триазолов) в сочетании с региоселективностью и эффективностью клик-конденсации обуславливают чрезвычайную привлекательность клик-реакции для разработки новых биоаналитических методов, диагностикумов и лекарственных средств.

Применение методов клик-химии для изучения неканонических структур ДНК и внутриклеточных процессов с участием нуклеиновых кислот

Четырехцепочечные структуры, образуемые G-богатыми фрагментами ДНК (G-квадруплексы, GQ), активно изучаются последние годы [48–51]. Интерес к исследованию GQ-структур связан с частой встречаемостью таких фрагментов в геноме (теломерных повторах, промотерах онкогенов), их предполагаемой биологической ролью (участие в поддержании целостности теломер и др.) и потенциальной возможностью использования отдельных квадруплексов как мишеней для противоопухолевых агентов. Клик-реакция азидов и алкинов на концах синтетических G-богатых олигонуклеотидов рассматривается как способ фиксации G-квадруплексов (внутримолекулярных и межмолекулярных, параллельных и антипараллельных) и является альтернативой таким традиционным методам изучения неканонических структур ДНК, как ЯМР, РСА и методы на основе FRET (рис. 4). В то время как методами ЯМР и FRET могут быть получены усредненные данные, фиксация за счет клик-лигирования позволяет выявлять конкретные структуры, реализующиеся в растворе. С помощью клик-реакции была продемонстрирована возможность образования гибридных ДНК/РНК-квадруплексов, содержащих теломерные последовательности чело-

века [52]. Циклоприсоединение азидных и алкиновых групп на концах теломерных дезокси- и рибо-олигомеров протекало в отсутствие катализатора. Это возможно лишь при условии пространственной близости взаимодействующих групп, на основании чего авторы сделали вывод о существовании димерных ДНК/РНК-квадруплексов. Структуры таких квадруплексов были впоследствии подтверждены данными ВЭЖХ и MALDI TOF масс-спектрометрии.

Вышеописанный метод, как и большинство традиционных методов изучения неканонических форм НК, применим исключительно для *in vitro* исследований. Вопрос о существовании ряда ДНК-триплексов и квадруплексов *in vivo* остается открытым.

Можно ожидать, что разработки в области клик-химии внесут весомый вклад в развитие методов *in vivo* исследования структур ДНК и внутриклеточных процессов, поскольку такие методы часто основаны на маркировании ДНК. За последние несколько лет предложены эффективные методы постсинтетического клик-маркирования НК. Их недостатком является необходимость предварительной функционализации, а очевидными преимуществами – избирательность и возможность введения функциональных групп в ходе ферментативного синтеза НК с применением азид- или алкин-содержащих субстратов (производных нуклеозидтрифосфатов).

Примером использования клик-маркирования для изучения *in vivo* процессов с участием НК является метод контроля синтеза ДНК в активно пролиферирующих клетках, предложенный Salic и соавт. (см. рис. 4). В основе метода лежит встраивание в растущие цепи ДНК 5-этинилдезоксисуридина в ходе репликации и последующее инкубирование образца с азидсодержащими флуорофорами (маркирование) [53]. В традиционных методах используют радиоактивно меченный тимидин или 5-бромдезоксисуридин, ДНК детектируют соответственно радиографически или иммунологически. Недостатками радиографического метода являются трудоемкость, продолжительность анализа и низкое разрешение получаемых микрофотографий. Ограничения иммунологического метода связа-

