



УДК 547.963.32.057:542.95

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И ПОЛУЧЕНИЕ ИЗ НИХ ДУПЛЕКСА С КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННЫМИ ЦЕПЯМИ

© 1995 г. С. И. Анцыпович, Е. М. Волков, Т. С. Орецкая[#], Е. А. Романова,
В. Н. Ташлицкий, М. Блюменфельд*, З. А. Шабарова

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
119899, Москва, В-234, Воробьевы горы, МГУ, химический факультет;

*Корпорация "Genset", Париж

Поступила в редакцию 21.12.94 г.

Разработан способ синтеза ДНК-дуплекса с ковалентно связанными цепями, изучены его термическая и гидролитическая устойчивость. Связь образована между алифтической аминогруппой, расположенной в одном из тяжей, и карбоксильной группой – в другом, с использованием водорасстворимого карбодиимида в качестве конденсирующего агента. Описан синтез серии модифицированных олигонуклеотидов длиной от 5 до 26 нуклеотидных звеньев, несущих первичную амино- или карбоксильную группу, исследованы их свойства.

Ключевые слова: модифицированные олигонуклеотиды, 2'-амино-2'-дезоксицитидин, ДНК-дуплекс с ковалентно связанными цепями.

Широкое применение олигонуклеотидов в молекулярно-биологических исследованиях стимулирует интерес к совершенствованию методов синтеза этих соединений и изучению их свойств. В последнее время получило развитие новое направление в химии нуклеиновых кислот, связанное с дизайном и синтезом модифицированных олигонуклеотидов, обладающих специфическими свойствами – устойчивостью к нукleaseйной деградации, возможностью проникновения через клеточную мембрану, способностью связываться ковалентно с молекулами ДНК и белков [1, 2]. Создание новых соединений с заданными химическими, физико-химическими и биологическими свойствами является актуальной задачей.

В настоящей работе предлагается новый подход к синтезу модифицированного ДНК-дуплекса, тяжи которого соединены ковалентной связью. Особенностью предлагаемого нами подхода является возможность образования связи между цепями в любом заранее заданном месте ДНК-дуплекса, в том числе введение множественных сшивок. Субстраты подобной структуры могут найти применение при изучении НК-белковых

Сокращения: DMT_r – 4,4'-диметокситритил; Fmoc – 9-флуоренилметоксиарбонил; FITC – флуоресцеинизотиоцинат; CDI – 1-этил-3-(3,3-диметиламинопропил)карбодиимид; MES – морфолинэтансульфокислота; НК – нукleinовые кислоты. Префикс "d" (дезокс) при обозначении 2'-дезоксирибонуклеозидов и олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки.

взаимодействий. Известны работы, в которых описано получение ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями, где для введения связи между тяжами используются модификации гетероциклических оснований (цитозина или гуанина) [3 - 5]. Это не только нарушает водородные связи в месте сшивки, но и существенно ограничивает дизайн дуплексов.

Целью настоящей работы является:

1) разработка методов получения модифицированных мономерных синтонов и использования их для амидофосфитного синтеза взаимокомплементарных олигонуклеотидов, несущих карбоксильную и аминогруппы;

2) осуществление реакции между цепями олигонуклеотидного дуплекса, составленного из этих модифицированных олигонуклеотидов, отработка условий данной реакции и изучение свойств полученного сшитого дуплекса.

Синтез модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов

Нами был гфармулирован ряд требований к модифицированным олигонуклеотидам, которые определили выбор введенных в олигомеры функциональных групп: а) возможность направления включения этих групп в любое заранее заданное положение олигонуклеотидной цепи; б) встраивание нескольких групп для получения олигонуклеотидного дуплекса, сшитого в нескольких местах.

При этом стандартные процедуры автоматического амидофосфитного олигонуклеотидного синтеза сохраняются.

