

Синтез та вивчення антисенсових олігонуклеотидів, модифікованих імідазофеназиновими нуклеозидами

В. Л. Макітрук, А. С. Шаламай, І. Я. Дубей¹, Д. М. Федоряк¹

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹ Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
Вул. Мурманська, 1, Київ, 02094, Україна

*Н-фосфонатним твердофазним методом отримано модифіковані імідазофеназиновими нуклеозидами по 3'-, 5'- та внутрішніх положеннях олігонуклеотиди, комплементарні до ділянок рибосомного оперона, 16S рРНК мікоплазм та Escherichia coli. Показано, що нуклеозиди імідазо[4,5-*b*]феназину та його 2-метильного аналога, діючи як ефективні інтеркалятори, суттєво впливають на стабільність комплементарних дуплексів і тим самим підвищують антисенсову активність модифікованих олігонуклеотидних послідовностей.*

Вступ. В останні роки дослідження в галузі хімічного синтезу антисенсових олігонуклеотидів спрямовані в першу чергу на вирішення проблем, пов'язаних зі збільшенням стабільності комплементарних комплексів, покращанням транспорту олігонуклеотидних послідовностей крізь цитоплазматичний клітинний бар'єр та з підвищенням їхньої стійкості до дії клітинних нуклеаз [1—5]. Для розв'язання цих задач запропоновано велику кількість методів та варіантів модифікації олігонуклеотидів, що базуються на зміні їхнього фосфодіефірного скелета чи структури вуглеводних та гетероциклічних фрагментів або на ковалентному присіднанні до олігомерів груп різноманітної хімічної природи [1, 3, 6, 7].

Для зв'язування з певними ділянками олігонуклеотидних послідовностей часто застосовуються гетероароматичні поліциклічні сполуки ряду акридину, антрахінону, фенантроліну, феназину та ін., тобто структури, які мають значні інтеркаляційні властивості й тим самим здатні стабілізувати комплекс олігонуклеотид—мішень [1, 3, 4, 7—12]. Такі групи, як правило, вводять по кінцях послідовності пост-синтетично через відповідний лінкер.

Особливий інтерес становлять аналоги нуклеозидів (АН), що містять залишки інтеркаляторів як аглікони. Такі нуклеозиди можна вводити в задані положення олігонуклеотидної послідовності безпосередньо в процесі хімічного синтезу. В літературі число таких прикладів досить обмежене [13, 14]. Показано, що АН з бензімідазо- та нафтоімідазопіримідиновими агліконами в складі олігонуклеотидів здатні суттєво підвищувати стабільність комплементарних дуплексів. Основний вклад при цьому вносять міжплощинні взаємодії аглікона АН з пуриновими гетероциклами, розміщеними в комплементарному ланцюгу [13]. Аналогічним чином стабілізує дуплекси введення в нуклеотидну послідовність нуклеозидів, які містять фенотіазинот- та феноксазинопіримідинові трициклічні структури [14].

Враховуючи особливості будови планарних тетрациклічних систем імідазофеназинового ряду, їхні унікальні спектральні характеристики, перш за все значні флюоресцентні властивості, було синтезовано на їх основі рибо- та дезоксирибонуклеозиди, які після відповідних хімічних трансформацій вводилися в задані положення олігонуклеотидних послідовностей.

Матеріали і методи. В роботі використано

дициклогексилкарбодімід (DCC) та N-метилімідазол (MeIm) («Fluka», Швейцарія), півалоїлхлорид (PivCl) («Merck», ФРН), реактиви для електрофорезу фірми «Reanal» (Угорщина). Інші реагенти та розчинники були вітчизняного виробництва. Абсолютні піридин та ацетонітрил для олігонуклеотидного синтезу отримували перегонкою над відповідними осушниками, згідно з [15]. УФ-спектри поглинання записували на спектрофотометрі Speccord M-40 («Karl Zeiss Jena», ФРН). Теоретичні коефіцієнти екстинкції олігонуклеотидів обчислювали, як описано в роботі [16].