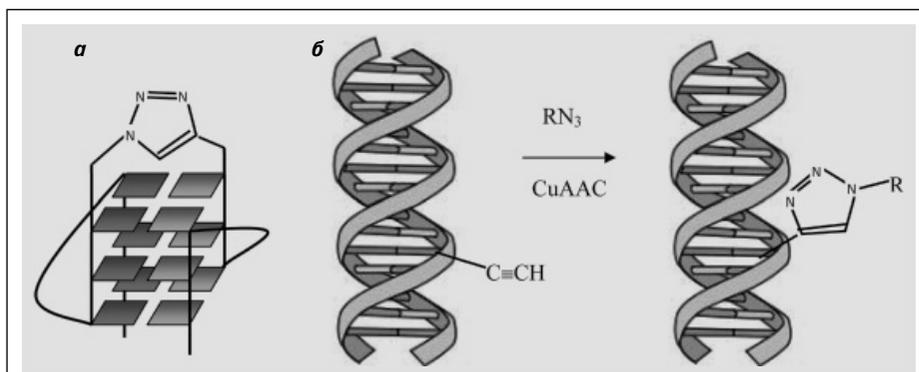


Рис. 4. Применение клик-реакции для *in vivo* мечения ДНК и детектирования неканонических ДНК-структур. А – схематическое изображение гибридного G-квадруплекса, продукта циклоприсоединения модифицированных человеческих теломерных РНК и ДНК. Б – введение репортерных групп в синтезируемую ДНК по реакции азид-алкинового циклоприсоединения (ДНК содержит остатки 5-этинилдезоксисуридина); R – флуорофор, гаптен и др.

ционализированных олигонуклеотидами, приводит к получению трехмерных микротканей с запрограммированной клеточной совместимостью. Создание межклеточных контактов является актуальной задачей тканевой инженерии, а использование специфической гибридизации олигонуклеотидов представляется перспективным подходом к ее решению. Присоединение олигонуклеотидов к клеточным мембранам авторы проводили различными методами. Наиболее успешными среди них оказались способ аффинной иммобилизации конъюгатов олигонуклеотидов со стрептавидином за счет взаимодействия с биотинилированными мембранными белками [59] и подход, основанный на нековалентной инкорпорации жирнокислотных производных ДНК в липидный бислой мембраны клетки [60]. В одной из последних работ присоединение осуществляли методами клик-химии (реакция Штаудингера и циклоприсоединение азидов к циклооктинам – см. рис. 6) [61]. Для этого при культивировании клеток в питательную среду добавляли N-азидоацетилманнозамин, что приводило к экспонированию азидосиаловой кислоты на клеточной поверхности. При лигировании по методу Штаудингера к клеточной культуре добавляли фосфин-содержащие одноцепочечные ДНК. В случае азид-алкинового циклоприсоединения в некатализируемом варианте добавляли олигонуклеотиды, конъюгированные с дифторциклооктинами. Следует отметить, что оба метода оказались достаточно эффективными.

С открытием реакции CuAAC связано ускорение развития ряда направлений в химии нуклеиновых кислот в последнее десятилетие. Новые методы маркирования, функционализации и конъюгации олигонуклеотидов, основанные на реакции азид-алкинового циклоприсоединения, открывают дополнительные возможности создания конструкторов для адресной доставки фрагментов ДНК, сборки наноструктур на основе ДНК и т.д. Получаемые с помощью CuAAC модифицированные нуклеозиды и олигонуклеотиды (триазол-содержащие аналоги) имеют перспективы терапевтического и диагностического применения. Накопленные данные о биологической активности триазол-содержа-

ны с необходимостью соблюдения жестких денатурирующих условий, поскольку бромурин, участвующий в комплементарном связывании, недоступен для маркирования. Кроме того, размер антител к бромурину препятствует их проникновению в клетку. Подход к маркированию, основанный на клик-реакции, позволяет снять перечисленные ограничения. Небольшие по объему флуорофоры с азидогруппами достаточно легко проникают в клетку, метод не требует фиксации образца или денатурации ДНК и позволяет визуализировать репликацию ДНК без разрушения структуры хроматина.

гации нуклеиновых кислот, получения разветвленных олигонуклеотидов, введения поперечных шивков в ДНК-дуплексы, триплексы и квадруплексы [16, 54, 55] создает предпосылки для появления новых идей в конструировании наноструктур на базе ДНК.

Примерами полученных за последнее время триазолсодержащих ДНК-наноструктур могут служить катенаны (синтетические аналоги мини-плазмид) [56], гантелеобразные циклические мини-дуплексы для изучения связывания ДНК с антибиотиками и флуоресцирующими интеркаляторами [57, 58] (рис. 5).

