



УДК 547.963.3

**ГЕН-НАПРАВЛЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА  
(АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ)\***

© 1997 г. Д. Г. Кнорре

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 11.03.96 г.

Обзор суммирует работы, выполненные в последние 8 лет в рамках Российской государственной научно-технической программы "Новейшие методы биоинженерии". Описаны новые адресующие конструкции, в первую очередь основанные на создании тандемов двух или более олигонуклеотидов на нуклеиновой кислоте-мишени, реакционная способность которых повышена за счет стабилизации части компонентов тандема присоединением полиароматических систем (метод эффекторов) или в результате формирования реакционного центра в результате сближения компонентов активного центра в тандеме. Описаны также реагенты – производные олигонуклеотидов, в том числе производное антибиотика блеомицина, способное осуществлять расщепление мишени в каталитическом режиме. Представлены данные о взаимодействии олигонуклеотидов с белками клеток и живых организмов, в том числе с открытыми в ходе этих работ белками-рецепторами, а также с рецептором CD4 Т-хелперов, иммуноглобулинами и некоторыми факторами роста.

*Ключевые слова:* нуклеиновые кислоты; производные олигонуклеотидов; антисмысловые олигонуклеотиды; химические реакции в дуплексах и триплексах; хроматин.

Научное направление "Ген-направленные биологически активные вещества" в составе Государственной научно-технической программы "Новейшие методы биоинженерии" (1988 г.) появилось в связи с интенсивным развитием в СССР оригинальных работ по направленной модификации нуклеиновых кислот с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов. Поскольку основная идея подхода состоит в направлении (адресовании) реакционноспособной группы на определенный участок нуклеиновой кислоты-мишени с помощью комплементарного этому участку олигонуклеотида, авторы назвали метод комплементарно-адресованной модификацией. Идея подхода была высказана в 1967 г. Н.И. Гриневой в работе [1], где было описано первое реакционноспособное производное динуклеотида, несущее N-метил-N-(2-хлорэтил)аминофенильный остаток (RCI). Направленность действия такого типа производных была впервые продемонстрирована на примере модификации дрожжевой валиновой тРНК с помощью производного pCGrA > CHRCI, кото-

рое алкилировало преимущественно три участка тРНК, расположенные на одинаковом расстоянии от ее фрагментов t(CG) тРНК, комплементарных адресующей части pCG-производного [2]. Весь цикл как отечественных, так и зарубежных работ по этой теме по состоянию на начало 1991 г. описан в обзоре [3], а по состоянию на начало 1994 г. – в монографии [4]. За рубежом интерес к воздействию на функции нуклеиновых кислот возник после появления в 1978 г. работы Замечника и Стефенсон [5], в которой было описано подавление развития в клетках эмбриональных фибробластов цыпленка вируса саркомы Рауса с помощью олигонуклеотида, комплементарного участку нуклеиновой кислоты этого вируса. Интенсивное развитие этих исследований, направленных в конечном счете на создание нового поколения противовирусных и противоопухолевых препаратов, за рубежом началось в 80-х годах. Так как во всех случаях речь идет о воздействии на участки нуклеиновых кислот, имеющие определенное биологическое значение (смысл), такой подход получил название антисмыслового подхода (antisense). В отличие от первых 10–15 лет, когда данное научное направление развивалось практически лишь в нашей стране, после 1985 г. работа велась в условиях жесткой конкуренции при более масштабном (на два порядка) финансировании этих работ за рубежом, в первую очередь в США и Франции. В настоящей

\* Итоги работы научного направления в рамках Государственной научно-технической программы "Новейшие методы биоинженерии".

Использованные сокращения: Blm – блеомицин, Im – имидазол-2-ил, RCI – 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]фенил-, Phn – остаток N-(2-гидроксиэтил)феназина; префикс "d" в обозначениях дезоксирибонуклеотидов ввиду опущен, для нуклеотидов рибонуклеотида введе префикс "r".



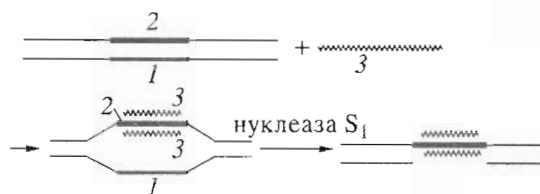


Схема 1. Расщепление двунитевой ДНК с помощью нуклеазы S1 по участку, содержащему олигопиримидиновый (1) и комплементарный олигопуриновый фрагмент (2) после связывания ею пиримидинового "пептидного" олигонуклеотида (3).

статье основной акцент делается на те отечественные работы последних лет, которые являются оригинальными и выполнены на уровне лучших зарубежных исследований. Перечень рассматриваемых вопросов, отраженный в заголовках разделов, включает лишь те, по которым имеются серьезные конкурентоспособные достижения.

### 1. Адресующие конструкции

Основа антисмысловой технологии – использование структур, специфичных к определенным участкам нуклеиновых кислот. Первоначально речь шла о действии на однонитевые нуклеиновые кислоты с помощью комплементарных последовательностей. На этом этапе помимо самих олигонуклеотидов [5] и их реакционноспособных производных было предложено использовать также производные, несущие полиароматические системы, стабилизирующие образование дуплексов [6], а также заменить фосфодизфирные олигонуклеотиды их неионными аналогами – фосфотриэфирами [7] или метилфосфонатными аналогами [8]. В соответствии с ожиданиями авторов подхода оказалось, что производные неионных аналогов существенно лучше проникают через клеточную мембрану, что позволило осуществить направленное алкилирование oligo(rA)-фрагментов мРНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха RCl-производными фосфозтиловых эфиров олиготимидилатов [9, 10]. Позднее были созданы реагенты, несущие алкилирующую группу, связанную с метилфосфонатными аналогами олиготимидилатов [11, 12].

Для улучшения проникновения реакционноспособных олигонуклеотидов в клетки в качестве альтернативного подхода было предложено и нашло широкое развитие присоединение к концу, противоположному точке присоединения реакционноспособной группы, остатка стероида – эргостерина, тестостерона и холестерина [13]. На примере присоединения к реакционноспособным производным олигонуклеотидов с противоположного конца полиароматического остатка N-(2-гидроксиэтил)феназина было показано, что происходит

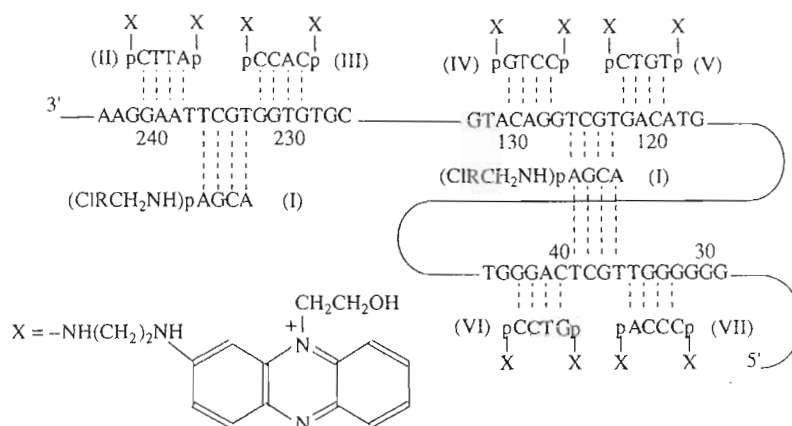
резкое повышение эффективности направленной модификации, что позволяет либо уменьшить длину адресующего олигонуклеотида, либо значительно понизить используемые концентрации такого реагента [14, 15]. Существенное повышение эффективности алкилирования было достигнуто и при введении остатка N-(2-гидроксиэтил)феназина в метилфосфонатные аналоги oligo(T), несущие на 3'-конце RCl-группу [16].

Для направленной модификации ДНК, находящейся в клетках в двунитевой форме, было предложено использовать способность участков ДНК, у которых одна нить состоит из пиримидиновых, а другая – из пуриновых нуклеотидов, образовывать трехнитевые структуры (триплексы) с соответствующими гомопиримидиновыми или гомопуриновыми олигонуклеотидами [17–20].

В рамках программы систематические исследования триплексов проводились в Институте молекулярной генетики РАН. Наиболее оригинальные работы выполнены в содружестве с датским ученым Нильсоном, который создал так называемые пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК). Эти соединения имеют пептидный остов с размерами каждого звена, хорошо соответствующими одному дезоксирибозофосфатному фрагменту, и содержат в качестве боковых радикалов гетероциклические основания, характерные для основных четырех нуклеотидов – компонентов ДНК. Оказалось, что ПНК дают с соответствующими структурами дуплексы и триплексы, более прочные, чем свойственно обычным нуклеиновым кислотам. Поэтому при наличии в составе двунитевой ДНК олигопуринового – олигопиримидинового участка они вытесняют пиримидиновый фрагмент комплементарной цепи и дают триплекс, состоящий из пуринового фрагмента ДНК и двух ПНК. Пиримидиновая цепь исходной ДНК становится однонитевой структурой и может быть расщеплена с помощью специфичной к однонитевым нуклеиновым кислотам нуклеазы S1 (схема 1). Это открывает возможность селективного расщепления двунитевых структур по олигопиримидиновым фрагментам, т.е. превращает нуклеазу S1 в рестриктазу [21, 22]. Образование такой же структуры с помощью ПНК, несущей остаток биотина, позволило локализовать олигопиримидиновые фрагменты на хромосоме по связыванию стрептавидина, который достаточно хорошо виден под электронным микроскопом [23].

Оригинальные адресующие конструкции повышенной селективности были созданы на основе образования на комплементарной мишени тандемов из двух и более олигонуклеотидов. Использование подобных тандемов для проведения эффективных реакций было впервые выполнено в работах Кораны для сшивания соседних звеньев тандема с помощью ДНК-лигазы [24], а позднее З.А. Шабаровой





**Рис. 1.** Селективное алкилирование 302-членного однонитевого фрагмента ДНК по одному из трех идентичных сайтов производным тетрауклеотида (I) в присутствии пар бисфеназиниевых производных тетрауклеотидов-эффекторов (II, III), (IV, V) или (VI, VII).