Одержання нуклеозидних синтонів для олігонуклеотидного синтезу. Синтез N1-β-D-рибофуранозиду та 2'-дезоксирібофуранозиду імідазо[4,5-b]феназину та його 2-метильного аналога I, II описано в роботі [17]. 5'-O-захищені нуклеозиди отримували за допомогою обробки 1,2 екв. триполіметилхлориду в сухому піридині аналогічно до описаних методик [15]. Після стандартної обробки реакційної суміші продукти очищали хроматографією на силікагелі Kieselgel 60 («Merck») в градієнті концентрації (0—3 %) метанолу в хлороформі. Н-фосфонати IV а, б одержували шляхом 3'-O-фосфорильовання 5'-O-TTM-похідних дезоксинуклеозидів трис(триазоліл)фосфіном в абсолютному ацетонітрилі з наступною хроматографічною очисткою продуктів у градієнті (0—10 %) MeOH у хлороформі в присутності 1 % триетиламіну, за відомим методом синтезу нуклеозид-Н-фосфонатів [18].

Синтез полімерних носіїв. Полімерні носії для твердофазного синтезу отримували на основі пористого силікагелю «Силохром С-80» (діаметр пор 100 нм). Його обробляли амінопропілтриетоксисиланом в 95 %-му етанолі, згідно з методикою [15]. Полімер з привитими 3-амінопропілними групами обробляли янтарним ангідридом у піридині в присутності N-метилімідазолу з утворенням сукцинатного похідного носія. Імобілізацію на поверхню одержаного COOH-модифікованого полімеру 5'-O-триполіметилпохідних рибозидів III а, б або природних захищених дезоксинуклеозидів здійснювали в піридині за допомогою DCC у присутності п-нітрофенолу, як описано в [19]. При іммобілізації рибозидів імідазофеназинів далі додатково блокували вільні 2'(3')-гідроксильні групи ковалентно приєднаних нуклеозидів за допомогою обробки полімеру 10 %-м оцтовим ангідридом у піридині протягом 6 год. Контроль за повнотою протікання стадій синтезу полімерних носіїв здійснювали згідно з [15, 19]. Ступінь іммобілізації модифікованих нуклеозидів III на полімер становив 35—37 мкмоль/г, як було визначено спектрофотомет-

рично по кислотному відщепленню 5'-O-триарилметильної групи від носія.

Олігонуклеотидний синтез. Синтез модифікованих імідазофеназинними нуклеозидами олігонуклеотидних послідовностей (таблиця) здійснювали у відповідності зі звичайною схемою твердофазного Н-фосфонатного синтезу олігонуклеотидів [18]. Синтез проводили на автоматичному синтезаторі «Викторія-6М» (Росія) або в ручному варіанті. Середній вихід реакцій міжнуклеотидної конденсації становив 96—97 %. Для одержання олігонуклеотидів, що містять нуклеозид імідазофеназину I а, б на 3'-кінці, синтез здійснювали на описаному вище носіїві «Силохром С-80», модифікованому цим нуклеозидом. Для введення аналога нуклеозиду в задане внутрішнє положення олігонуклеотидної послідовності Н-фосфонат захищеного нуклеозиду IV а, б використовували як Р-компонент реакції конденсації на відповідній стадії в тих самих умовах, що й стандартні нуклеозид-Н-фос-

Олігонуклеотиди, модифіковані нуклеозидами імідазофеназину (Phz) та його 2-метилпохідної (PhzMe)

№	Послідовність (5' → 3')	Примітка
1	(dT) ₁₀	Модельна послідовність
2	CACCTCCTTTCTPhz	Комплементарна до ділянки 1510—1522 рибосомного оперону молікутів
3	PhzACCTCCTTTCTPhz	Те саме
4	CACPhzTCCCTTTCT	«
5	AGAAAGGAGGTGPhz	Комплементарна до ділянки 1510—1522 16S рРНК молікутів
6	APhzAAAGGAGGTGPhz	Те саме
7	GTATCTAAPhz ^{Me}	Комплементарна до ділянки 787—795 16S рРНК <i>E. coli</i>
8	Phz ^{Me} GTATCTAAT	Те саме
9	GACGGGCGGTGTGTAPhz	Комплементарна до ділянки 1398—1407 16S рРНК <i>E. coli</i>
10	PhzACGGGCGGTGTGTAC	Те саме
11	Phz ^{Me} ACGGGCGGTGTGTACPhz	«
12	CCTTGTTACGACTPhz ^{Me}	Комплементарна до ділянки 1492—1505 16S рРНК <i>E. coli</i>

фонати. В синтезі застосовували 0,04—0,05 М розчини Р-компонентів у суміші ацетонітрил—піридин (4:1) та 0,2—0,25 М півалоїлхлорид як конденсуючий реагент у тому ж розчиннику при тривалості конденсації 2,5 хв. Після завершення нарощування олігонуклеотидного ланцюга та окислення гідрофосфорильних груп (2 %-й розчин йоду в системі піридин—вода, 98:2, 15 хв) полімерний носій обробляли концентрованим водним розчином аміаку протягом ночі при 55 °С (у випадку оліготимідилату — при кімнатній температурі). Деблоковані олігонуклеотиди виділяли електрофорезом у поліакриламідному гелі та знесолювали за допомогою гель-фільтрації на колонці PD-10 («Pharmacia», Швеція).