На основании перечисленных условий нами были выбраны следующие типы модификаций олигонуклеотидов. В одну из олигонуклеотидных цепей, предназначенных для получения спшитого дуплекса, вводился 2'-амино-2'-дезоксицитидин [6]. Олигомеры (I) и (II) (таблица) являлись модельными соединениями, а олигонуклеотид (III) – целевым, на котором отрабатывались условия реакции между тяжами дуплекса. В другой тяж олигонуклеотидного дуплекса вводили первичную алифатическую аминогруппу, локализованную на ненуклеозидной вставке. Соответствующий амидафосфитный синтон (6) получали из N-Fmoc-блокированного активированного эфира β -аланина (2) и диметокситритильного производного 2-амино-1,3-пропандиола (4) (схема 1).

Целевое соединение (6), содержащее защищенную первичную алифатическую аминогруппу, использовали в стандартных условиях автоматического амидафосфитного олигонуклеотидного синтеза для введения модификаций в заранее заданное место олигонуклеотидной цепи. В структуре данного ненуклеозидного модифицирующего реагента мы сохранили характерную для природных нуклеозидов дистанцию в три углеродных атома между 3'- и 5'-гидроксилами, участвующими в построении межнуклеотидной связи.

С использованием соединения (6) были получены четыре модифицированных олигонуклео-

тические структуры синтезированных модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов

Олигонуклеотид	Первичная структура 5' - 3'
(I)	TTC ⁿ TT
(II)	AAAAAAAC ⁿ T
(III)	ATCCTATAATGCGC ⁿ CCTGCA
(IV)	TNTTT
(V)	TTTTTNT
(VI)	GGTNTGGTTAATGATCTACANTTAAT
(VII)	TGCAGGNCGCATTATAGGAT
(VIII)	ATCCTATAATGCGC ^c CCTGCA
(IX)	TGCAGGN ^c CGCATTATAGGAT
(X)	TGCAGGGCGCATTATAGGAT
(XI)	ATCCTATAATGCGCCCTGCA

Примечание. Сⁿ – 2'-амино-2'-дезоксицитидин; Н – ненуклеозидная вставка с аминогруппой; С^c – 2'-(3-карбоксипропиониламино)-2'-дезоксицитидин; Н^c – ненуклеозидная вставка, имеющая 3-карбоксипропиониламиногруппу.

тида (IV - VII), структуры которых приведены в таблице. Олигонуклеотиды (IV - VI) являются моделями, на которых отрабатывались приемы синтеза, выделения и анализа модифицированного олигонуклеотидного материала; олигонуклеотид (VII) – целевой продукт, с которым проводились дальнейшие эксперименты по получению ковалентно спшитого ДНК-дуплекса. Олигомеры (VI) демонстрируют возможность осуществления множественных включений в олигомеры фрагментов подобной природы.