с сотрудниками для химического лигирования таких звеньев [25].

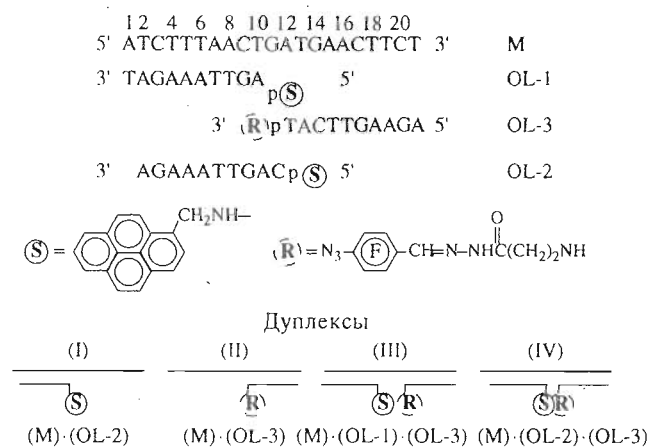
В работах В.Ф. Зарытовой с сотрудниками было показано, что тандемные комплексы существенно упрочняются, если во все или в некоторые олигонуклеотидные компоненты тандема введены полиароматические остатки, например N-(2-гидроксиэтил)феназиния (Phn). Это упрочнение проявляется, в частности, в том, что в структуре, состоящей из RCl-производного олигонуклеотида или его метилфосфонатного аналога [26, 27], фланкированного двумя Phn-производными олигонуклеотидов, существенно повышается эффективность алкилирования. Поскольку эти производные влияют на ход химического превращения, они были названы эффекторами этого превращения. Наиболее впечатляющие результаты были получены при использовании тетрауклеотидов, несущих остатки RCl. Реагенты со столь коротким адресом практически неспособны алкилировать мишень. Добавление двух эффекторов – олигонуклеотидов, несущих Phn-остатки и удлиняющих область комплементарности слева и справа, привело к высокой степени модификации. Эксперименты проводились с 300-звенным однонитевым фрагментом ДНК, содержащим три идентичные последовательности (3')TCGT(5') в составе фрагментов

(3')-GGAATTCGTGGTGT-(5'), (3')-ACAGGTTCGTGACAT-(5') и (3')-GGGACTCGTTGGGG-(5') (рис. 1). В качестве реагента, комплементарного этим последовательностям, был использован (CIRCH<sub>2</sub>NH)pAGCA. В зависимости от добавленной пары эффекторов алкилирование специфично проходило только по одному из участков. Например, при использовании в качестве эффекторов бисфеназиниевых производных тетрауклеотидов (Phn)pGTCCp(Phn) (IV) и (Phn)pCTGTp(Phn)

(V), комплементарных участкам 129–126 и 121–118 мишени, модификация проходила строго только по G<sup>123</sup> мишени, т.е. эффективный комплекс с реагентом образовывался только с участком 125–122. Аналогично, соответствующим подбором пар эффекторов, удалось провести селективное алкилирование по G<sup>37</sup> и G<sup>234</sup> [28].

Метод эффекторов открывает совершенно новые возможности использования очень коротких олигонуклеотидов в качестве носителей реакционноспособных групп с сохранением высокой селективности. Это в будущем может оказаться очень важным при практическом использовании адресованных реагентов, поскольку существенно удешевит стоимость препаратов и в перспективе позволит иметь заранее заготовленный полный набор всех 256 четырехзвенных реагентов и 256 эффекторов для оперативного создания конструкций против новых мутаций в вирусах или онкогенах.

В связи с открывшейся перспективой использования тандемных коротких олигонуклеотидов с реакционноспособными группами для воздействия на нуклеиновые кислоты в живых организмах представляло интерес повысить гидрофобность таких производных путем введения остатков стероидов для улучшения их проникновения в клетки. Эксперименты проведены на производных олигонуклеотида pCAGC (D), содержащих остаток CIRCH<sub>2</sub>NH-на 5'-конце (RCl-D) и остаток стероида на 3'-конце – холестерина (RCl-D-Chs) или эстрогена (RCl-D-Est). В качестве эффекторов использовали производные олигонуклеотидов pGCATCAAG (E<sub>2</sub>) и pTCCAGGCA (E<sub>1</sub>), фланкирующих реагент соответственно с его 5'- и 3'-концов на мишени (3')CGT-AGTTCGTCTGA<sup>9</sup>GGTCCGTp (5') (M). Эффекторы содержали либо два остатка Phn с обоих концов, либо один остаток Phn и один остаток стероида.



**Схема 2.** Фотосенсибилизированная модификация 21-звенного олигонуклеотида-мишени М с помощью тандема (III) или (IV) из двух комплементарных мишени олигонуклеотидов, несущих на стыке сенсибилизатор S и фотоактивный реагент R.

Стабильность образующихся тандемных структур определялась с использованием производных D, не содержащих остатка  $\text{ClRCH}_2\text{NH}$ -. Комплекс  $\text{M} \cdot \text{D}$  имеет температуру плавления ниже  $7^\circ\text{C}$ . Будучи фланкирован олигонуклеотидами  $\text{E}_1$  и  $\text{E}_2$ , он имеет  $T_{\text{пл}}$   $23^\circ\text{C}$ . Для D-Chs, фланкированного  $\text{E}_1$  и  $\text{E}_2$ ,  $T_{\text{пл}}$  равна  $17^\circ\text{C}$ , т.е. введение остатка холестерина снижает стабильность тандема. В системах  $\text{M} \cdot \text{Phn-E}_2\text{-Phn} \cdot \text{D-Chs} \cdot \text{Phn-E}_1\text{-Phn}$  и  $\text{M} \cdot \text{Chs-E}_2\text{-Phn} \cdot \text{D-Chs} \cdot \text{Chs-E}_1\text{-Phn}$  температуры плавления соответственно равны  $32$  и  $43^\circ\text{C}$ . Из наблюдаемой разницы значений температуры плавления видно, что контакт остатка холестерина с феназином менее благоприятен для стабилизации тандема, чем контакт двух стероидов. Об этом же свидетельствуют и результаты алкилирования реагентом  $\text{RCl-D-Chs}$ . Сам по себе реагент матрицу не алкилирует, в системе  $\text{M} \cdot \text{Phn-E}_2\text{-Phn} \cdot \text{RCl-D-Chs} \cdot \text{Phn-E}_1\text{-Phn}$  наблюдаемая степень модификации  $\text{G}^9$  составляет 6%, а в системе  $\text{M} \cdot \text{Chs-E}_2\text{-Phn} \cdot \text{RCl-D-Chs} \cdot \text{Chs-E}_1\text{-Phn}$  модифицируется 13% остатков  $\text{G}^9$  и 3%  $\text{G}^7$ . Интересно, что для реагента  $\text{RCl-D-Est}$  в случае контакта стероида с феназином степень модификации  $\text{G}^9$  с теми же эффекторами достигает 20%, а в случае контакта эстрогена с холестерином [29] она составляет 25% для  $\text{G}^9$  и 15% для  $\text{G}^7$ .

Второй тип тандемных структур, обеспечивающих высокую селективность, основан на связывании с мишенью двух олигонуклеотидов, несущих компоненты реакционного центра, который формируется только при сближении этих компонентов, обусловленном образованием тандема на комплементарной нуклеиновой матрице. Подход ре-

ализован впервые на мишени  $(5')\text{ATCTTTAACTG}^{10}\text{-ATGAACTTCT}^{20}(3')$  с олигонуклеотидами, комплементарными участкам 1–10 и 11–20 мишени, первый из которых содержит на 5'-конце сенсибилизатор (пирен), а второй – на 3'-конце фотоактивный перфторарилазид, недавно введенный в практику адресованной модификации нуклеиновых кислот Г.В. Шишкиным с сотр. [30, 31]. При этом с концевым фосфатом олигонуклеотида был связан радикал  $(\text{R}) \text{N}_3\text{C}_6\text{F}_4\text{CH}=\text{N}-\text{NH}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NH}$ -. Наличие в тандемной структуре фотосенсибилизатора (структуры (III) и (IV), схема 2) приводило к эффективной модификации мишени при облучении длинноволновым УФ-светом (365 нм) этих систем при практически полном отсутствии прямой фотомодификации в отсутствие нуклеотидов OL-1 или OL-2 (структуры (I) и (II)) [32].

Все описанные выше адресующие конструкции имели олигонуклеотидную природу. Известно, однако, что ДНК специфично реагирует с некоторыми антибиотиками и многими белками. В связи с этим перспективным представляется разработка реакционноспособных производных таких антибиотиков. В работах, выполненных в Институте молекулярной биологии РАН, было показано, что комплекс Pt-биснетропсин, связывающийся со специфичными сайтами на ДНК, при облучении рентгеновскими лучами способствует расщеплению ДНК вблизи участков связывания антибиотика [33, 34]. На примере аналога антибиотика нетропсина, содержащего связанный с одним из двух N-пропилпиррольных колец пептидный фрагмент  $\text{Gly}_2\text{-His-Gly}_n$ , показано, что при наличии хелатированного иона  $\text{Cu}^{2+}$  в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  и аскорбата происходит расщепление двунитевой ДНК вблизи участка связывания нетропсина. Селективное расщепление происходит при облучении комплекса медьсодержащего аналога рентгеновскими лучами. Специфичность расщепления в последнем случае авторы объясняют преимущественным поглощением рентгеновских квантов атомами с большой атомной массой и последующей эмиссией Оже-электронов с образованием многозарядного положительного катиона [35]. Перспективными в адресующих конструкциях могут оказаться и пептиды. Например, синтезированный недавно 23-звенный пептид  $\text{GCIDCKLK-KLKCSKEKPKCAKCK}$  в комплексе с ионами цинка конкурирует с антибиотиком дистамицином А за связывание с двунитевой ДНК [36, 37].

