

## Кон'югати олігонуклеотидів з інтеркаляторами: синтез та біологічна активність

І.Я. Дубей

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

**Резюме.** Модифікація олігонуклеотидів інтеркаляторами підвищує афінність їх зв'язування з нуклеїновими кислотами-мішенями при збереженні високої сіквенс-специфічності, що дозволяє ефективно регулювати експресію генів, блокуючи процеси реплікації, транскрипції чи трансляції. Інтеркалятори — планарні поліароматичні сполуки, що взаємодіють з подвійною та потрійною спіралями ДНК за рахунок вбудовування між сусідніми парами основ і стабілізують комплементарні комплекси нуклеїнових кислот. Їх кон'югати широко вивчаються *in vitro* та *in vivo* як інструменти дослідження біологічних процесів і потенційні протираккові та противірусні терапевтичні препарати. В огляді узагальнено основні підходи до синтезу модифікованих олігонуклеотидів і описано їх кон'югати з основними інтеркаляторами. Обговорюються фактори, що впливають на ефективність гібридизації і біологічну активність кон'югатів.

**Ключові слова:** олігонуклеотидні кон'югати, інтеркалятори, ДНК, дуплекси, потрійна спіраль.

**Вступ.** Синтетичні олігонуклеотиди — потужний інструмент в арсеналі молекулярної біології. Вони широко використовуються як ДНК/РНК-зонди, праймери для РСР, у синтезі генів, секвенуванні нуклеїнових кислот (НК), при вивченні білково-нуклеїнової взаємодії тощо. Розвиток біотехнології та медицини викликав особливий інтерес до модифікованих олігонуклеотидів. Останні умовно поділяються на аналоги й кон'югати олігонуклеотидів. Кон'югатами вважають продукти ковалентного зв'язування олігонуклеотидів з іншими молекулами зі специфічними властивостями — флуоресцентними, афінними та спіновими мітками, ліпофільними і транспортними групами, білками й пептидами, хімічними нуклеазами тощо. Аналогами ж називають олігонуклеотиди, що містять модифіковані елементи власної структури — гетероциклічні основи, вуглеводні залишки чи фосфодиефірні зв'язки [1-5].

У контексті антисенс-технології, кон'югація з певними молекулами здійснюється для покращення гібридизаційних і транспортних властивостей олігонуклеотидів. З іншого боку, кон'югацію можна розглядати як спосіб надати специфічності взаємодії неспецифічним молекулам за рахунок приєднання до них олігонуклеотидного фрагмента, здатного високоселективно зв'язуватись із комплементарними послідовностями ДНК чи РНК.

Модифіковані олігонуклеотиди цінні як для вивчення біологічних та фізико-хімічних властивостей нуклеїнових кислот, так і можливостями діагностичного і терапевтичного застосування в медицині (антисенс- і антиген-технології та ін.). Одним із найважливіших класів сполук, що специфічно взаємодіють із нуклеїновими кислотами, є інтеркалятори. Цей огляд присвячено методам хімічного синтезу кон'югатів олігонуклеотидів з інтеркалюючими реагентами та їх біологічним і біофізичним властивостям. Розглянуто також деякі аспекти застосування таких кон'югатів в молекулярній біології і медицині.

\*Corresponding author.  
Tel./fax: +38044-52622014  
E-mail address: dubey@imbg.org.ua