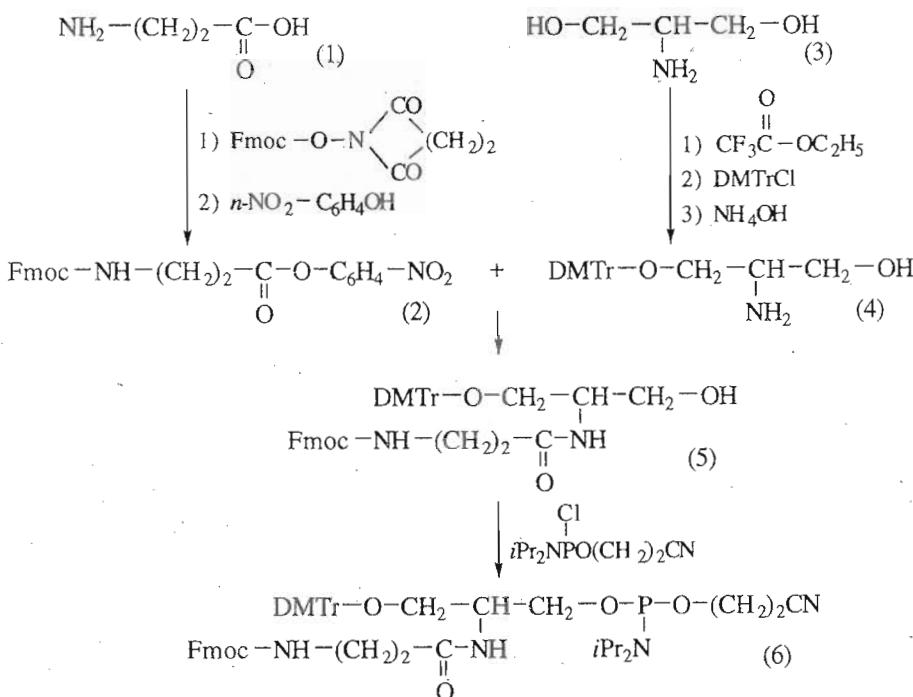


Схема 1.

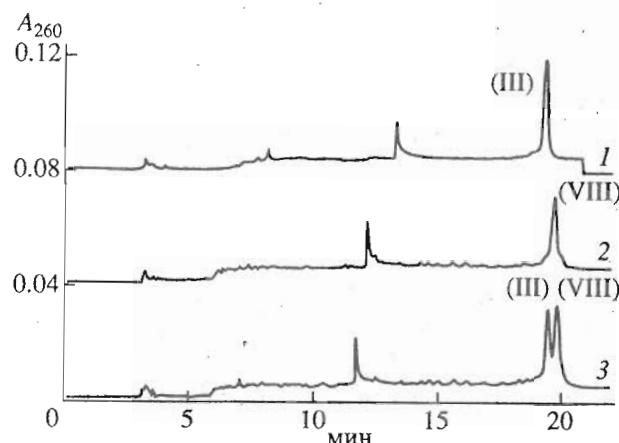


Рис. 1. Сравнение хроматографической подвижности (ион-парная ВЭЖХ) олигонуклеотидов (III), (VIII), (III) + (VIII) (условия ВЭЖХ см. в "Экспер. части").

Наличие встроенной в модифицированные олигонуклеотиды (I - VII) реакционноспособной первичной алифатической аминогруппы было показано при взаимодействии с электрофильными реагентами: уксусным ангидридом (с последующим анализом продуктов реакции методом ион-парной ВЭЖХ) и FITC (по методике [7] с последующим спектрофотометрическим анализом продуктов). В спектре поглощения продукта реакции с FITC обнаружили два максимума при 260 и 495 нм, относящиеся к олигонуклеотидной и флуоресцеиновой частям соответственно.

Далее реакцией с янтарным ангидридом в модифицированные олигонуклеотиды (III, VII) вводилась карбоксильная группа.

Время удерживания модифицированных олигонуклеотидов при анализе методом ион-парной ВЭЖХ изменялось в полном соответствии с природой введенных функциональных групп: так, олигонуклеотиды (I - VII) с аминогруппой имели, как правило, меньшее время удерживания по сравнению с природными олигонуклеотидами с аналогичной первичной структурой из-за дополнительного положительного заряда, тогда как олигонуклеотиды с карбоксильной группой (VIII, IX) – большее благодаря дополнительному отрицательному заряду (см., например, рис. 1).

Получение олигонуклеотидного дуплекса с ковалентно связанными цепями

Из синтезированных модифицированных взаимокомплементарных олигонуклеотидов (III, IX) и (VII, VIII) были составлены два ДНК-дуплекса (B и C соответственно), в каждом из которых одна из цепей содержала аминогруппу, а вторая – карбоксильную группу (схема 2). Различие между данными дуплексами заключалось в том, что в дуплексе B в свободной была 2'-аминогруппа цитидина, тогда как в дуплексе C – аминогруппа, локализованная на ненуклеозидной вставке.