Особый тип конструкций, способных к контролируемой самосборке за счет комплементарного связывания фрагментов ДНК, – клеточные структуры с олигонуклеотидами на внешней поверхности. Фактически сборка клеток, функ-

Сборка ДНК-наноструктур и клеточных ассоциатов

с использованием клик-реакции

Разработка эффективных методов клик-лигирования, циклизации и конъю-

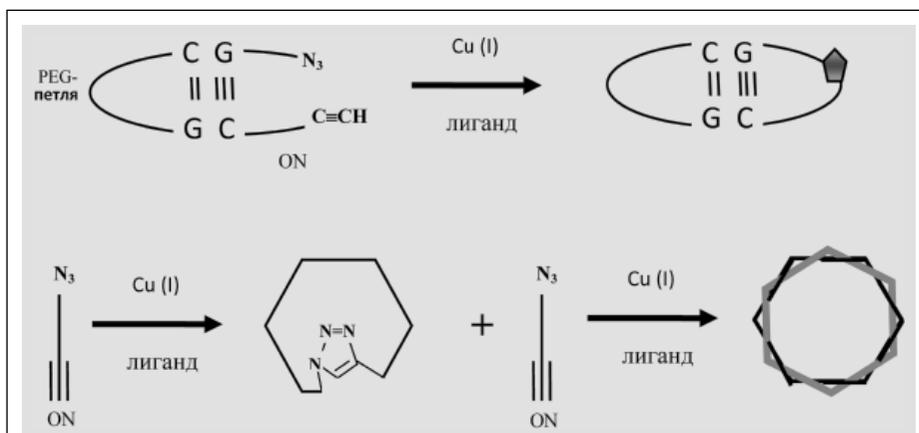


Рис. 5. Клик-циклизация олигонуклеотидов, приводящая к ДНК-мини-дуплексам (верхняя схема) и катенанам (нижняя схема). PEG = полиэтиленгликоль; ON = олигонуклеотид

щих производных нуклеозидов и олигонуклеотидов позволяют рассматривать их как потенциальных противовирусных, антибактериальных и противоопухолевых агентов. Однако для всесторонней оценки возможности использования таких соединений в биологических системах необходимы дальнейшие исследования их биостабильности, токсичности. Таким образом, к настоящему времени достигнуты значительные успехи в синтезе и модификации нуклеиновых кислот, а также их компонентов методами климими. Тем не менее отдельные вопросы, связанные с биологическим применением новых соединений, остаются открытыми, поэтому работы в данной области продолжаются.

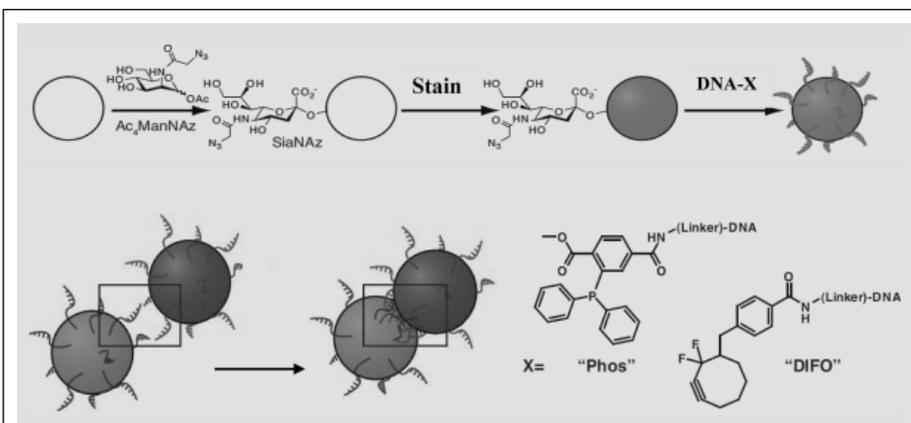


Рис. 6. Функционализация поверхности клеток азидогруппами, присоединение фосфинсодержащих (X = Phos, реакция Штаудингера) или дифторциклооктинсодержащих (X = DIFO, азид-алкильное циклоприсоединение в некатализируемом варианте) одноцепочечных ДНК и сборка микротканей с запрограммированной клеточной совместимостью [61]