## 2. Новые типы реагентов

Большой цикл работ по комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот был выполнен с использованием алкилирующих производных олигонуклеотидов. Однако было



очевидно, что эти реагенты далеко не оптимальны. Во-первых, они работают как одноразовые, т.е. в принципе могут осуществить только один акт модификации, и, следовательно, должны использоваться в избытке по сравнению с мишенью. Привлекательным было создать реагенты, обладающие каталитическим действием. Перспективными для этой цели представлялись металлокомплексы, способные индуцировать окислительно-восстановительную деструкцию нуклеиновых кислот. Однако первые эксперименты, выполненные с геминными производными олигонуклеотидов, показали, что эффективность их действия не очень велика. Количественные исследования в системе, содержащей геминное производное и  $H_2O_2$ , продемонстрировали, что с высокими скоростями идут как минимум два побочных процесса – окислительное разрушение гемина и катализируемое геминном разложение  $H_2O_2$ ; в итоге на одну молекулу реагента разрушается менее одной молекулы мишени [38]. Это, конечно, не исключает того, что должный подбор структуры металлокомплекса и окислителя может дать желаемый результат.

Каталитический режим удалось наблюдать в случае другого металлокомплекса – природного антибиотика блеомицина (Blm). В.Ф. Зарытовой с сотрудниками была успешно решена задача ковалентного присоединения олигонуклеотида к этой сложной органической молекуле по аминогруппе спермидинового фрагмента [39]. На примере расщепления однонитового 302-звенного фрагмента

ДНК, содержащего участок (5')- GAATGGGAG-<sup>258</sup>  
AAGGG<sup>272</sup>TCAGGT<sup>277</sup>-(3'), производным блеомицина (3') ACCCTTCTCCCAp(Blm) (5'), комплементарным участку 261–272 мишени, показано, что модификация происходит с высокой селективностью по остатку T<sup>272</sup>, а в случае производного (3') ACCCTTCTCCAGTp(Blm) (5'), комплементарного участку 261–274, расщепление происходит по звену T<sup>277</sup> (рис. 2) [40]. С этим производным в условиях недостатка реагента удалось получить три акта расщепления мишени на каждую молекулу реагента [41].

В качестве еще одного варианта окислительно-восстановительных систем для расщепления нуклеиновых кислот в работах М.Е. Вольпина и Г.Н. Новодаровой было предложено использовать кобальт-корриновые комплексы. Было показано, что такие комплексы эффективно превращают суперспирализованную плазмиду pBR322 в релаксированную форму [42]. З.А. Шабаровой с сотрудниками были разработаны методы присоединения таких структур к олигонуклеотидам и были получены производные, комплементарные участкам 13–26 и 17–27 5S РНК рибосом *E. coli* (рис. 3). Было найдено, что в присутствии аскорбиновой кислоты расщепление РНК происходит по ограни-

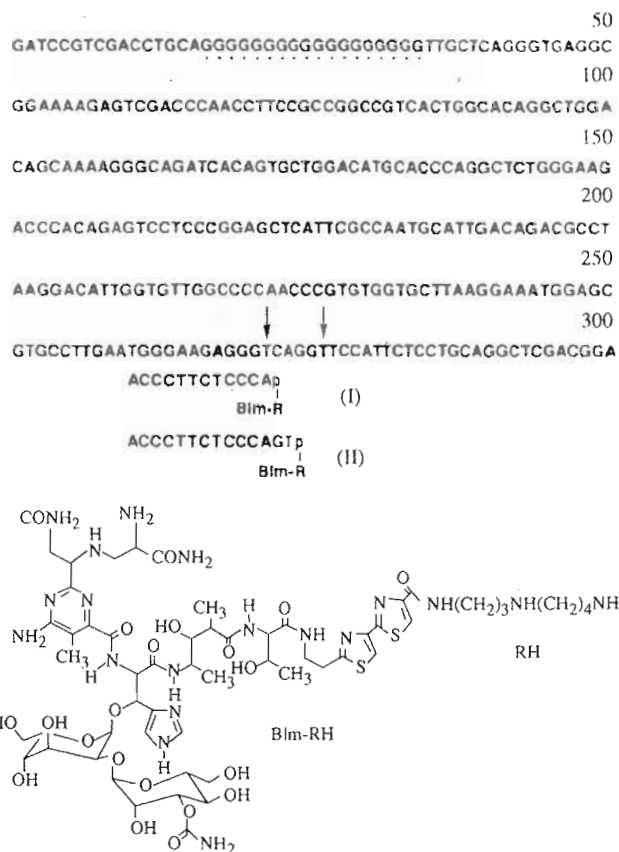


Рис. 2. Структура блеомициновых производных дезоксирибоолигонуклеотидов (I) и (II), использованных для окислительной деструкции 302-звенного фрагмента однонитовой ДНК. Стрелками указаны модифицируемые остатки тимидина.

ченному числу мест вблизи участков, способных образовывать несовершенные дуплексы с олигонуклеотидной частью реагента [43].

Новый подход к созданию реагентов, каталитически действующих на РНК, начал разрабатываться В.В. Власовым в содружестве с французскими учеными. С этой целью на основе N-метилфеназина создано несколько реагентов, содержащих два остатка имидазола (Im), введенные через соответствующие спейсеры в *мета*-положения одного из бензольных колец. По замыслу авторов, эти реагенты должны моделировать активный центр рибонуклеазы А. Показано, что они эффективно расщепляют тРНК по нескольким точкам. Наиболее эффективное расщепление получено в случае реагента, содержащего фрагмент  $NHCH(CH_2Im)CONHCH_2CH_2CONHCH_2CH_2Im$  [44].

Большой интерес в качестве адресованных реагентов представляют фотоактивируемые соединения. За последние годы прошли испытание несколько новых реагентов. Наиболее обстоятельно были исследованы производные арилазидов. Были разработаны методы их введения в концевые



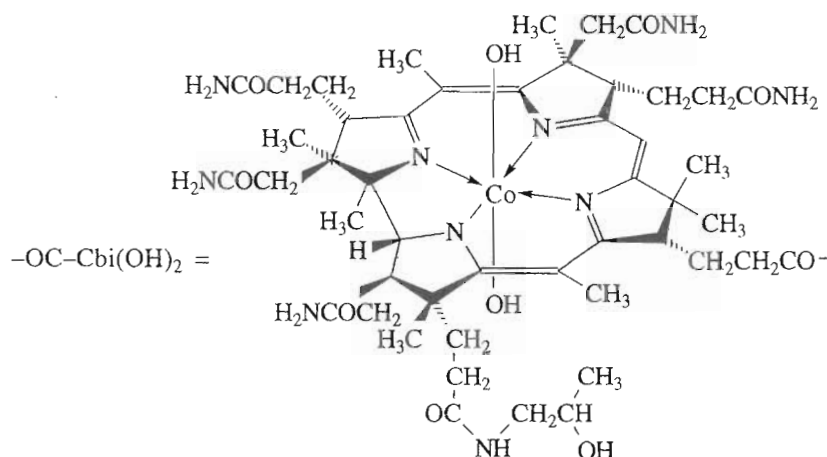
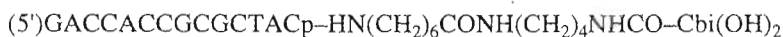


Рис. 3. Структура кобальт-корринового производного дезоксирибоолигонуклеотида, комплементарного 13–26-участку 5S РАН *E. coli*.

положения олигонуклеотидов и в С5-положение 2'-дезоксиуридина и исследована адресованная модификация производными, содержащими такие радикалы. Была сопоставлена реакционная способность трех азидов: производных *n*-азидобензойной, 2-нитро-5-азидобензойной и *n*-азидоперфторбензойной кислоты. Было показано, что степень модификации одной и той же мишени (5')-ТААГТГГА GTTTGGC-(3') (подчеркнута область взаимодействия с реагентом) реагентами (3') TTCACCU\* (5') (U\* – производное 2'-дезоксиуридина, несущее при С5-атоме соответствующий азидобензоильный остаток, связанный через спейсер -CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) в одинаковых условиях составляет соответственно 5, 21 и 64%, т.е. перфторазидобензоильный остаток обладает существенно более высокой эффективностью при модификации нуклеиновых кислот [31]. Сравнение модификации этим реагентом нескольких мишеней, в которых перфторазидобензоил был адресован на разные нуклеозиды, показало, что наиболее эффективно модифицируются остатки гуанина [45]. Производное рТ<sub>16</sub>, содержащее перфторбензоильный остаток, связанный с 5'-концевым фосфатом через диаминопропановый спейсер, модифицировало при облучении остатки гуанина в дуплексе, образованном комплементарными олигонуклеотидами рGCGCACG<sup>7</sup>-A<sub>16</sub>-GTTCG и (3') CGCGTGC<sup>22</sup>-T<sub>16</sub>-CAGCp, причем модификации преимущественно подвергались остатки G<sup>7</sup> первой и G<sup>22</sup> второй цепи. Оба остатка находятся вблизи границы триплекса, образуемого фрагментами A<sub>16</sub> и T<sub>16</sub> дуплекса и рТ<sub>16</sub> реагента [46].

Высокую селективность модификации показали производные олигонуклеотидов, содержащих

в качестве фотоактивной группы остаток Pd(II) копропорфирина [47]. В этом случае модификации подвергалась 34-мерная мишень, а реагент содержал олигонуклеотид, комплементарный участку 1–17 мишени. Порфирин был присоединен по одной из групп CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH через спейсер NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH к 5'-фосфату олигонуклеотида. Модификация при облучении комплекса светом длиной волны 330–410 нм проходила в области расположения порфирина в основном по остатку G<sup>17</sup> и в существенно меньшей степени по T<sup>16</sup>.

Интересными фотоактивными реагентами оказались олигонуклеотидные производные этидия и азидоэтидия. Такие производные представляют интерес в связи с тем, что введение этидия и его азиды существенно повышает стабильность образующихся дуплексов. Для связывания с олигонуклеотидом в одно из фенильных колец вводился остаток 3-аминопропионовой кислоты. Введение в этидий азидогруппы на пять порядков по сравнению с этидием повышает квантовый выход фотохимического превращения [48]. Благодаря высокой стабильности образующихся структур эти производные с высокой эффективностью осуществляли адресованную фотомодификацию в триплексах. Исследование было проведено на двунитевых ДНК длиной 190 и 110 п. о., содержащих фрагмент р(AG)<sub>6</sub>A · (3')р(TC)<sub>6</sub>T(5'), с помощью азидоэтидия связанного с 5'-концом олигонуклеотида рТ(СТ)<sub>6</sub>. При облучении такого триплекса наблюдается образование ковалентного аддукта с выходом до 40%, который после пиперидиновой обработки дает расщепление в основном по остатку гуанина пуриновой нити, предшествующему олигопуриновому фрагменту, формирующему триплекс [49].