Результати і обговорення. Модифіковані олігонуклеотиди, що містять ковалентно приєднані залишки інших молекул, широко застосовуються в молекулярно-біологічних дослідженнях, медицині та біотехнології. Їх використовують як зонди для детекції нуклеїнових кислот та праймери для їхнього секвенування, специфічні інгібітори експресії генів, при вивченні механізму дії ферментів і т. д. Отримано кон'югати олігонуклеотидів з флюорофорами, ліпофільними молекулами, інтеркаляторами, пептидами та білками, хімічними нуклеазами та сполуками інших класів [1—12]. В останні роки інтенсивно розвивається синтез олігонуклеотидів, модифікованих залишками інтеркаляторів. Приєднання інтеркаляторів суттєво підвищує стабільність дуплексних і триплексних комплексів модифікованих олігомерів з комплементарними послідовностями нуклеїнових кислот, що особливо важливо для ефективного пригнічення експресії генів. Крім того, флюоресцентні властивості інтеркаляторів дають можливість досить легко детектувати їхні кон'югати. Таким чином, олігонуклеотиди, модифіковані інтеркалюючими сполуками, мають цінні властивості для їхнього використання як антисенсових реагентів.

Заритова та ін. вперше отримали кон'югати олігонуклеотидів з N-(2-гідроксиетил)феназинівими групами. Хромофор вводили пост-синтетично шляхом окислювального амінування барвника аміногрупою попередньо синтезованого олігомера, що містив аміноалкільний лінкер. Катіонна феназинова система різко підвищувала стійкість комплементарних комплексів нуклеїнових кислот [20—23]. Ми звернули увагу на нейтральні сполуки феназинового ряду — імідазо[4,5-b]феназини. Одночасно вони близькі за структурою до відомого ефективного інтеркалятора — антибіотика дауноміцину. Раніше на основі спектрально-флюоресцентних досліджень нами було показано, що похідні імідазо-

феназину взаємодіють з нуклеїновими кислотами за механізмом інтеркаляції, стабілізуючи полінуклеотидні дуплекси [24, 25].

Для введення цього інтеркалятора в олігонуклеотиди розроблено оригінальний підхід, в якому хромофор заміщує основу в потрібному положенні нуклеотидної послідовності. Отримані кон'югати містять імідазофеназинову групу, зв'язану з вуглеводним залишком глікозидним зв'язком. Запропонований нами метод ґрунтується на одержанні N1-рибозида чи -дезоксирибозида імідазофеназину з подальшим перетворенням останніх у відповідні похідні, які можуть бути введені в олігонуклеотид у процесі твердофазного синтезу.

У першу чергу були одержані рибофуранозиди імідазо[4,5-b]феназину та його 2-метилпохідної I а, б. Рибонуклеозиди синтезували за допомогою спрощеного одностадійного варіанту «силільної конденсації» і далі дезоксигенували по положенню 2' з утворенням дезоксирибозидів II а, б. Експериментальні деталі синтезу модифікованих нуклеозидів описано в нашій роботі [17]. На основі вільних нуклеозидів I та II отримано відповідно 5'-O-триметилметилзахищені рибонуклеозиди III а, б та N-фосфонати 2'-дезоксирибозидів IV а, б (рис. 1). Нуклеозиди I а, б триметилували в піридині, а для одержання N-фосфонатів спочатку ана-