Реакцию между цепями осуществляли в течение 6 сут при 4°C с использованием водорастворимого CDI в качестве конденсирующего агента в водном буферном растворе, pH 6.7. Реакционные смеси анализировали с помощью ион-парной ВЭЖХ (см., например, рис. 2). Выход целевого продукта определяли как отношение площади пика, соответствующего сшитому дуплексу, к сумме

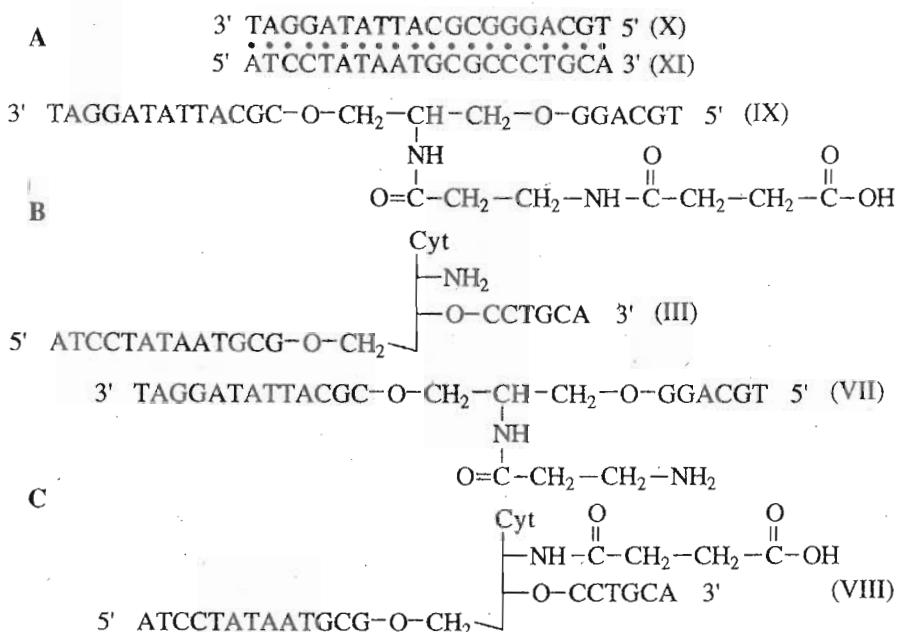
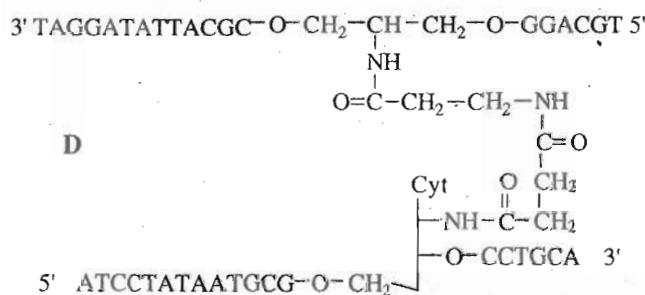


Схема 2.

площадей пиков, соответствующих исходному и конечному соединениям, рассчитанных с использованием программы Maxima ("Waters"). Выход ковалентно спицкого дуплекса в случае использования олигонуклеотидов (VII) и (VIII) составил 3%, а в случае олигонуклеотидов (III) и (IX) – 16%. Такое существенное различие в выходе целевого продукта объясняется уникальными свойствами 2'-аминогруппы в остатке 2'-дезоксицитидина, р_K которой значительно ниже, чем у первичной алифатической аминогруппы (7, 4 [6] и 11 соответственно). Поэтому в условиях реакции 2'-аминогруппа в значительной степени остается в свободной непротонированной форме и таким образом сохраняет свою нуклеофильность. Целевые продукты анализировали методом электрофореза в 20% ПААГ (рис. 3). Дорожка D соответствует ковалентно спицкому дуплексу D, выделенному с помощью ион-парной ВЭЖХ. Наличие побочного продукта с электрофоретической подвижностью, меньшей, чем у целевого соединения, на наш взгляд, связано со статистической модификацией карбодиимидом иминного азота в тиминовых и гуаниновых основаниях.