### 3. Взаимодействие реакционноспособных производных с ДНК и белками хроматина

В первоначальном варианте адресованная модификация могла быть применена только к однонитевым нуклеиновым кислотам. В такой форме, за исключением небольшого числа бактериофагов, содержащих однонитевую ДНК, метод был пригоден только для воздействия на информационные РНК. Для модификации ДНК эукариот, в особенности ДНК онкогенов и интегрированных вирусных геномов, необходимо воздействие на хроматин. Такие эксперименты впервые были выполнены в работах Н.Д. Кобеца и В.В. Власова с сотрудниками на примере хроматина из плаценты человека [50] и из ядер печени крысы [51] с реагентом  $(\text{CIRCH}_2\text{NH})\text{pT}_{16}$ . В дальнейшем были сопоставлены два разных реагента. Было установлено, что в составе суспензионного хроматина печени крысы  $(\text{CIRCH}_2\text{NH})\text{pT}_{16}$  и  $(\text{CIRCH}_2\text{NH})\text{pA}_{16}$  алкилируют ДНК, причем степень модификации достигает 20 молекул реагента на  $10^6$  п. о. ДНК. Процесс оказался специфичным к последовательности, поскольку существенно подавлялся избытком гомологичного олигонуклеотида, не содержащего остатка CIR. ДНК, предварительно выделенная из хроматина, модифицировалась в 50 раз слабее. Было сделано заключение, что ДНК в составе хроматина содержит частично развернутые участки или легко разворачивается под действием реагентов [52].

Было проведено сопоставление способности алкилироваться такими производными ДНК в составе хроматина и метафазных хромосом из мышечных фибробластов. Для производных  $\text{pT}_{16}$  модификация метафазных хромосом была в несколько раз ниже, чем в случае хроматина. Однако для производного  $(\text{CIRCH}_2\text{NH})\text{p}(\text{AC})_6$  модификация метафазных хромосом достигала величины 100 моль на  $10^6$  моль ДНК [53]. Аналогичные результаты были получены на ядрах клеток HeLa с производными  $(\text{CIRCH}_2\text{NH})\text{pT}_{16}$  и  $(\text{CIRCH}_2\text{NH})\text{p}(\text{AC})_6$  [54]. В последней работе было также обнаружено, что модификация подвергается набор белков хроматина, причем этот набор зависит от природы адресующего олигонуклеотида. В то же время при замене алкилирующей группы на азидобензоильные остатки (*n*-азидобензоильный, *n*-азидоперфторбензоильный и 2-нитро-5-азидобензоильный), связанные с концевым фосфатом  $\text{pT}_{16}$  через спейсер  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ , наблюдалось лишь уменьшение на порядок степени модификации ДНК хроматина, но модификация белков проходила даже более эффективно, а набор модифицированных белков при этом не изменялся [55].

### 4. Проникновение в клетки, введение в живые организмы и фармакокинетика

Выбор реагентов, эффективно взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами *in vitro* и в хроматине, – всего лишь первый этап на пути превращения адресованных реагентов в лекарственные препараты. За этим следует разработка способов проникновения их в клетки через гидрофобные клеточные мембраны. Как уже отмечалось, одним из естественных путей преодоления этого барьера было создание гидрофобных аналогов. Этот подход подразумевал, что олигонуклеотиды должны проходить через фосфолипидную часть мембран. Систематические исследования взаимодействия липосом с ДНК, проведенные В.Г. Будкером с сотрудниками, показали, что при этом захват происходит лишь в случае достаточно длинных молекул ДНК, причем это сопровождается втягиванием участка фосфолипидной мембраны с последующим отщуриванием этого участка и образованием везикулы, содержимое которой изолировано от исходной липосомы [56, 57]. Более того, оказалось, что холестеринные производные олигонуклеотидов вообще не проникают внутрь липосомы – холестеринный остаток залипает в липидном слое, а олигонуклеотидная часть остается экспонированной наружу [58]. В то же время оказалось, что присоединение остатка холестерина к 3'-концу  $(\text{CIRCH}_2\text{NH})\text{pT}_{10}$  повысило в 15 раз его содержание в мышечных фибробластах L-929, в 25 раз – в клетках асцитной карциномы Кребс-2 и в 10 раз уровень модификации ДНК хроматина в изолированных ядрах печени крысы [59]. Таким образом, наблюдавшаяся в этой и ряде других работ повышенная проницаемость клеточных мембран для холестеринных производных связана скорее всего с другими механизмами.

В связи с этой проблемой выяснения механизма транспорта антисмысловых конструкций через мембраны и путей повышения их способности проходить через мембраны является одной из центральных для использования антисмысловой технологии в биологических системах. Для ее решения предложены различные подходы [60, 61]. Одним из путей прохождения таких производных через мембраны может быть их взаимодействие со специальными рецепторами, данные о существовании которых получены в работе Л.А. Якубова и В.В. Власова с сотрудниками. Ими было показано, что при обработке клеток мышечных фибробластов L-929 RCl-производными олиготимидилата происходит модификация двух белков. Модификация подавлялась другими олигонуклеотидами, одно- и динитевыми нуклеиновыми кислотами. В то же время такие полианионы, как гепарин и хондроитинсульфат, не конкурировали с реагентами за связывание с белками. Это дало основание высказать предположение о существовании на

клетках специальных рецепторов нуклеиновых кислот [62]. Дальнейшие исследования модификации реагентом  $(\text{ClRCH}_2\text{NH})\text{pT}_{16}$ , проведенные на большом спектре клеток фибробластного происхождения, показали, что модифицируется преимущественно белок с молекулярной массой 79 кДа, а в некоторых случаях дополнительно белок 83 кДа. Такие же белки были обнаружены у гепатоцитов мышцы. Для них из зависимости степени модификации от концентрации реагента была определена константа ассоциации, равная  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Такая же величина была найдена для сродства алкилирующего производного фосфотиоатного аналога  $\text{pT}_{16}$  [63].

Проведено электронно-микроскопическое исследование проникновения реакционноспособных производных олигонуклеотидов в мышечные фибробласты. С этой целью к олигонуклеотиду по 5'-концевому фосфату присоединяли остаток  $\text{RCI}$ , а по 3'-концевому – остаток биотина. После инкубации с реагентом и фиксации через определенные промежутки времени клетки обрабатывали конъюгатом стрептавидин–золото и исследовали под электронным микроскопом. Установлено, что через 1–2 мин выдерживания с реагентом биотиновая метка равномерно распределена между ядром и цитоплазмой, а через 10 мин и более сосредоточена в основном в ядре. При использовании  $[\text{}^{32}\text{P}]$  олигонуклеотида, содержащего по 3'-концу остаток фотоактивного *n*-азидотетрафторбензальгидразон- $\beta$ -аланина, при облучении уже в первые минуты наблюдалось связывание метки с белками с молекулярной массой 70 и 75 кДа. При этом даже через 40 мин новые модифицированные белки в сравнимых количествах не появляются [64].

Такие же реагенты были использованы для локализации олигонуклеотидов в хроматине и метафазных хромосомах методами флуоресцентной и электронной микроскопии. В первом случае для проявления использовался конъюгат стрептавидина с флуоресцеинизотиоцианатом, во втором – комплекс стрептавидин–коллоидное золото. Установлено, что производное олигонуклеотида в интерфазных ядрах фиксируется главным образом в наиболее транскрипционно-активной части хроматина – в ядрышке. В метафазных хромосомах связывание происходит преимущественно с поверхностью хромосом [65].

Использованию антисмысловых олигонуклеотидов для подавления размножения вирусов и развития опухолевого роста серьезно препятствует их неустойчивость в биологических средах. Многочисленные исследования показали, что введение остатков холестерина и феназина повышает устойчивость олигонуклеотидов в клетках фибробластов L929 (см., например, [66]).

Для будущих биологических и медицинских применений чрезвычайно важна разработка методов введения олигонуклеотидов и их производных

в живые организмы. Установлено, что помимо внутривенного и интраперитонеального способов возможно введение производных олигонуклеотидов через слизистые оболочки носа, прямой кишки и влагалища, причем в скором времени неповрежденные олигонуклеотиды появляются в кровяном русле и кишечнике [67].

### *5. Неантисмысловые реакции реакционноспособных производных олигонуклеотидов в клетках и живых организмах*

Первые же исследования реакционноспособных производных антисмысловых олигонуклеотидов при введении их в живые организмы показали, что в сыворотке крови  $(\text{ClRCH}_2\text{NH})\text{pT}_{16}$  алкилирует сывороточный альбумин и иммуноглобулины G и M. Оказалось, что процесс не специфичен не только к последовательности нуклеотидов, но и к олигонуклеотидам вообще: модификация подавлялась как олигонуклеотидами другой структуры, так и ДНК и гепарином. По-видимому, речь идет о способности вышеназванных белков взаимодействовать с полианионами. Было показано, что в иммуноглобулине модификации подвергается N-концевой фрагмент легкой цепи. В то же время миоглобин препятствует модификации реагентом моноклональных антител против миоглобина, что свидетельствует о наличии взаимодействия вблизи активного центра иммуноглобулина. По-видимому, не все антитела обладают способностью к такому взаимодействию, поскольку при насыщающих концентрациях реагента алкилированию подвергается лишь около 10% всех иммуноглобулинов [68, 69].