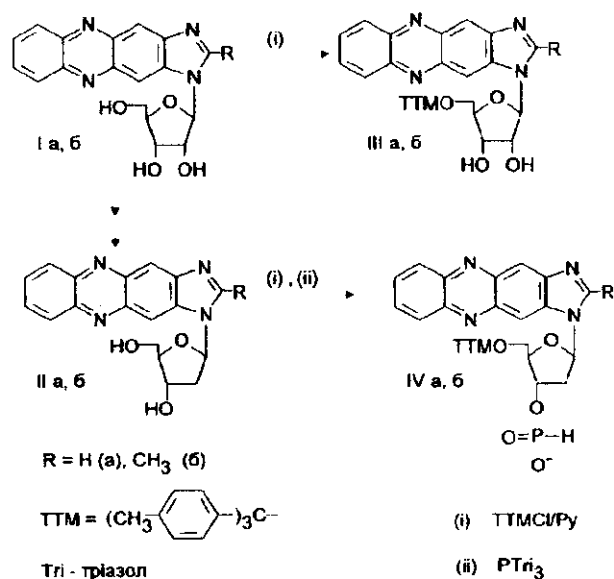


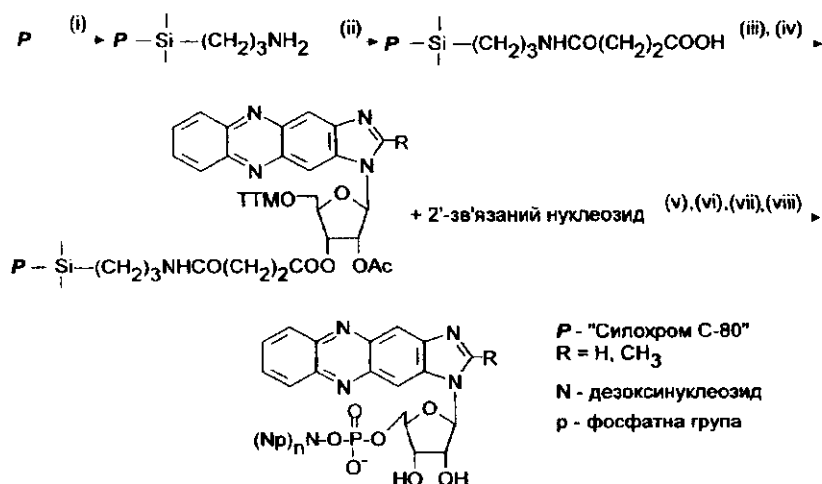
Рис. 1. Синтез похідних імідазофеназинових нуклеозидів для використання в олігонуклеотидному синтезі

логічно захищали 5'-гідроксил відповідного дезоксинуклеозиду II тритолілметильною групою, а далі фосфорилували 3'-гідроксил трис(триазоліл)фосфіном в ацетонітрилі.

Для синтезу олігонуклеотидних послідовностей, що містять аномальний нуклеозид на 3'-кінці, ми отримали полімерні носії з іммобілізованими нуклеозидами (рис. 2). Як основу було використано відомий силікатний носій для твердофазного синтезу «Силохром С-80». Його амінували обробкою амінопропілтриетоксисиланом, а далі вводили якірну карбоксильну групу за допомогою янтарного ангідриду. Одержаний носій модифікували значно доступнішими рибозидами. Посадку аналога нуклеозиду здійснювали, обробляючи одержаний полімер 5'-О-тритолілметилзахищеним рибонуклеозидом імідазофеназину III а, б у присутності DCC та *p*-нітрофенолу, з наступним блокуванням вільних карбоксильних груп носія додаванням етанолу. Тритолілметильна (триметилтритильна, ТТМ) функція, яку використовували в даній роботі для захисту 5'-гідроксильних груп модифікованих нуклеозидів, за легкістю деблокування близька до стандартної кислотолабільної монометокситритильної (ММТг) групи. Іммобілізація відбувається з утворенням складноесірфного зв'язку між COOH-групою полімеру та 2'- або 3'-гідроксилом нуклеозиду. Полімер, таким чином, одночасно містить нуклеозидні залишки, ковалентно зв'язані по двох

положеннях. Надалі це не впливає на одержання олігонуклеотидних продуктів, оскільки після відщеплення олігомера з носія в обох випадках утворюється олігонуклеотид, що містить на 3'-кінці рибонуклеозид імідазофеназину. 3'(2')-Гідроксильні групи іммобілізованих нуклеозидів блокували за допомогою ацилювання оцтовим ангідридом у піридині. Величина посадки нуклеозидів III на «Силохром С-80», визначена по відщепленню 5'-О-захисної триарилметильної групи кислотою, становила 35—37 мкмоль/г. Синтез олігонуклеотидів на модифікованих таким чином полімерах дозволяє отримати послідовності, що містять 3'-кінцевий нуклеозид імідазофеназину.