ЛИТЕРАТУРА

- Huisgen, R., 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1963. 2(10): p. 565–598.
- Huisgen, R., Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1963. 2(11): p. 633–645.
- Rostovtsev, V.V., et al., A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002. 41(14): p. 2596–2599.
- Tornøe, C.W., C. Christensen, and M. Meldal, Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry*, 2002. 67(9): p. 3057–3064.
- Burrows, C.J. and J.G. Muller, Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chemical Reviews*, 1998. 98(3): p. 1109–1152.
- Thyagarajan, S., et al., Selective DNA Strand Scission with Binuclear Copper Complexes: Implications for an Active Cu₂O₂ Species. *Journal of the American Chemical Society*, 2006. 128(21): p. 7003–7008.
- Wang, Q., et al., Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. 125(11): p. 3192–3193.
- Chan, T.R., et al., Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Organic Letters*, 2004. 6(17): p. 2853–2855.
- Lewis, W.G., et al., Discovery and Characterization of Catalysts for Azide-Alkyne Cycloaddition by Fluorescence Quenching. *Journal of the American Chemical Society*, 2004. 126(30): p. 9152–9153.
- Gupta, S.S., et al., Accelerated Bioorthogonal Conjugation: A Practical Method for the Ligation of Diverse Functional Molecules to a Polyvalent Virus Scaffold. *Bioconjugate Chemistry*, 2005. 16(6): p. 1572–1579.
- Rodionov, V.O., et al., Ligand-Accelerated Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition: A Mechanistic Report. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. 129(42): p. 12705–12712.
- Rodionov, V.O., et al., Benzimidazole and Related Ligands for Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. 129(42): p. 12696–12704.
- Baron, A., et al., Phenylendiamine catalysis of click glycosylations in water: practical and direct access to unprotected neoglycoconjugates. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2008. 6(11): p. 1898–1901.
- Agard, N.J., J.A. Prescher, and C.R. Bertozzi, A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J Am Chem Soc*, 2004. 126(46): p. 15046–15047.
- Amblard, F., J.H. Cho, and R.F. Schinazi, Cu(I)-catalyzed Huisgen azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction in nucleoside, nucleotide, and oligonucleotide chemistry. *Chem Rev*, 2009. 109(9): p. 4207–4220.
- Gramlich, P., et al., Postsynthetic DNA Modification through the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008. 47(44): p. 8350–8358.
- El-Sagheer, A.H. and T. Brown, Click chemistry with DNA. *Chem Soc Rev*, 2010. 39(4): p. 1388–1405.
- Устинов, А.В., et al., Модификация нуклеиновых кислот с помощью реакции [3+2]-дипольного циклоприсоединения азидов и алкинов. *Биоорганическая химия*, 2010. 36(4): стр. 437–481.
- Cho, J.H., et al., Synthesis of Cyclopentenyl Carbocyclic Nucleosides as Potential Antiviral Agents Against Orthopoxviruses and SARS. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006. 49(3): p. 1140–1148.
- Perez-Castro, I., et al., Synthesis of 4-substituted-1,2,3-triazole carbanucleoside analogues of ribavirin via click chemistry. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2007. 5(23): p. 3805–3813.
- Xia, Y., et al., Synthesis of bitriazolyl nucleosides and unexpectedly different reactivity of azidotriazole nucleoside isomers in the Huisgen reaction. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2007. 5(11): p. 1695–1701.
- Li, W., et al., Bitriazolyl acyclonucleosides with antiviral activity against tobacco mosaic virus. *Tetrahedron Letters*, 2008. 49(17): p. 2804–2809.
- Jin, P.-Y., et al., Synthesis of Some Novel 1,2,3-Triazole-Fused Oligonucleoside and Oligosaccharide Analogues. *Synlett*, 2007. 2007(EFirst): p. 3003,3006.
- Olejniczak, A., B. Wojtczak, and Z.J. Lesnikowski, 2β-Deoxyadenosine Bearing Hydrophobic Carborane Pharmacophore. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2007. 26(10-12): p. 1611–1613.
- Wojtczak, B.A., et al., “Chemical Ligation”: A Versatile Method for Nucleoside Modification with Boron Clusters. *Chemistry – A European Journal*, 2008. 14(34): p. 10675–10682.
- Lolk, L., et al., A Click Chemistry Approach to Pleuromutilin Conjugates with Nucleosides or Acyclic Nucleoside Derivatives and Their Binding to the Bacterial Ribosome. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008. 51(16): p. 4957–4967.