Сходные результаты получены при изучении действия того же реагента на рекомбинантный рецептор CD4. В живых организмах этот рецептор встроен в мембрану Т-лимфоцитов-хелперов. Белок модифицируется реагентом  $(\text{ClRCH}_2\text{NH})\text{pT}(\text{TC})_6$ , причем модификация является аффинной. Из концентрационной зависимости степени модификации оценена константа диссоциации комплекса рецептор–реагент (200 нМ). Из данных по конкуренции определено сродство ряда олигонуклеотидов и их аналогов к CD4, которое сильно зависит от длины олигонуклеотида: для  $\text{pT}(\text{TC})_6$  величина  $K_d$  составляет 700, а для  $\text{pC}_{28}$  – 11 нМ. Значение  $K_d$  на порядок уменьшается при переходе к фосфотиоатным аналогам. Сродство возрастает также при присоединении к 5'-концу олигонуклеотида остатка холестерина [70]. Детальное количественное исследование показало, что имеются по крайней мере два места связывания олигонуклеотида. В случае  $(\text{ClRCH}_2\text{NH})\text{pT}_{15}$  кажущиеся константы связывания составляют 1 и 10  $\text{мкМ}^{-1}$  [71].

Исследование взаимодействия олигонуклеотидов и их фосфотиоатных аналогов с рядом ростовых



факторов показало, что некоторые из них, например кислый и основной факторы роста фибробластов, связывают олигонуклеотиды, в то же время для эпидермального фактора роста модификация не наблюдается. Фосфотиоатные аналоги олигонуклеотидов связываются с фактором роста, производимым тромбоцитами, хотя фосфодизфирные олигонуклеотиды с этим фактором не взаимодействуют [72].

#### 6. Биологические эффекты олигонуклеотидов и их производных

Подходы к воздействию на онкогены являются предметом разработок во многих лабораториях мира [73]. В России основные усилия в этом направлении были предприняты группой сотрудников Гематологического центра под руководством Н.И. Гриневой. Главной моделью их исследований были трансформированные онкогеном  $E_1$  аденовируса обезьяны крысиные клетки SH2 и мышинные клетки G11. В качестве адресующей конструкции авторы использовали ДНКазный гидролизат ондонитевой ДНК фага M13, в которую был вставлен фрагмент "плюс"- или "минус"-цепи ДНК онкогена. Первый тип ДНК поставлял антисмысловые, второй – смысловые олигонуклеотиды. Превращение такой смеси олигонуклеотидов в адресующий реагент в этих работах достигалось путем обработки специальным, так называемым включаемым алкилирующим реагентом –  $N,N,N'$ -трис(2-хлорэтил)- $N'$ -(*n*-формилфенил)пропилендиамином-1,3 [74]. Одна из двух алифатических хлорэтиламиногрупп этого реагента алкилирует ДНК фага M13, в том числе вставленный фрагмент онкогена, преимущественно по N7-атомам остатков гуанина, вторая в основном гидролизует. Третья, ароматическая хлорэтиламиногруппа малореакционноспособна из-за наличия в *n*-положении электроноакцепторной формильной группы, однако обработка боргидридом натрия восстанавливает ее до гидроксиметильной, активируя алкилирующую функцию. Группы статистически рассеяны по всей ДНК, в том числе после ДНКазного гидролиза по всей совокупности адресующих олигонуклеотидов. Итогом является получение набора алкилирующих производных олигонуклеотидов длиной 30–200 остатков, адресованных на онкоген.

С использованием [ $^{32}P$ ] олигонуклеотидов и реагентов было показано, что как олигонуклеотиды, так и их полиалкилирующие производные проникают в клетки SH2, причем в ядре их накапливается до  $10^5$ – $10^7$  молекул [75]. Обработка клеток SH2 или G11, содержащих встроенные онкогены, такими реагентами с последующим клонированием показала, что образуются клеточные линии с нормализованным фенотипом, причем в отдельных случаях возникают делеции в области онкогена [76, 77]. Получаются в основном два типа клеток: клетки одного типа претерпевают несколько цик-

лов деления с последующей гибелью, другие образуют иммортализованные клеточные линии с измененным по сравнению с исходными клетками типом транскрипции [78].

В мире большое внимание уделяется исследованиям возможности подавления размножения ряда вирусов с помощью антисмысловых олигонуклеотидов. В рамках программы также получены отдельные обнадеживающие эффекты на нескольких вирусах.

В работах, проведенных в НИБХ РАН вместе с сотрудниками НПО "Вектор", несколько гидрофобизированных производных олигонуклеотидов было испытано на способность подавлять размножение вируса ВИЧ-1 в лимфоидных клетках МТ-4. Было показано, что введение гидрофобных заместителей повышает наблюдаемые противовирусные эффекты, однако зарегистрировано действие олигонуклеотидов и их производных, не являющихся по своему строению антисмысловыми по отношению к геному ВИЧ-1 [79]. Использовались олигонуклеотиды против консервативного района гена *env* (MR-20), против "минус"-РНК вируса, комплементарной этому району гена *env* (RM-20) и начальному району того же гена (REV-10). К 5'-концевому остатку был присоединен остаток холестерина или линейные алифатические структуры. В качестве контроля использовали олигонуклеотид против гена *fos*, подобранный таким образом, что он мог образовывать комплексы с РНК вируса при неполной комплементарности не менее чем по 6 звеньям. Наиболее сильное подавление пролиферации вируса получено в случае холестеринных производных этих олигонуклеотидов. Производные анти-*fos*-олигонуклеотидов были во всех случаях малоэффективны. В случае MR-20 значительное подавление (более 85%) получено с производным, несущим остаток октадециламина [80]. Неожиданным в этой и следующей работах было эффективное действие смыслового олигонуклеотида RM-20. Для подтверждения специфичности действия перечисленные олигонуклеотиды были испытаны на вирусе ВИЧ-2. Все описанные выше реагенты на этом вирусе показали слабый подавляющий эффект [81].

Было исследовано воздействие антисмысловыми олигонуклеотидами на еще один ген вируса – *lat*. В модельной системе в клетки Jurkat вводилась плаزمид, содержащая ген хлорамфениколацетила-трансферазы (CAT) под длинным концевым повтором (LTR) вируса ВИЧ-1 в качестве промотора. В тех же клетках экспрессировался ген *lat* вируса, играющий роль трансаktиватора LTR. Было показано, что олигонуклеотиды, антисмысловые по отношению к гену *lat*, подавляют экспрессию CAT, причем эффект существенно усиливается, если к олигонуклеотиду присоединен остаток холестерина [82].

Исследования на вирусе гриппа проводились в основном в бесклеточной системе трансляции из ретикулоцитов кролика. Исследовалась трансляция мРНК, кодирующей вирусный белок NP [83] и белок M1 [84]. В первом случае исследовался олигонуклеотид, комплементарный участку 1–16 мРНК, и ряд его производных, содержащих присоединенные к 5'-концу радикалы. Заметное подавление синтеза белка наблюдалось лишь при довольно высоких концентрациях олигонуклеотида – 25–50 мкМ. Олигонуклеотид в концентрации 50 мкМ подавлял трансляцию белка NP на 29%, в то время как его холестеринное производное – на 73, а CIRCH<sub>2</sub>NH-производное – на 78%. Процесс проявлял определенную специфичность – подавление синтеза белка M1 было заметно ниже, хотя структуры 5'-концевых 15-меров мРНК этих двух генов имеют различия лишь по двум нуклеотидам. Присоединение остатка феназина также повышало уровень подавления (до 59%). Для белка M1 было проведено систематическое сравнение эффективности подавления его биосинтеза олигонуклеотидами, комплементарными различным участкам мРНК. Наибольшее подавление зарегистрировано при использовании комбинаций олигонуклеотидов, покрывающих участки 16–44 и участок 19–44 мРНК (соответственно 100 и 88% при концентрации 50 мкМ).

### 7. Физико-химические основы реакций в комплементарных комплексах

Значительное внимание в рамках программы уделялось исследованию кинетических, термодинамических и структурных аспектов комплементарно-адресованной модификации.

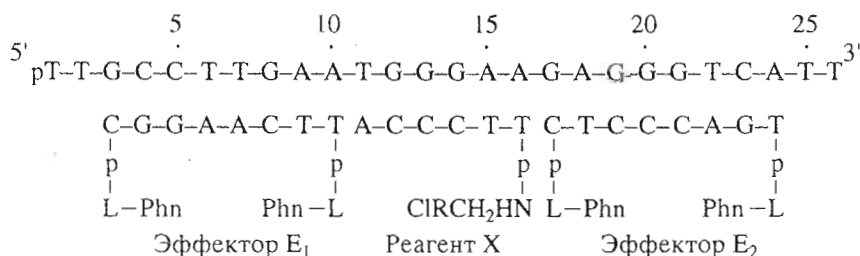
Один из важнейших вопросов – позиционная направленность комплементарно-адресованной модификации. Исследования на 300-звенном фрагменте одноцепочечной ДНК с использованием в качестве носителя алкилирующей группы олигонуклеотида рTGACCCTCTCCrA, комплементарного участку 261–274, показали, что в случае 5'-CIRCHNH-производного модификация происходит преимущественно по остатку G<sup>275</sup> мишени, т.е. в непосредственной близости от последней пары дуплексной структуры A<sup>274</sup> · T. В то же время при присоединении реагента к *цис*-диолевой группе 3'-концевого аденозина с образованием циклического диацетала (диоксаланового цикла) модификация проходила по звену G<sup>258</sup>, т.е. по третьему остатку от конца дуплексной структуры rA · T<sup>261</sup> [85]. Это, кстати сказать, совпало с самыми первыми данными Н.И. Гриневой, приведенными в работе [2]. Для выяснения причин такой позиционной направленности были проведены расчеты структуры методом молекулярной механики, которые полностью подтвердили именно такую предпочтительную направленность реакционноспособного остатка [86]. В случае реагентов первого типа рас-

четы были также проведены для CIR(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-группы и было найдено, что такое удлинение спейсера создает более благоприятную ситуацию для алкилирования, что и было подтверждено экспериментально [87]. Расчетные методы позволили оценить направленность алкилирования для обоих диастереомеров диоксаланового цикла и показали, что найденное в эксперименте направление алкилирования соответствует R-эпимеру [88].