Для введення залишку імідазофеназину в інші положення олігонуклеотидного ланцюга були використані 3'-Н-фосфонати 5'-О-захищених 2'-дезоксинуклеозидів IV а, б. Одержані Н-фосфонати служили Р-компонентами реакції міжнуклеотидної конденсації на потрібній стадії синтезу олігонуклеотидної послідовності при тих самих умовах, що й Н-фосфонати природних нуклеозидів (рис. 3). За допомогою Н-фосфонатного реагента модифікований нуклеозид може бути введений в будь-яке положення олігонуклеотидного ланцюга, крім 3'-термінального. При цьому олігонуклеотиди можна синтезувати як на звичайних носіях, що містять природні нуклеозиди, так і на отриманих нами полімерах з іммобілізованими модифікованими



(i) (EtO)₃Si(CH₂)₃NH₂; (ii) янтарний ангідрид, MeIm, Py;
 (iii) IIIa, б, DCC, *p*-нітрофенол, Py; (iv) Ac₂O/Py; (v) H⁺;
 (vi) олігонуклеотидний синтез; (vii) J₂/Py-H₂O; (viii) NH₄OH

Рис. 2. Одержання полімерних носіїв та синтез на їхній основі 3'-модифікованих олігонуклеотидів

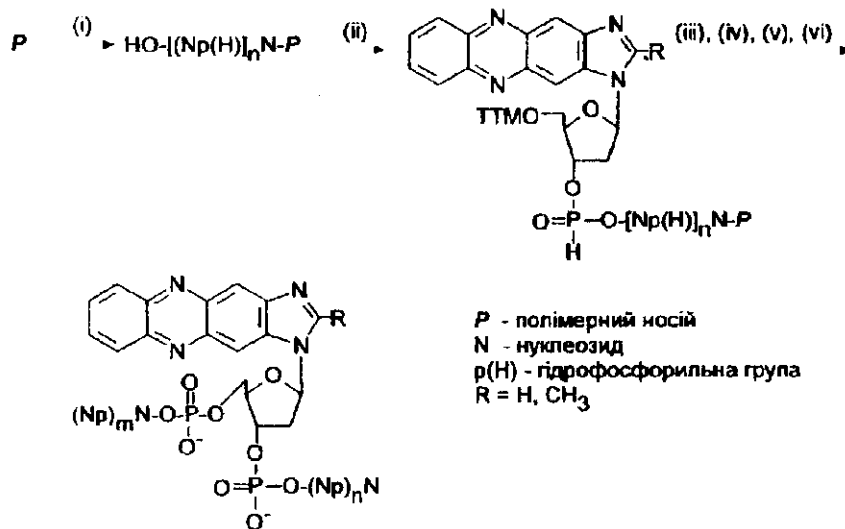
нуклеозидами. Це дозволяє отримувати олігонуклеотиди, модифіковані одночасно по 3'- і 5'-кінцях або будь-якому з внутрішніх положень синтезованої послідовності. В принципі, при використанні описаних нами модифікованих полімерних носіїв та Н-фосфонатів імідазофеназинових нуклеозидів можна одержувати послідовності, які включатимуть будь-яку кількість залишків інтеркалятора в заданих місцях.

Твердофазним Н-фосфонатним методом було синтезовано цілий ряд олігонуклеотидів, що містять нуклеозиди імідазофеназинів у різних положеннях. Нуклеотидні послідовності отриманих олігонуклеотидів наведено в таблиці. Серед них є як модельні послідовності для вивчення фізико-хімічних властивостей модифікованих олігонуклеотидів (1), так і олігомери, комплементарні до певних консервативних, так званих сигнатурних, ділянок рибосомного оперона, та продукту його експресії — рибосомної РНК мікоплазм (молікутів) (2—6) та *E. coli* (7—12). Антисигнатурні олігонуклеотиди 2—12 — це природні послідовності, в яких одна чи дві нуклеотидні ланки в різних положеннях замінено похідними імідазо[4,5-*b*]феназину.

Синтез здійснювали як в автоматичному, так і в ручному варіанті. Середній вихід реакцій конденсації становив 96—97 % на стадію. Після завершення нарощування олігонуклеотидного ланцюга

та окислення гідрофосфорильних груп олігонуклеотиди відщепляли від полімерного носія та деблокували за допомогою обробки концентрованим розчином аміаку, а цільові продукти очищали препаративним гель-електрофорезом. Олігонуклеотиди, в складі яких знаходяться нуклеозиди імідазофеназину, легко проявляються в гелі при УФ-опромінюванні у вигляді чітких смуг з жовтою флюоресценцією. Слід відмітити, що інтенсивна флюоресценція хромофора імідазофеназину (максимум емісії барвника в складі олігонуклеотидів спостерігається при 537—539 нм) робить його зручною репортерною групою для детекції нуклеїнових кислот, а також для вивчення процесів комплексоутворення.