**Інтеркалятори й інтеркаляція.** Відомо, що багато синтетичних і природних спряжених поліциклічних ароматичних сполук утворюють міцні комплекси з полінуклеотидами. Як правило, ці сполуки є барвниками і мають флуоресцентні властивості. У роботі 1961 р. Лерман встановив, що при взаємодії з ДНК таких барвників, як акридин, профлавін та акридиновий оранжевий, відбувається значна зміна в'язкості розчину та коефіцієнта седиментації ДНК. Це дозволило постулювати, що такі ліганди спричиняють порушення спіральної структури ДНК за рахунок інтеркаляційного механізму [6]. Утворення комплексів відбувається шляхом вклинювання (інтеркаляції) планарних ароматичних систем лігандів між сусідніми парами гетероциклічних основ двоспіральних ділянок НК. Воно, як правило, не залежить від нуклеотидного складу й послідовності нуклеїнової кислоти [7]. В основі стабілізаційного ефекту лежить взаємодія ароматичних  $\pi$ -систем (стекинг) пар основ та ліганду [8, 9]. Додаткові замісники, присутні в структурі ліганду, в значній мірі визначають термодинаміку зв'язування, геометрію комплексу ліганд-ДНК і сіквенс-селективність, яка спостерігається в деяких сполук [9].

Утворюючи  $\pi$ -комплекси з НК, інтеркалятори можуть ефективно впливати на їх біосинтез і метаболізм [1-3, 5, 10-11]. Інгібування транскрипції та реплікації ДНК — основа механізму біологічної активності інтеркаляторів. Ряд сполук, наприклад, похідні акридину й антрацикліну, відомі як антиракові препарати, інші діють як антимікробні та антивірусні засоби. Однак їх клінічне використання виявило ряд серйозних проблем, серед яких неспецифічність, токсичність та інші побічні ефекти, пов'язані з невисокою селективністю дії на терапевтичну мішень (у даному випадку ДНК ракових клітин, вірусів чи мікроорганізмів), а також появу комплексної стійкості до медичних препаратів (multidrug resistance). Ці фактори стимулюють пошук нових біологічно активних сполук цього класу та підходів до їх застосування.

Інтеркалятори є планарними ароматичними чи гетероароматичними сполуками, часто катіонними. Геометрія молекули та її електронна густина — основні фактори, що впли-

вають на можливість стекингу. Для ефективного перекивання з парою основ піримідин-пурин інтеркалятор повинен містити три- або тетрациклічний фрагмент, що й спостерігається в абсолютній більшості випадків. Поліароматичність є необхідною, проте не достатньою умовою для того, щоб конкретна структура мала інтеркаляційні властивості, й апріорі досить складно передбачити їх. Існує ряд методів підтвердження інтеркаляційної активності. При зв'язуванні барвників із НК відбувається зміна їх спектральних властивостей. Як правило, інтеркаляція викликає батохромний зсув і гіпохромний ефект для основної смуги поглинання. У спектрі флуоресценції ліганду спостерігається зсув максимуму в довгохвильову область та зміна квантового виходу, причому для різних інтеркаляторів може відбуватись як зростання інтенсивності, так і гасіння флуоресценції. Часто її зміни залежать від того, з якими нуклеотидними послідовностями взаємодіє ліганд. Так, акрифлавін флуоресцює лише тоді, коли він інтеркалює між двома парами А·Т, в інших випадках його флуоресценція гаситься [7].

Чисто спектральних методів не достатньо для доказу інтеркаляційного механізму зв'язування ліганду з ДНК, оскільки неінтеркаляційне зв'язування (наприклад, у малій борозенці ДНК) може приводити до подібних спектральних ефектів. Для коректного доведення слід поєднувати спектрально-флуоресцентні дослідження з вивченням макрозмін, що відбуваються в молекулі ДНК при взаємодії з лігандом. Як відомо, в результаті інтеркаляції ліганду між парами основ збільшується відстань між ними, спостерігається певне «розкручування» двоспіральної ДНК і збільшення фізичної довжини її молекули. Такі зміни можна підтвердити, визначаючи гідродинамічні характеристики (в'язкість розчину ДНК, коефіцієнт седиментації) та інші параметри, що застосовуються в хімії високомолекулярних сполук [9, 12].