При исследовании кинетики и термодинамики превращений, происходящих в системе мишень R-комплементарный реагент X, значительный интерес представляла проблема достижения количественных выходов внутрикомплексных реакций. Обычно в экспериментах по адресованной модификации используют избыток реагента. Кроме того, и сама реакция внутри образовавшегося дуплекса может быть не количественной. Поэтому возможны побочные превращения с участием реакционноспособной группы. Если при этих побочных превращениях не происходит разрушения адресующей, олигонуклеотидной части реагента, то последний превращается в неактивное производное R, сохраняющее сродство к мишени. Если процесс происходит в условиях квазиравновесия, т.е. происходит быстрый обмен молекулами X и R между комплексом и раствором, то X и R конкурируют с реагентом за связывание с мишенью, ингибируя модификацию. Выведенные ранее уравнения [89] показали, что в условиях, когда сродство реагента X и неактивного продукта его превращения R к мишени P, характеризующие константы ассоциации K<sub>x</sub> и K<sub>r</sub>, близки, в условиях квазиравновесия нельзя достигнуть количественного превращения мишени увеличением избытка реагента. Было введено также понятие эффективности внутрикомплексной реакции γ, характеризующей долю реагента в составе комплекса, превратившегося в продукт модификации PZ. Следует обратить внимание на то, что предельная по времени концентрация продукта реакции [PZ]<sub>∞</sub> как функция начальной концентрации реагента [X]<sub>0</sub> зависит от величин γ, K<sub>x</sub> и K<sub>r</sub>, следовательно, последние могут быть определены, если экспериментально определено [PZ]<sub>∞</sub> при нескольких значениях [X]<sub>0</sub>.

Основная часть исследований проведена для RCl-производных олигонуклеотидов. Из итогов последних лет следует отметить следующие. Во-первых, был проведен анализ области применимости условия квазиравновесия, которая для выведенных ранее кинетических уравнений определяется соотношением между константой скорости k<sub>0</sub> лимитирующей стадии превращения X или PX соответственно в R или PZ и константой скорости диссоциации комплексов PX и PR. В соответствии с оценками, проведенными в работе [90], для того чтобы при 37°C лимитирующая стадия алкилирования имела константу скорости выше, чем





где -L- = -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-

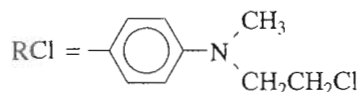
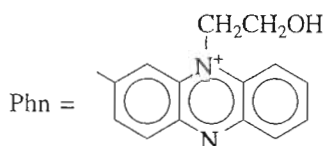


Рис. 4. Комплекс, образуемый 26-звенным дезоксирибоолигонуклеотидом-мишенью, алкилирующим производным олигонуклеотида X и бисфеназиниевыми производными октануклеотидов – эффекторами E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub>.

константа скорости диссоциации комплекса РХ, дуплекс при близком к единице соотношении числа пар А · Т и G · C должен иметь длину не менее 12 п. о.

В случае RCl-производных было показано, что повреждения адресующей части реагента не происходит, и можно было в достаточно хорошем приближении принять, что гидролиз алкилирующей группы не влияет на сродство реагента к мишени, т.е.  $K_x = K_r$ , что существенно упрощает нахождение этих величин из зависимости  $[PZ]_{\infty}$  от  $[X]_0$ . Этот подход к оценке сродства олигонуклеотидного адреса к мишени имеет существенные преимущества перед классическим методом Китца и Уилсона, основанным на измерении зависимости начальной скорости аффинной модификации от  $[X]_0$ , разработанным для аффинной модификации белков и примененным Дерваном для внутрикомплексной реакции нуклеиновых кислот с расщепляющим ДНК комплексом Fe · EDTA под названием "титрование с помощью аффинного расщепления" [91]. Измерение начальных скоростей всегда сопряжено с невысокой точностью и, кроме того, в случае быстро протекающих процессов не может быть выполнено без использования специальной аппаратуры. С использованием разработанного нового подхода, в частности, было проведено измерение сродства реагента (3') ACCCTTCTp(NHCH<sub>2</sub>RCl) к четырем мишеням, содержащим комплементарный фрагмент в составе 10-, 22-, 41-мера и уже упоминавшегося несколько раз 300-звенного однонитевого фрагмента ДНК. Первые два, судя по их структуре, не образуют каких-либо шпалек, 41-мер (5') AATGGACGGTGGCCCTTGAATGGGAAGAGGGTTCAGGTTCCATT (3') (подчеркнут участок, связывающийся с реагентом) может образовывать шпильку в результате почти полной комплементарности двух концевых октануклеотидных последовательностей, 300-мер может содержать эту же шпильку, но его третичная структура неизвестна.

Измерения показали, что при 25°C константы ассоциации  $K_x \times 10^{-6}$  составляют соответственно 1.15, 1.37, 0.14 и 0.002 M<sup>-1</sup>, т.е. существенно уменьшаются по мере структурирования мишени [92]. Проще всего это может быть интерпретировано как результат существования альтернативных конформаций, в том числе не способных связываться с реагентом.

Разработанный подход был распространен на многокомпонентные системы, содержащие кроме мишени и реагента один или два эффектора. Были выведены соответствующие уравнения [93] и получен алгоритм обработки экспериментальных данных, позволяющий определить сродство реагента к мишени в присутствии эффекторов. В качестве мишени был использован 26-мер

(5') TTGCCTTGA<sup>10</sup>ATGGGAAGA<sup>20</sup>GGGTTCATT (3'), в качестве реагента – (3') ACCCTTCTp(NHCH<sub>2</sub>RCl) (5'); эффекторами служили дифеназиниевые производные, комплементарные участкам 3–10 (эффектор E<sub>1</sub>) и 17–24 мишени (E<sub>2</sub>) (рис. 4).

Было установлено, что величина  $K_x$  в присутствии E<sub>1</sub> возрастает от 2.16 × 10<sup>4</sup> до 6.75 × 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>, в присутствии E<sub>2</sub> – всего до 4.15 × 10<sup>4</sup>, а в присутствии обоих эффекторов – до 5.87 × 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. Отношение этих величин к константе ассоциации  $K_x$  в отсутствие эффекторов позволяет определить коэффициенты кооперативности, характеризующие вклад в стабилизацию дуплекса мишень–реагент взаимодействия между реагентом и эффекторами в тандемной структуре. При прямом сопоставлении оказывается, что эти коэффициенты сильно различаются: для E<sub>1</sub> – 31.2, для E<sub>2</sub> – 1.9. Дополнительные исследования с мишенью, лишенной шести 5'-концевых нуклеотидов, позволили



понять причину такого расхождения. Взаимодействие остатков 1–5 и 12–16 26-мера может приводить к образованию шпильчатой структуры с неканонической парой G·G, закрывая частично участок связывания реагента. Эффектор  $E_1$  препятствует образованию такой структуры и делает мишень более доступной для реагента. В результате значение  $K_x$  для укороченной модели, неспособной к образованию такой шпильчатой структуры, выше, чем для 26-мера. Наоборот, эффект  $E_2$  в такой шпильчатой структуре может взаимодействовать с 5'-концом стебля шпильки, стабилизируя ее, т.е. выступает одновременно как эффект и как ингибитор модификации. Количественный учет этих факторов показал, что истинные коэффициенты кооперативности в случае эффектора  $E_1$  оказываются равными 16,0, а в случае эффектора  $E_2$  – 10,0, т.е. достаточно близки по своим значениям [94].

Существование такой шпильчатой структуры было подтверждено экспериментами с 26-мером, содержащим на 5'-конце CIRC<sub>2</sub>NH-остаток. В условиях, стабилизирующих шпильчатую структуру в таком производном, зарегистрировано самоалкилирование по остатку G<sup>17</sup>, что возможно только при достаточном сближении этого звена с 5'-концом производного 26-мера. В этом эксперименте было выявлено, что присутствие феназиниевого остатка в стыке с алкилирующей группой (т.е. в присутствии эффектора  $E_2$ ) изменяет направление алкилирования – оно практически полностью переключается на остатки G<sup>12</sup>–G<sup>14</sup>. Энергетическое преимущество такого переключения было подтверждено данными компьютерного моделирования [93].

Для изучения кооперативных взаимодействий в tandemных структурах был также применен метод, основанный на измерении термодинамических параметров из данных по кривым плавления в системе, образованной мишенью TCCTTCCTTCCT (M) и олигонуклеотидом GAAAG или его феназиниевым (Phn) или этидиевым (Etd) производным (L), причем остатки Phn и Etd были связаны либо с 5'-концевым, либо с 3'-концевым фосфатом. Все адресованные реагенты имеют два соседних сайта связывания с мишенью и могут образовывать tandemные структуры. Коэффициенты кооперативности представляли собой отношение констант ассоциации  $ML$  с  $L$  и  $M$  с  $L$  и рассчитывались из данных по плавлению комплекса 14-мера с пентануклеотидом или одним из его производных, взятых в молярном соотношении 1 : 2. При 37°C эти величины оказались равными 33 для немодифицированного L, 35 – для 5'Phn-L, 57 – для 3'Phn-L, 190 – для 5'Etd-L и 100 – для 3'Etd-L [95, 96].

Описанный метод определения сродства адресованного реагента к мишени из данных по модификации был распространен на железопорфириновые и фотореакционноспособные производные

олигонуклеотидов. В первом случае также оказалось, что в ходе процесса не происходит деструкции адресующего олигонуклеотида, т.е. его сродство к мишени сохраняется, хотя наблюдается уже упомянутое выше [38] разрушение порфиринового фрагмента, что существенно усложняет конечные кинетические уравнения. Наоборот, при изучении фотомодификации мишени производным, содержащим перфторбензойный остаток, в ходе процесса реагент практически полностью терял сродство к мишени, что потребовало использования уравнения для зависимости  $[PZ]_{\infty}$  от  $[X]_0$  для случая  $K_f = 0$ . Следует отметить, что величина эффективности внутрикомплексной реакции  $\gamma$  для этого процесса оказалась очень низкой – в пределах 0,2–0,33 в зависимости от природы адресующего олигонуклеотида [97].