Були досліджені фізико-хімічні та біологічні властивості синтезованих нами олігонуклеотидних послідовностей. В їхніх електронних спектрах поглинання поруч з УФ-поглинанням олігонуклеотиду та імідазофеназину при 260—270 нм реєструється смуга адсорбції барвника у видимій області (375—385 нм). При цьому співвідношення інтенсивностей поглинання модифікованих послідовностей в ультрафіолетовій і видимій областях добре корелювало з розрахованими за коефіцієнтами екстинкції інтеркалятора та відповідного олігонуклеотиду. Спектри підтвердили присутність двох залишків інтеркалятора в молекулі оліго-



P - полімерний носій
 N - нуклеозид
 p(H) - гідрофосфорильна група
 R = H, CH₃

(i) олігонуклеотидний синтез; (ii) IVa, б, PivCl, Py; (iii) H⁺;
 (iv) продовження нарощування олігонуклеотидної послідовності;
 (v) J₂/Py-H₂O; (vi) NH₄OH

Рис. 3. Синтез олігонуклеотидів, що містять нуклеозиди імідазофеназинів у внутрішніх чи 5'-кінцевому положеннях

нуклеотидів 3, 6 та 11. Спектрально-флуоресцентні та гібридаційні властивості олігонуклеотидних кон'югатів імідазофеназину докладніше описані в нашій недавній роботі [26]. Показано, що залишок інтеркалятора різко підвищує стабільність комплексів модифікованих олігонуклеотидів з комплементарними послідовностями. Так, введення 3'-термінального нуклеозиду імідазофеназину в дека-тимідилат (dT)₁₀ збільшувало температуру топлення його дуплексів з poly-A або (dA)₁₅ на 10—12 °C і в ще більшій мірі (на 15—20 °C) стабілізувало потрібні комплекси модифікованого (dT)₁₀.

Спектроскопічні дослідження взаємодії похідних феназину з ДНК показали, що основним типом зв'язування нейтрального хромофора імідазофеназину є інтеркаляція барвника, тоді як у разі четвертинних солей феназину значний внесок в утворення комплексів роблять також електростатичні взаємодії з фосфатними групами [24—26]. На нашу думку, в останньому випадку знижується специфічність впізнавання послідовностей-мішеней модифікованими олігонуклеотидами порівняно з олігомерами, що містять нейтральний імідазофеназин. При цьому стабілізуючий вплив нейтральних та катіонних інтеркаляторів феназинового ряду на комплементарні комплекси виявляється практично однаковим.

Олігонуклеотиди, модифіковані імідазофеназинами, виявилися активними антисенсовими реагентами, що ефективно блокували транскрипцію й трансляцію в молекулах в експериментах *in vitro*. Так, транскрипція пригнічувалася реагентами 3—4 приблизно на 80 %. При цьому інгібуюча активність модифікованих антисигнатурних олігонуклеотидів була суттєво вищою, ніж у немодифікованих аналогів. Біологічні дані, отримані при вивченні сполук 2—6, комплементарних 3'-кінцевій послідовності 16S рРНК мікоплазм та відповідної їй ділянки рибосомного оперону, наведено в ряді наших попередніх робіт [27—29].

Вивчення взаємодії модифікованих олігонуклеотидів 7 та 9 з відповідними ділянками 16S рРНК підтверджує ймовірність утворення комплементарних дуплексів. Це демонструють величини неадекватного пригнічення окремих стадій біосинтезу білка. З іншого боку, показано можливість використання синтетичних олігонуклеотидів для регулювання певних процесів функціонування важливих рибосомних центрів. Результати досліджень біологічної активності модифікованих олігонуклеотидів, комплементарних до ділянок рибосомної РНК *E. coli*, будуть опубліковані додатково.