27. Dondoni, A., et al., Model studies toward the synthesis of dihydropyrimidinyl and pyridyl alpha-amino acids via three-component Biginelli and Hantzsch cyclocondensations. *J Org Chem*, 2003. 68(16): p. 6172-6183.
28. Isobe, H., et al., Triazole-linked analogue of deoxyribonucleic acid ((TL)DNA): design, synthesis, and double-strand formation with natural DNA. *Org Lett*, 2008. 10(17): p. 3729-3732.
29. Varizhuk, A., A. Chizhov, and V. Florentiev, Synthesis and hybridization data of oligonucleotide analogs with triazole internucleotide linkages, potential antiviral and antitumor agents. *Bioorg Chem.*, 2011. 39(3): p. 127-131.
30. Gogoi, K., et al., A versatile method for the preparation of conjugates of peptides with DNA/PNA/analog by employing chemoselective click reaction in water. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(21): p. e139.
31. Devaraj, N.K., et al., Chemoselective Covalent Coupling of Oligonucleotide Probes to Self-Assembled Monolayers. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. 127(24): p. 8600-8601.
32. Rozkiewicz, D.I., et al., Transfer Printing of DNA by "Click" Chemistry. *ChemBiochem*, 2007. 8(16): p. 1997-2002.
33. Bouillon, C., et al., Microwave Assisted Click Chemistry for the Synthesis of Multiple Labeled-Carbohydrate Oligonucleotides on Solid Support. *The Journal of Organic Chemistry*, 2006. 71(12): p. 4700-4702.
34. Chevolut, Y., et al., DNA-Based Carbohydrate Biochips: A Platform for Surface Glyco-Engineering. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007. 46(14): p. 2398-2402.
35. Morvan, F.o., et al., Fucosylated Pentaerythrityl Phosphodiester Oligomers (PePOs): Automated Synthesis of DNA-Based Glycoclusters and Binding to *Pseudomonas aeruginosa* Lectin (PA-IIL). *Bioconjugate Chemistry*, 2007. 18(5): p. 1637-1643.
36. Gramlich, P.M., et al., Click-click-click: single to triple modification of DNA. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008. 47(18): p. 3442-3444.
37. Gierlich, J., et al., Synthesis of highly modified DNA by a combination of PCR with alkyne-bearing triphosphates and click chemistry. *Chemistry*, 2007. 13(34): p. 9486-9494.
38. El-Sagheer, A.H. and T. Brown, Synthesis and polymerase chain reaction amplification of DNA strands containing an unnatural triazole linkage. *J Am Chem Soc*, 2009. 131(11): p. 3958-3964.
39. El-Sagheer, A.H., et al., Biocompatible artificial DNA linker that is read through by DNA polymerases and is functional in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(28): p. 11338-11343.
40. el-Sagheer, A.H. and T. Brown, Efficient RNA synthesis by in vitro transcription of a triazole-modified DNA template. *Chem Commun (Camb)*. 47(44): p. 12057-12058.
41. Nuzzi, A., A. Massi, and A. Dondoni, Model Studies Toward the Synthesis of Thymidine Oligonucleotides with Triazole Internucleosidic Linkages Via Iterative Cu(I)-Promoted Azide-Alkyne Ligation Chemistry. *QSAR & Combinatorial Science*, 2007. 26: p. 1191-1199.
42. Hyrup, B. and P.E. Nielsen, Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg Med Chem*, 1996. 4(1): p. 5-23.
43. Ray, A. and B. Norden, Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J*, 2000. 14(9): p. 1041-1060.
44. Petrova, M., et al., From ribonucleoside 5'-aldehydes to ribonucleoside 5'-C-phosphonates as building blocks for oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 2008(52): p. 591-592.