Прямим доказом інтеркаляції є рентгеноструктурний аналіз комплексів ліганд-ДНК, однак цей трудомісткий підхід застосовують у поодиноких випадках. Багато інформації про структуру комплексів дає 2D-ЯМР-спектроскопія. Для визначення типу зв'язування

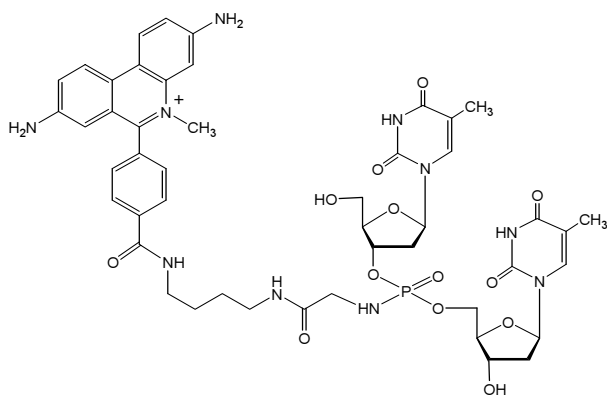


Рис. 1. Структура першого кон'югату олігонуклеотиду з інтеркалятором (фенантридин, [14]).

ліганду з ДНК, а також його селективності й афінності, зараз широко застосовують метод заміщення флуоресцентних інтеркаляторів, який особливо цінний для скринінгу комбінаторних бібліотек. Він базується на витісненні відомих інтеркаляторів (етидійброміду чи тіазолового оранжевого) з їх комплексів із ДНК лігандами, що вивчаються [13].

**Кон'югати олігонуклеотидів з інтеркаляторами.** Олігонуклеотиди, модифіковані інтеркаляторами, здатні до селективного контролю експресії генів. Тому дослідження таких кон'югатів інтенсивно розвиваються. Ідея приєднання інтеркалятора до послідовності, що може забезпечити «впізнавання» НК, належить Р. Летсінгеру, який у 1981 р. вперше описав ковалентне приєднання фенантридину до динуклеотиду через фосфатну групу [14] (рис. 1). Інші піонерські роботи в цій галузі опубліковані лабораторіями К. Елена (акридин) та В. Заритової (феназин) близько 20 років тому [15-19]. З того часу описано ковалентне приєднання до олігонуклеотидів багатьох інтеркаляторів, серед яких похідні антрацену, антрахінону, етидію, пірену, антрацикліни, порфірини, ціанінові барвники та ін. [1-3, 5, 20]. Механізм дії кон'югатів можна описати наступним чином: олігонуклеотидна послідовність специфічно зв'язується з комплементарною НК-мішенню, інтеркалюючи ж група в складі утвореного дуплекса забезпечує додаткову енергію зв'язування, яка, однак, сама по собі є мало- або неспецифічною (рис. 2). Вплив інтеркаляторів на стабільність комплексів оцінюють за температурою плавлення ( $T_{пл}$ ) останніх.

**Основні підходи до синтезу олігонуклеотидних кон'югатів.** Методи введення репортерних груп в олігонуклеотиди надзвичайно різноманітні. Цій темі присвячено багато оглядів і книг [1-3, 20-25], тому ми зупинимося на ній лише коротко. Модифікація олігонуклеотидів сьогодні можлива практично по будь-якому положенню. Це 5'- та 3'-кінцеві гідроксильні групи, міжнуклеотидні фосфати, рідше аміногрупи та лактамні функції гетероциклічних основ, положення С-8 пуринів і С-5 піримідинів, С-2' вуглеводного фрагмента, в окремих випадках положення С-1' і С-4' залишку дезоксирибози нуклеозидів.

Для введення репортерної групи необхідно провести реакцію між відповідними похідними біополімеру та приєднуваного ліганду. Основні реакції, які застосовуються з цією метою, — утворення амідного, тіоефірного чи фосфодіефірного зв'язку. З цією метою в ліганд та олігонуклеотид вводять відповідну пару реакційних груп: карбоксильну та аміногрупу, меркаптогрупу і функцію, що здатна селективно взаємодіяти з нею (алкілгалогенідну, малеїмідну), або ж фосфатну та гідроксильну чи аміногрупу. Основні варіанти кон'югації наведено на схемі 1. При цьому розрізняють два загальних підходи: пост-синтетичну модифікацію (варіанти А та В) та пряме введення ліганду в процесі синтезу олігонуклеотидної послідовності (С).