Нами была проведена оптимизация условий реакции между цепями. При этом изучалась система В, в которой был достигнут наибольший выход целевого продукта. При варировании времени проведения реакции (от 1 до 7 сут), концентрации CDI (от 0.1 до 0.4 М), pH и температуры было обнаружено, что в оптимальных условиях (20°C, 120 ч, концентрация CDI 0.4 М, pH 6.7, концентрация олигонуклеотидного материала 1 мМ в пересчете на мононуклеотид) выход спицкого дуплекса D составил 26% (см. рис. 2).

Свойства дуплекса, содержащего ковалентную связь между цепями

Исследование химических и физико-химических свойств олигонуклеотидного дуплекса, тяжи которого соединены ковалентной связью, представляет большой интерес, в частности для определения возможных областей применения олигонуклеотидных субстратов подобной структуры.

Термическая устойчивость полученного дуплекса D была изучена методом УФ-спектроскопии. В качестве стандартов были использованы

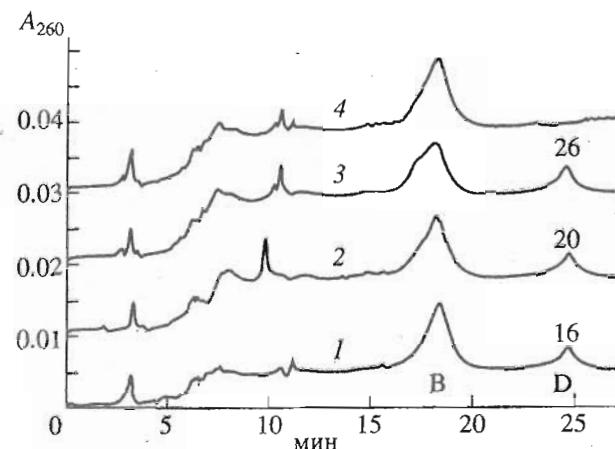


Рис. 2. ВЭЖХ-анализ (ион-парный вариант, условия см. в "Экспер. части") реакционной смеси при проведении реакции (время реакции 120 ч) между нуклеотидами (IX) и (III) в дуплексе В в присутствии CDI при 4 (1), 10 (2) и 20°C (3) и без CDI (4). Пик D – спицкий дуплекс, выход (%) указан над пиком, пик В – смесь олигонуклеотидов (III) и (IX).

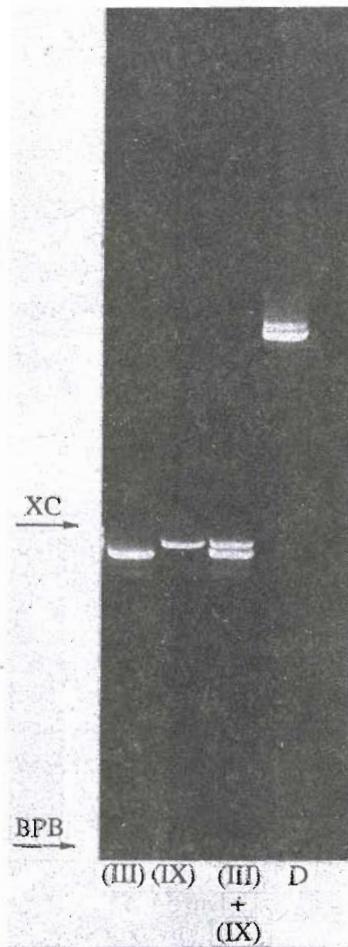


Рис. 3. Электрофоретический анализ в 20% денатурирующем ПААГ олигонуклеотидов (III), (IX), (III) + (IX) и дуплекса D с ковалентно связанными цепями.

природный (A) и модифицированный (B) дуплексы.

Для дуплекса B характерно снижение термической устойчивости по сравнению с дуплексом A (34 и 63°C соответственно). Это объясняется дестабилизирующим действием введенных модификаций (понижение термической стабильности при введении в олигонуклеотиды 2'-амино-2'-дезоксицитидина было показано ранее [6]), а также элиминированием одной G · C-пары в месте введения ненуклеозидной вставки. Однако для сшитого дуплекса D наблюдалась обратная картина: обнаружено значительное увеличение температуры плавления (67°C), которая оказалась выше таковой не только для модифицированного дуплекса B, но и для немодифицированного дуплекса A, что подтверждает наличие в дуплексе D связи между цепями.