45. Kralikova, S., et al., Efficient synthesis of 2'-deoxynucleoside 3'-C-phosphonates: reactivity of geminal hydroxyphosphonate moiety. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2000. 19(7): p. 1159-1183.
46. Лукьянова, Т.А. и др., Синтез и масс-спектрометрия олигонуклеотидов, несущих тиофосфорильные модификации заданной локализации. *Биоорганическая химия*, 2008. 34(1): стр. 83-88.
47. Dias, N. and C.A. Stein, Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther*, 2002. 1(5): p. 347-355.
48. Zhou, W., N.J. Brand, and L. Ying, G-quadruplexes-novel mediators of gene function. *J Cardiovasc Transl Res*, 2011. 4(3): p. 256-270.
49. Shahid, R., A. Bugaut, and S. Balasubramanian, The BCL-2 5' untranslated region contains an RNA G-quadruplex-forming motif that modulates protein expression. *Biochemistry*, 2011. 49(38): p. 8300-8306.
50. Raiber, E.A., et al., A non-canonical DNA structure is a binding motif for the transcription factor SP1 in vitro. *Nucleic Acids Res*, 2011.
51. Nambiar, M., et al., Formation of a G-quadruplex at the BCL2 major breakpoint region of the t(14;18) translocation in follicular lymphoma. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(3): p. 936-948.
52. Xu, Y., Y. Suzuki, and M. Komiyama, Click chemistry for the identification of G-quadruplex structures: discovery of a DNA-RNA G-quadruplex. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009. 48(18): p. 3281-3284.
53. Salic, A. and T.J. Mitchison, A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(7): p. 2415-2420.
54. Jawalekar, A.M., et al., Conjugation of nucleosides and oligonucleotides by [3+2] cycloaddition. *J Org Chem*, 2008. 73(1): p. 287-290.
55. Alvira, M. and R. Eritja, Synthesis of oligonucleotides carrying 5'-5' linkages using copper-catalyzed cycloaddition reactions. *Chem Biodivers*, 2007. 4(12): p. 2798-2809.
56. Kumar, R., et al., Template-directed oligonucleotide strand ligation, covalent intramolecular DNA circularization and catenation using click chemistry. *J Am Chem Soc*, 2007. 129(21): p. 6859-6864.
57. El-Sagheer, A.H., et al., A very stable cyclic DNA miniduplex with just two base pairs. *ChemBiochem*, 2008. 9(1): p. 50-52.
58. El-Sagheer, A.H. and T. Brown, Synthesis of alkyne- and azide-modified oligonucleotides and their cyclization by the CuAAC (click) reaction. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, 2008. Chapter 4: p. Unit 4-33.
59. Foster, A.J., R.A. Bird, and S.N. Smith, Biotinylation and characterization of *Cryptococcus neoformans* cell surface proteins. *J Appl Microbiol*, 2007. 103(2): p. 390-399.
60. Borisenko, G.G., et al., DNA modification of live cell surface. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(4): p. e28.
61. Gartner, Z.J. and C.R. Bertozzi, Programmed assembly of 3-dimensional microtissues with defined cellular connectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(12): p. 4606-4610.

SUMMARY

CLICK CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE. TRENDS & PROSPECTS

V.V. Severov, A.M. Varizhuk, G.E. Pozmogova
Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow

Analysis of last achievements in the field of conjugation methods of a biopolymers, which have the general name «click chemistry», is presented. New possibilities and prospects of use of this approach in biological systems and for their studying are shown on a number of examples. Synthesis of diagnostic and therapeutic derivative of DNA, structurally functional researches of biopolymers and mechanisms of biochemical reactions, and also assemblage of nanostructures and cellular associates are described.