Таким чином, у даній роботі описано синтез ряду олігонуклеотидних послідовностей, модифі-

кованих рибо- та 2'-дезоксирибонуклеозидами імідазо[4,5-*b*]феназину та його 2-метильного аналога в різних положеннях. Показано, що імідазофеназинові нуклеозиди як ефективні інтеркалятори в складі модифікованих олігонуклеотидів, комплементарних до консервативних ділянок рибосомного оперону, 16S рРНК молюкутів та *E. coli*, суттєво підвищують їхню антисенсову активність і стабілізують комплекси з комплементарними нуклеїновими кислотами. Слід відмітити, що, крім стабілізації комплементарних комплексів, ковалентно приєднаний залишок імідазофеназину, ймовірно, здатний збільшити транспорт антисенсових олігонуклеотидів у клітину в зв'язку зі своїми ліпофільними властивостями. Аномальний нуклеозид, зв'язаний з 3'-кінцем олігонуклеотидів, може підвищити стійкість останніх до дії клітинних нуклеаз, подібно до інших 3'-термінальних груп [1—4]. Ці питання вимагають додаткового вивчення.

В. Л. Макітрук, А. С. Шаламай, І. Я. Дубей, Д. М. Федоряк
Синтез и изучение антисмысловых олигонуклеотидов, модифицированных имидазофеназиновыми нуклеозидами

Резюме

*Н-фосфонатным твердофазным методом получены модифицированные имидазофеназиновыми нуклеозидами по 3'-, 5'- и внутренним положениям олигонуклеотиды, комплементарные участкам рибосомного оперона, 16S рРНК микоплазм и Escherichia coli. Показано, что нуклеозиды имидазо[4,5-*b*]феназина и его 2-метильного аналога, действуя как эффективные интеркаляторы, существенно влияют на стабильность комплементарных дуплексов, повышая тем самым антисмысловую активность модифицированных олигонуклеотидных последовательностей.*

V. L. Makitruk, A. S. Shalamay, I. Y. Dubey, D. M. Fedoryak

Synthesis and study of antisense oligonucleotides modified with imidazophenazine nucleosides

Summary

*Oligonucleotides containing imidazophenazine nucleosides at 3'-, 5'- and internal positions, which are complementary to certain regions of ribosomal operon DNA and 16S rRNA of mycoplasmas and E. coli, have been synthesized by H-phosphonate solid phase method. It has been shown that nucleosides of imidazo[4,5-*b*]phenazine and its 2-methyl analog as efficient intercalating agents strongly affect the stability of complementary complexes increasing the antisense activity of modified oligonucleotide sequence.*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Uhlmann E., Peyman A. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle // Chem. Rev.—1990.—90, N 4.—P. 543—584.
2. Knorre D. G., Vlassov V. V. Antisense oligonucleotide derivatives as gene-targeted drugs // Biomed. Sci.—1990.—1, N 3.—P. 334—343.
3. Goodchild J. Conjugates of oligonucleotides and modified