Гидролитическая устойчивость полученного соединения к действию смеси фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы изучалась в жестких условиях исчерпывающего ферментативного гидролиза (56°C, 180 мин) с последующим анализом гидролизата методом ион-парной ВЭЖХ. Обнаружено, что в данных условиях природный дуплекс A и смесь модифицированных олигонуклеотидов, составляющих дуплекс B, гидролизуются полностью, тогда как сшитый дуплекс D на 70% сохраняется без изменения. Такая небольшая степень гидролиза в столь жестких условиях несомненно является результатом наличия ковалентной связи между олигонуклеотидами – компонентами сшитого дуплекса D.

Нам представляется перспективным использовать сшитые дуплексы при изучении механизма действия ферментов, который предполагает стадию "расплетания" локального участка ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы 5'-О-диметокситритил-3'-(N,N-диизопропиламило)-β-цианэтилфосфиты 2'-дезоксирибонуклеозидов (Applied Biosystems, США); цитидин, флуоресцеинизотиоцианат, фосфодиэстераза змеиного яда, щелочная фосфатаза (Sigma, США); β-цианэтил-N,N-диизопропиламилохлорфосфит (Aldrich, США), флуоренилметоксикарбонилоксисукцинимид, 1-этил-3-(3-диметиламиноизопропил)карбодииimid, оксалат 2-амино-1,3-пропандиола (Merck, ФРГ). Этиловый эфир трифтормукусной кислоты был получен по методике [6].

TCX осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) с использованием следующих систем растворителей: хлороформ–этанол, 95 : 5 (A); хлороформ–этанол, 9 : 1 (B). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле марки Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в системах растворителей:

градиент концентрации этанола в хлороформе (от 0 до 5%) (B); то же (от 0 до 15%) (Г).

¹Н-ЯМР-спектры записывали на приборе VXR-400 (Varian, США). Приведены химические сдвиги (δ , м. д.) и КССВ (J , Гц).

Оптическое поглощение и УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре 150-20 (Hitachi, Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см; за молярный коэффициент поглощения олигонуклеотидов принимали сумму коэффициентов составляющих мононуклеотидов [8]. Использовали эквимолярные смеси компонентов.

Кривые температурной зависимости УФ-поглощения регистрировали на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония), снабженном термостатированным кюветодержателем и блоком для измерения температуры, при непрерывном повышении температуры со скоростью 0.5°C/мин.

5'-О-Диметокситритил-Н⁴-бензоил-2'-трифтор-ацетамило-2'-дезокси-3'-(N,N-диизопропиламило)-β-цианэтилфосфит цитидина получали по методике [6].

N-(9-Флуоренилметоксикарбонил)-β-аланин. К раствору 0.46 г (5.16 ммоль) β-аланина (1) в 10 мл воды добавляли 707 мкл (5.2 ммоль) триэтиламина. Далее по каплям при постоянном перемешивании добавляли 0.86 г (2.55 ммоль) флуоренилметоксикарбонилоксисукцинимода в 5 мл диоксана и выдерживали 30 мин при 20°C при перемешивании. По окончании реакции (ТСХ-контроль в системе растворителей А) реакционную смесь концентрировали в вакууме и выливали в 8 мл 1.5 М HCl. Осадок отфильтровывали, промывали водой (2 × 5 мл) и высушивали при 45°C. Выход целевого соединения 0.75 г (95%), R_f 0.5 (A).

n-Нитрофениловый эфир N-(9-флуоренилметоксикарбонил)-β-аланина (2). К раствору 0.91 г (2.90 ммоль) N-флуоренилметоксикарбонил-β-аланина в 5 мл абсолютного диоксана добавляли при перемешивании 0.40 г (2.90 ммоль) n-нитрофенола и 0.66 г (3.20 ммоль) N,N-дициклогексилкарбодииимида; перемешивание продолжали 24 ч (20°C). По окончании реакции (ТСХ-контроль в системе А) в реакционную смесь добавляли 500 мкл воды, осадок отфильтровывали и раствор упаривали в вакууме до пенообразного остатка. Выход соединения (2) 1.20 г (95%), R_f 0.8 (A).