Для изучения механизма стабилизирующего действия N-(2-гидроксиэтил)феназиниевых радикалов на дуплексы было проведено исследование модельных систем методом двумерной ЯМР-спектроскопии в сочетании с теоретическими расчетами по методу ограниченной молекулярной механики. Немодифицированный базовый дуплекс был

образован гептануклеотидом  $p\overset{1'}{\text{C}}\text{CAAACA}$  и октанинуклеотидом  $(3')\overset{8}{\text{C}}\text{GGTTTGT}(5')$ , на 3'-конце которого находился неспаренный (свисающий) остаток цитидина. Было установлено, что дуплекс формирует B-подобную правозакрученную спираль ДНК с 2'-эндо-конформацией углеводных фрагментов. Показано, что неспаренное нуклеотидное звено C<sup>8</sup> октануклеотида участвует в формировании спиральной структуры дуплекса и находится в стэкинг-взаимодействии с предыдущим нуклеотидным звеном G<sup>7</sup> [98].

Аналогичное исследование дуплекса, образованного  $(\text{Phn})p\text{CAAACA}$ , показало, что наличие остатка феназиния не вызывает существенных изменений структуры дуплекса в целом, которая остается правозакрученной B-формой ДНК с 2'-эндо-конформацией углеводных циклов. Полициклическая система феназиния встраивается между звеньями G<sup>7</sup> и C<sup>8</sup> октануклеотидной цепи, вытесняя концевой цитидин-8 из структуры дуплекса. Основная особенность оптимизированной структуры заключается в том, что феназиниевое кольцо находится на расстоянии примерно 0,4 нм в стэкинге с последней парой гетероциклов C<sup>1'</sup>·G<sup>7</sup> и на расстоянии около 0,5 нм от неспаренного нуклеотидного звена C<sup>8</sup>. Такое взаимодействие, вероятно, и является причиной увеличения стабильности дуплекса, содержащего остаток феназиния, по сравнению с немодифицированным аналогом [99]. Исследование аналогичного дуплекса, в котором непосредственно примыкающая к присоединенному феназиниевому остатку пара C<sup>1'</sup>·G<sup>7</sup> заменена на A<sup>1'</sup>·G<sup>7</sup>, показало, что в этом случае остаток



Php находится лишь в частичном стэкинге, а уточнение структуры методом ограниченной молекулярной динамики выявило три различные конформации для расположения феназиевого остатка [100]. Был также изучен смешанный дуплекс, образованный рибоолигонуклеотидом (5') r(GAUUGAA) (3') и производным (3') (Php)pСТААТС. Структура оказалась близкой к описанной для смешанных дуплексов [101].

Было также изучено строение аддукта, образующегося в качестве главного продукта внутрикомплексного алкилирования в том же дуплексе, дополнительно содержащем  $\text{C1RCH}_2\text{NH}$ -остаток на 5'-концевом фосфате гептануклеотида. В этом продукте радикал R связан с атомом N3 цитозина-8 октануклеотидного фрагмента. Оптимальная конформация аддукта, установленная по данным NOESY с последующей оптимизацией структуры методом ограниченной молекулярной динамики, также имеет практически неискаженную структуру В-ДНК, причем фрагмент  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}-$ , соединяющий атом N3 цитозина-8 октануклеотида и 5'-концевой фосфат гептануклеотида, располагается в области недостающего звена гептануклеотида [102–104]. Отсутствие существенных искажений в ковалентном аддукте позволяет рассчитывать, что повреждения, вызываемые комплементарно-адресованной модификацией, не будут опознаваться ферментами репарации, что существенно для предполагаемых прикладных использований таких препаратов.

Заключая обзор, можно констатировать, что по ряду вопросов, в первую очередь в области создания новых реакционноспособных производных олигонуклеотидов и способов их применения, а также при изучении физико-химических основ и биологических аспектов их действия в клетках и живых организмах, полученные в рамках программы результаты по оригинальности и значимости по меньшей мере не уступают лучшим зарубежным работам и представляются перспективными для решения практических задач вирусологии и онкологии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. // Tetrahedron Lett. 1967. P. 3557–3562.
2. Grineva N.I., Karpova G.G., Kuznetsova L.M., Venkster T.V., Bayev A.A. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. P. 1609–1631.
3. Кнорре Д.Г., Зарытова В.Ф., Бадашкеева А.Г., Федорова О.С. Реакционноспособные производные олигонуклеотидов как ген-направленные биологически активные вещества. Итоги науки и техники. Т. 37. М.: ВИНТИ, 1991.
4. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton: CRC Press, 1994.
5. Zamesnik P.C., Stephenson M.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 280–284.
6. Asseline U., Toulme F., Thuong N.T., Delarue M., Monteny-Garestier T., Helene C. // EMBO J. 1984. V. 3. P. 795–800.
7. Miller P.S., Barrett J.C., Ts'o P.O.P. // Biochemistry. 1974. V. 13. P. 4887–4896.
8. Miller P.S., McParland K.B., Jayaraman K., Ts'o P.O.P. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 1874–1880.
9. Karpova G.G., Knorre D.G., Rytte A.S., Stepanovich L.E. // FEBS Lett. 1980. V. 122. P. 21–24.
10. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Карпова Г.Г., Кнорре Д.Г., Пичко Н.П., Райт А.С., Стефанович Л.Е. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. С. 1512–1522.
11. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. С. 267–276.
12. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Лохов С.Г. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. С. 1618–1626.
13. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Часовских М.И. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. С. 610–616.
14. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Сильников В.Н., Шшикин Г.В. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. С. 911–920.
15. Vlassov V.V., Zarytova V.F., Kutiavin I.V., Mamaev S.V., Poduminogin M.A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 4065–4076.
16. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. С. 370–378.
17. Moser H.E., Dervan P.B. // Science. 1987. V. 238. P. 645–650.
18. Le Doan T., Perrouault L., Praseuth D., Habhoub N., Decout J.-L., Thuong N.T., Lhomme J., Helene C. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 7749–7760.
19. Fedorova O.S., Knorre D.G., Podust L.M., Zarytova V.F. // FEBS Lett. 1988. V. 228. P. 273–276.
20. Vlassov V.V., Gaidamakov S.A., Zarytova V.F., Knorre D.G., Levina A.S., Nikonova A.A., Podust L.M., Fedorova O.S. // Gene. 1988. V. 72. P. 313–322.
21. Cherny D.I., Belotserkovskii B.P., Frank-Kamenetskii M.D., Egholm M., Buchardt O., Berg R.H., Nielsen P.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 1667–1670.
22. Demidov V., Frank-Kamenetskii M.D., Egholm M., Buchardt O., Nielsen P.E. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 2103–2107.
23. Demidov V.V., Cherny D.I., Kurakin A.V., Yavnilovich M.V., Malkov V.A., Frank-Kamenetskii M.D., Sonnichsen S.H., Nielsen P.E. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 5218–5222.
24. Gupta N.K., Ohtsuka E., Weber H., Chang S.H., Khora N.H.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1968. V. 60. P. 285–292.
25. Shabarova Z.A. // Physicochemical Biology Reviews, Soviet Scientific Reviews. Sec. D / Ed. V.P. Skulachev. Harwood Acad. Publ. GmbH, 1984. P. 1–51.
26. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. С. 1653–1660.
27. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф., Левина А.С. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. С. 1523–1530.
28. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. С. 895–900.
29. Пышный Д.В., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванов Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 709–716.