- oligonucleotides: a review of their synthesis and properties // *Bioconjugate Chem.*—1990.—1, N 3.—P. 165—187.
4. English U., Gauss D. H. Chemically modified oligonucleotides as probes and inhibitors // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*—1991.—30, N 6.—P. 613—629.
 5. Conkin B., Sasmor H., Digiorgio J., Warren W. Producing pharmaceutical-grade antisense DNA: an evolving discipline // *Millipore Bioforum (Technology news for the life scientist)*.—Bedford, 1992.—P. 2—4.
 6. Beaucage S. L., Iyer R. P. The functionalization of oligonucleotides via phosphoramidite derivatives // *Tetrahedron.*—1993.—49, N 10.—P. 1925—1963.
 7. Коршун В. А., Берлин Ю. А. Введение нерадиоактивных репортерных групп в синтетические олигонуклеотиды и их детекция // *Биоорг. химия.*—1994.—20, № 6.—С. 565—616.
 8. Asseline U., Toulme F., Thuong N. T. Oligodeoxynucleotides covalently linked to intercalating dyes as base sequence-specific ligands. Influence of dye attachment site // *EMBO J.*—1984.—3, N 4.—P. 795—800.
 9. Helene C., Montenay-Carestier T., Saison V. Oligonucleotides covalently linked to intercalating agents: a new class of gene regulatory substances // *Biochimie.*—1988.—67, N 7.—P. 777—783.
 10. Helene C. The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming oligonucleotides // *Anti-Cancer Drug Design.*—1991.—6, N 5.—P. 569—584.
 11. Thuong N. T., Helene C. Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by oligonucleotides // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*—1993.—32, N 5.—P. 666—690.
 12. Asseline U., Thuong N. T., Helene C. Synthesis and properties of oligonucleotides covalently linked to intercalating agents // *New J. Chem.*—1997.—21, N 1.—P. 5—17.
 13. Bischofberger N., Matteucci M. D. Synthesis of novel polycyclic nucleoside analogues, incorporation into oligonucleotides, and interaction with complementary sequences // *J. Amer. Chem. Soc.*—1989.—111, N 8.—P. 3041—3046.
 14. Lin K.-Y., Jones R. J., Matteucci M. Tricyclic 2'-deoxycytidine analogs: syntheses and incorporation into oligodeoxynucleotides which have enhanced binding to complementary RNA // *J. Amer. Chem. Soc.*—1995.—117, N 13.—P. 3873—3874.
 15. *Oligonucleotide synthesis: a practical approach* / Ed. M. J. Gait.—Oxford: IRL press, 1984.—218 p.
 16. *Handbook of biochemistry and molecular biology* / Ed. G. Fasman // Boca Raton: CRC press, 1975.—P. 175.
 17. Макитрук В. Л., Шаламай А. С., Кондратьев И. В. Синтез и изучение рибофуранозидов ряда феназазолов // *Биополимеры и клетка.*—1997.—13, № 6.—С. 453—459.
 18. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D. Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14, N 13.—P. 5399—5407.
 19. Matteucci M. D., Caruthers M. H. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support // *J. Amer. Chem. Soc.*—1981.—103, N 11.—P. 3185—3191.
 20. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. Модификация нуклеиновых кислот в стабилизированных комплементарных комплексах. I. Синтез алкилирующих производных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих на 5'-конце остаток N-(2-оксиэтил)феназина // *Биоорг. химия.*—1986.—12, № 7.—С. 911—920.
 21. Kutyavin I. V., Podyminogin M. A., Bazhina Y. N. N-(2-Hydroxyethyl)phenazinium derivatives of oligonucleotides as effectors of the sequence-specific modification of nucleic acids with reactive oligonucleotide derivatives // *FEBS Lett.*—1988.—238, N 1.—P. 35—38.
 22. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кутявин И. В. Синтез производных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих на 3'-конце цепи остаток N-(2-оксиэтил)феназина // *Изв. СО АН СССР. Сер. хим.*—1989.—№ 6.—С. 3—9.
 23. Lokhov S. G., Podyminogin M. A., Sergeev D. S. Synthesis and high stability of complementary complexes of N-(2-hydroxyethyl)phenazinium derivatives of oligonucleotides // *Bioconjugate Chem.*—1992.—3, N 5.—P. 414—419.
 24. Благой Ю. П., Зозуля В. Н., Волошин И. М., Макитрук В. Л., Шаламай А. С., Щербакова А. С. Исследование взаимодействия производных феназина с ДНК методом поляризованной флуоресценции // *Биополимеры и клетка.*—1997.—13, № 1.—С. 22—29.
 25. Zozulya V., Blagoi Yu., Lober G. et al. Fluorescence and binding properties of phenazine derivatives in complexes with polynucleotides of various base compositions and secondary structure // *Biophys. Chem.*—1997.—65.—P. 55—63.
 26. Зозуля В. М., Благой Ю. П., Дубей Я. Я., Федоряк О. Д., Щербакова А. С., Федоряк Д. М. Стабілізація дуплексних та триплексних комплексів оліготимідилату ковалентно приєднаним глікозидом імідазофеназину // *Биополимеры и клетка.*—1998.—14, № 1.—С. 54—61.
 27. Бабичев В. В., Скрипаль И. Г., Безуглый С. В. и др. Олигодезоксирибонуклеозиды, комплементарные участкам рибосомального оперона молликутов, как ингибиторы транскрипции *in vitro* // *Микробиол. журн.*—1993.—55, № 6.—С. 29—35.
 28. Коробкова Е. С., Панченко Л. П., Шаламай А. С., Скрипаль И. Г. Способность олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарных 3'-концевому участку 16S-rРНК молликутов, подавлять трансляцию на их рибосомах в системе *in vitro* // *Микробиол. журн.*—1995.—57, № 3.—С. 30—36.
 29. Skripal I. G., Babichev V. V., Panchenko L. P. et al. Antisignature oligonucleotides and their analogs as inhibitors of mollicutes-cofactors of HIV // *Микробиол. журн.*—1997.—59, № 2.—С. 3—11.

УДК 577.113.4.547.963.32
Надійшла до редакції 08.04.98