2-Амино-1,3-пропандиол (3) выделяли из оксалата действием гидроксида кальция. Последовательные реакции трифторацетилирования и тритилирования соединения (3) проводили по методикам [6] и [9] соответственно. Последующее деблокирование аминогруппы с образованием соединения (4) осуществляли обработкой насыщенным водным аммиаком в этаноле в течение 2 ч при 45°C и 24 ч при 20°C при перемешивании. По окончании реакции (ТСХ-контроль в системе А)

реакционную смесь упаривали в вакууме до масла и хроматографировали на колонке с силикагелем в системе растворителей В. Выход соединения (4) 73%, R_f 0.25 (А).

3-Диметокситритилокси-2-[{N-(9-флуоренилметоксикарбонил)-3-аминопропионил]амино}пропанол (5). К раствору 1.2 г (2.78 ммоль) *n*-нитрофенилового эфира (2) в 10 мл абсолютного диоксана добавляли 0.02 г (0.3 ммоль) имидазола и при перемешивании по каплям 1.14 г (2.90 ммоль) 2-амино-1-диметокситритилоксипропанола-3 (4) и перемешивали 24 ч (20°C). По окончании реакции (ТСХ-контроль в системе Б) реакционную смесь упаривали до масла и хроматографировали на колонке с силикагелем в системе В. Выход соединения (5) 1.20 г (63%), R_f 0.4 (Б).

¹Н-ЯМР-спектр (CDCl_3 ; приведены сигналы алифатических протонов): 6.1 (д, 1H, $\text{CH}-\text{NH}-\text{CO}$, J 7.9), 5.53 (ущир. т, 1H, $\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}$, J 6.1), 4.35 (ущир. д, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}$, J 7.0), 4.18 (т, 1H, CH_2-CH , J 7.0), 4.1 (м, 1H, $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2$), 3.75 (с, 6H, CH_3O), 3.7 (м, 2H, OCH_2-CH , J_1 11.3, J_2 4.8), 3.48 (м, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 3.3 (м, 2H, $\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$, J_1 11.3, J_2 4.0), 2.41 (м, 2H, $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$).

1-(N,N-Дизопропиламино)- β -цианэтилфосфит (6) соединения (5) был получен в виде желтоватого масла с выходом около 90% (без хроматографической очистки), R_f 0.7 (А) с добавлением 1% триэтиламина.

Синтез природных и модифицированных олигонуклеотидов осуществляли на автоматическом ген-синтезаторе Applied Biosystems 380B (США) с увеличением по сравнению со стандартным протоколом времени конденсации на стадии присоединения модифицированного звена до 5 мин; концентрация растворов модифицированных амидофосфитов составляла 0.15 М. В качестве полимерных носителей использовали: Small Scale dN CPG Applied Biosystems (США) с удельной загрузкой 24 мкмоль/г.

Деблокирование олигонуклеотидов после синтеза, анализ реакционных смесей и выделение олигонуклеотидов проводили согласно [6].

Ацилирование уксусным ангидридом, а также реакцию с флуоресцеинизотиоцианатом для олигонуклеотидов, содержащих аминогруппу, осуществляли по методике [7].

Ацилирование янтарным ангидридом олигонуклеотидов, содержащих аминогруппу, проводили на основе методики [10] в 0.25 М бикарбонатном буферном растворе (рН 8). 1.0 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида растворяли в 500 мкл буфера, прибавляли 500 мкл 40 mM раствора янтарного ангидрида в абсолютном ацетонитриле и выдерживали смесь 1 ч при 20°C, периодически ее встряхивая. Продукт выделяли методом гель-фильтрации на колонке NAP-25 (Pharmacia, Шве-

ция). Анализ проводили с помощью ион-парной ВЭЖХ на градиентной системе Waters (США) с шагом элюции 2 нуклеотидных звена в 1 мин. Условия разделения: колонка 4 × 250 мм, сорбент Диасорб С16_T (7 мкм), 48 mM калий-фосфатный буфер (рН 7), содержащий 2 mM тетрабутиламмонийдигидрофосфат, градиент ацетонитрила 5 - 40%, скорость потока 1 мл/мин, температура 45°C. Выход карбоксилсодержащих олигонуклеотидов 95%.