30. Добриков М.И., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. С. 1190–1198.
31. Добриков М.И., Зарытова В.Ф., Комарова Н.И., Левина А.С., Лохов С.Г., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. С. 540–548.
32. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Лукьянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Докл. РАН. 1995. Т. 344. С. 122–125.
33. Гроховский С.Л., Зубарев В.Е. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 313. С. 1500–1504.
34. Grokhovski S.L., Zubarev V.E. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 257–264.
35. Гроховский С.Л., Николаев В.А., Зубарев В.Е., Суровая А.Н., Жузе А.Л., Чернов Б.К., Сидорова Н.Ю., Заседателев А.С., Гурский Г.В. // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26. С. 1274–1297.
36. Хохлов Д.Н., Брусов Р.В., Гроховский С.Л., Жузе А.Л., Суровая А.Н., Гурский Г.В. // Молекуляр. биология. 1994. Т. 28. С. 87–95.
37. Хохлов Д.Н., Брусов Р.В., Гроховский С.Л., Николаев В.А., Письменский В.Ф., Жузе А.Л., Гурский Г.В. // Молекуляр. биология. 1995. Т. 29. С. 354–364.
38. Frolova E.I., Fedorova O.S., Knorre D.G. // Biochimie. 1993. V. 75. P. 5–12.
39. Zarytova V.F., Sergeev D.S., Godovikova T.S. // Bioconj. Chem. 1993. V. 4. P. 189–193.
40. Sergeev D.S., Zarytova V.F., Mamaev S.V., Godovikova T.S., Vlassov V.V. // Antisense Res. Devel. 1992. V. 2. P. 235–241.
41. Sergeev D.S., Godovikova T.S., Zarytova V.F. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 4400–4406.
42. Вольпин М.Е., Кнорре Д.Г., Новодарова Г.Н., Тувин М.Ю., Федорова О.С., Фролова Е.И. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. С. 363–366.
43. Белков В.М., Крынецкая Н.Ф., Волков Е.М., Шабарова Э.А., Крайнова Н.Ю., Новодарова Г.Н., Вольпин М.Е. // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 446–453.
44. Rodutinogin M.A., Vlassov V.V., Giege R. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 5950–5956.
45. Добриков М.И., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. С. 1190–1198.
46. Левина А.С., Табатадзе Д.Р., Зарытова В.Ф., Добриков М.И., Горн В.В., Лохов С.Г. // Биоорг. химия. 1994. Т. 20. С. 30–39.
47. Fedorova O.S., Savitskii A.P., Shoikhet K.G., Ponomarev G.V. // FEBS Lett. 1990. V. 259. P. 335–337.
48. Кошкин А.А., Иванова Т.М., Бульчев Н.В., Добриков М.И., Лебедев А.В. // Биоорг. химия. 1993. Т. 19. С. 570–582.
49. Koshkin A.A., Kropachev Yu., Mamaev S.V., Bulychev N.V., Likhov S.G., Vlassov V.V., Lebedev A.V. // J. Mol. Recognit. 1994. V. 7. P. 177–188.
50. Власов В.В., Иванова Е.М., Кобец Н.Д., Мамеев С.В., Шульженко С.Г., Якубов Л.А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. С. 196–199.
51. Власов В.В., Кобец Н.Д., Черноловская Е.Л., Иванова Е.М., Субботин В.М., Якубов Л.А. // Биополимеры и клетка. 1989. Т. 5. С. 49–53.
52. Vlassov V.V., Kobetz N.D., Chernolovskaya E.L., Demidova S.G., Borissov R.G., Ivanova E.M. // Mol. Biol. Rep. 1990. V. 14. P. 11–15.
53. Беляев Н.Д., Власов В.В., Кобец Н.Д., Иванова Е.М., Якубов Л.А. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 291. С. 234–236.
54. Chernolovskaya E.L., Kobets R.G., Borissov R.G., Abramova T.V., Vlassov V.V. // FEBS Lett. 1992. V. 303. P. 269–271.
55. Черноловская Е.Л., Черепанов П.П., Горожанкин А.В., Добриков М.И., Власов В.В., Кобец Н.Д. // Биоорг. химия. 1992. Т. 19. С. 889–892.
56. Budker V.G., Knorre D.G., Vlassov V.V. // Antisense Res. Devel. 1992. V. 2. P. 177–184.
57. Кнорре Д.Г., Власов В.В. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. С. 1330–1340.
58. Биченков Е.Е., Будкер В.Г., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Лохов С.Г., Савченко Е.В., Теплова Н.М. // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. С. 735–741.
59. Boutorin A.S., Gus'kova L.V., Ivanova E.M., Kobetz N.D., Zarytova V.F., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V.V. // FEBS Lett. 1989. V. 254. P. 129–132.
60. Vlassov V.V., Balakireva L.A., Yakubov L.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1994. № 1197. P. 95–108.
61. Власова И.Е., Нечаева М.В., Власов В.В. // Успехи соврем. биологии. 1994. Т. 114. С. 715–727.
62. Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V.V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6454–6458.
63. Власов В.В., Иванова Е.М., Нечаева М.В., Рыкова Е.Ю., Якубов Л.А., Зон Д. // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 962–966.
64. Власов В.В., Нечаева М.В., Байбородин С.И., Шестова О.Е., Сафронов И.В., Кошкин А.А., Якубов Л.А. // Докл. РАН. 1995. Т. 345. С. 123–126.
65. Боженок Л.Н., Черноловская Е.Л., Горожанкин А.В., Байбородин С.И., Болоболова Е.У., Киселева Е.В., Керкис А.Ю., Кобец Н.Д. // Молекуляр. биология. 1995. Т. 29. С. 862–870.
66. Абрамова Т.В., Власов В.В., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Кулигина Т.В., Райт А.С. // Молекуляр. биология. 1991. Т. 25. С. 624–632.
67. Vlassov V.V., Karamyshev V.N., Yakubov L.A. // FEBS Lett. 1993. V. 327. P. 271–274.
68. Rykova E.Yu., Raitova L.V., Yakubov L.A., Karamyshev V.N., Vlassov V.V. // FEBS Lett. 1994. V. 344. P. 96–98.
69. Паутова Л.В., Лактионов П.П., Рыкова Е.Ю., Якубов Л.А., Власов В.В. // Молекуляр. биология. 1994. Т. 28. С. 1106–1112.
70. Якубов Л.А., Власов В.В., Занг Л.М., Стайн С.А. // Докл. РАН. 1992. Т. 327. С. 593–597.
71. Yakubov L., Khaled Z., Li-Ming Zhang, Truneh A., Vlassov V., Stein C.A. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 18818–18823.
72. Givakova M.A., Yakubov L.A., Vlodavsky I., Tonkinson J.L., Stein C.A. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 2620–2627.
73. Pierga J.-Y., Magdelenat H. // Cell. Mol. Biol. 1994. V. 40. P. 237–261.
74. Сац Н.В., Сурин В.Л., Жукова Е.Л., Гринева Н.И. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. С. 1138–1196.
75. Пантин В.И., Сац Н.В., Сурин В.Л., Егоров Л.В., Соловьев Г.Я., Боровкова Т.В., Гринева Н.И. // Молекуляр. биология. 1991. Т. 25. С. 177–184.



76. Пантин В.И., Соловьев Г.Я., Сац Н.В., Сурин В.Л., Боровкова Т.В., Жукова Б.Л., Гринева Н.И. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 311. С. 1487-1491.
77. Пантин В.И., Соловьев Г.Я., Сац Н.В., Сурин В.Л., Боровкова Т.В., Крутов А.А., Жукова Е.Л., Гринева Н.И. // Молекуляр. биология. 1991. Т. 25. С. 960-973.
78. Гринева Н.И., Боровкова Т.В., Сац Н.В., Курабекова Р.М., Ружицкая О.С., Соловьев Г.Я., Пантин В.И. // Генетика. 1995. Т. 31. С. 1043-1051.
79. Абрамова Т.В., Блинов В.М., Власов В.В., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Коневец Д.А., Плясунова О.А., Покровский А.Г., Сандахчиев Л.С., Свиначук Ф.П., Старостин В.П., Чаплыгина С.Р. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 312. С. 1259-1262.
80. Svinarchuk F.P., Konevets D.A., Pliashunova O.A., Pokrovsky A.G., Vlasov V.V. // Biochimie. 1993. V. 75. P. 49-54.
81. Покровский А.Г., Плясунова О.А., Блинов В.М., Власов В.В., Свиначук Ф.П., Абрамова Т.В., Горн В.В., Коневец Д.А. // Молекуляр. биология. 1993. Т. 27. С. 1039-1043.
82. Demirhan I., Hasseltmayer O., Hofmann D., Chandra A., Svinarchuk F.P., Vlassov V.V., Engels J., Chandra P. // Virus Genes. 1994. V. 9. P. 113-119.
83. Абрамова Т.В., Власов В.В., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф., Фокина Т.Н., Фролова Е.И., Юрченко Л.В. // Молекуляр. биология. 1994. Т. 28. С. 307-312.
84. Власов В.В., Горн В.В., Номоконова Н.Ю., Фокина Т.М., Юрченко Л.В. // Молекуляр. биология. 1991. Т. 25. С. 1332-1337.
85. Бросалина Е.Б., Власов В.В., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Плетнев А.Г., Подыминогин М.А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 240-247.
86. Воробьев Ю.Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 69-82.
87. Булычев Н.В., Воробьев Ю.Н., Галль А.А., Кошкин А.А., Шишкин Г.В. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 795-805.
88. Воробьев Ю.Н. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 211-221.
89. Knorre D.G., Chimitova T.A. // FEBS Lett. 1981. V. 131. P. 249-252.
90. Knorre D.G., Федорова О.С. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 313. С. 222-224.
91. Singleton S.F., Dervan P.B. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 6957-6965.
92. Fedorova O.S., Podust L.M., Maksakova G.A., Gorn V.V., Knorre D.G. // FEBS Lett. 1992. V. 302. P. 47-50.
93. Fedorova O.S., Adeenah-Zadah A., Bichenkova E.V., Knorre D.G. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1995. V. 13. P. 144-166.
94. Fedorova O.S., Adeenah-Zadah A., Knorre D.G. // FEBS Lett. 1995. V. 369. P. 287-289.
95. Абрамова Т.В., Горн В.В., Кутявин И.В., Лебедев А.В., Лохов С.Г., Подыминогин М.А. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 315. С. 1485-1488.
96. Лохов С.Г., Кошкин А.А., Кутявин И.В., Митякин М.П., Подыминогин М.А., Лебедев А.В. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 197-205.
97. Казанцев А.В., Максаква Г.А., Федорова О.С. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 767-773.
98. Биченкова Е.В., Воробьев Ю.Н., Кутявин И.В., Лебедев А.В., Мальцева Т.В., Тэннэ Е.Ю. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 1236-1258.
99. Биченкова Е.В., Горенштейн Л.А., Воробьев Ю.Н., Тэннэ Е.Ю., Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Мальцева Т.В., Лебедев А.В. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 901-910.
100. Maltseva T., Sandstrom A., Ivanova E.M., Sergeyev D.S., Zarytova V.F., Chattopadhyaya J. // J. Biochem. Biophys. Methods. 1993. V. 26. P. 173-236.
101. Maltseva T.V., Agback P., Repkova M.N., Venyaminova A.G., Ivanova E.M., Sandstrom A., Zarytova V.F., Chattopadhyaya J. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 5590-5599.
102. Биченкова Е.В., Мальцева Т.В., Абрамова Т.В., Лебедев А.В. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 1199-1213.
103. Горенштейн Л.А., Биченкова Е.В., Воробьев Ю.Н., Лебедев А.В. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 436-445.
104. Bichenkova E.V., Gorenstein L.A., Denisov A.Yu., Lebedev A.V., Illangasekare N., Gorenstein D.G. // Appl. Magn. Reson. 1994. V. 7. P. 55-70.

## Gene-Directed Biologically Active Substances (Antisense Oligonucleotides and their Derivatives) (Review)

D. G. Knorre

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,  
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

**Abstract**—Results of studies carried out over the last eight years under the Russian State Scientific and Technical Program "New Methods in Bioengineering" are reviewed. New addressing constructions formed by a tandem of two or more oligonucleotides on a target nucleic acid are described. The reactivity of the tandem is enhanced due to the stabilization of some components, either by attachment of polyaromatic systems (method of effectors) or by the formation of a reaction center, which occurs when the components of the active center draw together into a tandem. Reagents which are oligonucleotide derivatives are also described, in particular a derivative of the antibiotic bleomycin, which is capable of catalytic cleavage of the target. Evidence is presented that oligonucleotides interact with the proteins of cells and living organisms, including the receptor proteins discovered in the course of this research, the T-helper CD4 receptor, immunoglobulins, and some growth factors.

**Key words:** nucleic acids, oligonucleotide derivatives, antisense oligonucleotides, chemical reactions in duplexes and triplexes, chromatin.