Реакцию между цепями модифицированного олигонуклеотидного дуплекса В проводили в 0.05 M MES-буфере (рН 6.7) в присутствии 0.02 M хлорида магния (в условиях CDI-индукцируемой реакции химического лигирования [11]). По 0.1 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотидов растворяли в 37 мкл буферного раствора, нагревали до 95°C, охлаждали до 20°C и добавляли 37 мкл 0.4 M раствора CDI в том же буфере. Реакционную смесь анализировали в условиях, приведенных выше, и через 120 ч при 20°C продукт выделяли методом ион-парной ВЭЖХ.

Ферментативный гидролиз. 0.2 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотидного материала растворяли в 8 мкл 0.2 M трис-HCl-буфера, содержащего 0.04 M MgCl₂ (рН 8.5), и добавляли по 1 мкл щелочной фосфатазы (0.26×10^{-3} ед. акт./мл) и фосфодиэстеразы змеиного яда (0.48×10^{-2} ед. акт./мл). Реакционную смесь инкубировали 180 мин при 56°C. Продукты гидролиза анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ (ион-парный вариант) в условиях, аналогичных описанному ранее [6].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goodchild J. // Bioconj. Chem. 1990. V. 1. P. 165 - 187.
- Beaucage S.L., Iyer R.P. // Tetrahedron. 1993. V. 49. P. 1925 - 1963.
- Erlanson D.A., Chen L., Verdine G.L. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 12583 - 12584.
- Ferentz A.E., Wiorkeiwicz-Kuczera J., Karplus M., Verdine G.L. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 7569 - 7583.
- Королева О.Н., Волков Е.М., Орецкая Т.С., Шабарова З.А. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 40 - 49.
- Кузнецова Л.Г., Романова Е.А., Волков Е.М., Ташицкий В.Н., Орецкая Т.С., Крынецкая Н.Ф., Шабарова З.А. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 455 - 466.
- Agrawal S., Christodoulou C., Gait M.J. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 6227 - 6245.
- Калинин Ф.Л., Лобов В.П., Жидков В.А. Справочник по биохимии. Киев: Наук. думка, 1971. С. 154 - 269.
- Jones R.A. // Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach / Ed. M.J. Gait. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1984. P. 23 - 24.
- Bischoff R., Coull J.M., Regnier F.E. // Anal. Biochem. 1987. V. 164. P. 336 - 344.
- Долинная Н.Г., Грязнова О.И., Соколова Н.И., Шабарова З.А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 755 - 763.

Synthesis of Modified Oligonucleotides and Their Duplexes with Covalently Linked Strands

S. I. Antsypovich*, E. M. Volkov*, T. S. Oretskaya*,¹ E. A. Romanova*,
V. N. Tashlitskii*, M. Blumenfel'd**, and Z. A. Shabarova*

* Moscow State University, Chemical Faculty, Moscow, 119899 Russia

** Genset Co., Paris

Abstract – A method for the synthesis of DNA duplex with covalently linked strands was elaborated, and the thermal and hydrolytic stability of the duplex was studied. The strands were connected via an amide bond between carboxyl and aliphatic amino groups in the presence of water-soluble carbodiimide. For this purpose, a series of modified 5- to 26-meric oligonucleotides with primary amino or carboxyl group were prepared, and their properties were investigated.

Key words: modified oligonucleotides, 2'-amino-2'-deoxycytidine, DNA-duplex with covalently linked strands.

¹ To whom correspondence should be addressed.