У першому підході спочатку одержують функціоналізований олігонуклеотид, в який уведено аміно-, меркапто- та інші реакційні групи, найчастіше на лінкері. Після цього проводять реакцію олігомеру з відповідним реагентом на основі репортерної молекули. Найчастіше застосовують взаємодію  $\text{COOH}$ -похідних лігандів з аміноалкіл-модифікованими олігонуклеотидами (схема 1А). Реакцію утворення амідного зв'язку проводять у присут-

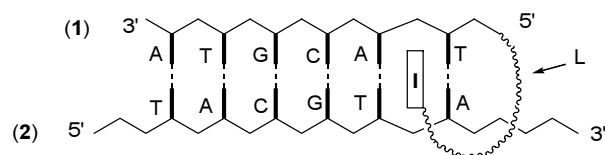
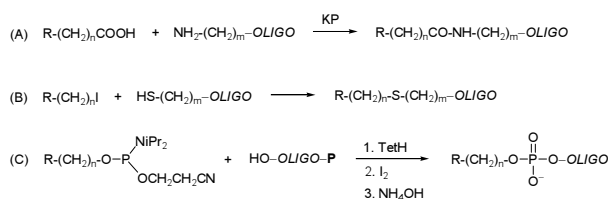


Рис. 2. Схема взаємодії кон'югату олігонуклеотид-інтеркалятор (1) з комплементарною мішенню (2). I — інтеркалятор, L — лінкерна група.

Схема 1  
Основні методи синтезу кон'югатів  
олігонуклеотидів (OLIGO)



Примітки: *R* — репортерна група, *KP* — конденсуючий реагент, *P* — полімерний носій, *TetH* — тетразол.

ності конденсуючих реагентів (карбодіміди, фосфонієві реагенти та ін.) або ж використовують активовані похідні карбокси-компонента — *N*-гідроксисукциніміди, рідше нітрофенілові, пентахлорфенілові та інші подібні ефіри. Ізотіоціанати теж селективно реагують з аміногрупами.

Утворення тіоефірів шляхом алкілування меркаптогрупи — інший широко розповсюджений шлях синтезу кон'югатів. В олігонуклеотид вводять *SH*-групу, яка селективно реагує з алкілгалогенідними (йодалкільними, йод- та бромацетамідними) або ж малеїмідними похідними репортерних молекул (схема 1B). Такі реакції високоспецифічні, і потрібна модифікація проходить і в присутності аміногруп та інших нуклеофільних функцій. Ефективна також реакція тіол-специфічних похідних лігандів із тіофосфатними групами, уведеними в олігонуклеотид.

У переважній більшості випадків нуклеофільні групи ( $\text{NH}_2$ , *SH*) вводять в олігонуклеотид, електрофільним же компонентом виступає похідна репортерної молекули. Рідше застосовують обернений підхід, наприклад, із використанням *COOH*-модифікованих олігонуклеотидів. До цього ж виду кон'югації відноситься і взаємодія фосфатних груп олігонуклеотиду з амінопохідними лігандів. Деякі інші схеми пост-синтетичної модифікації розповсюджені значно менше.

Пост-синтетична модифікація застосовується в синтезі кон'югатів найчастіше, хоча цей підхід має ряд обмежень. Так, реакції з олігонуклеотидами, як зарядженими біополімерами, проводять у водному чи водно-органічному середовищі. На жаль, не всі репор-

терні молекули достатньо добре розчинні в таких умовах. Інколи введення потрібних функцій в ліганд ускладнене. Крім того, цей підхід досить трудомісткий, оскільки необхідно спочатку очищати функціоналізований олігонуклеотид, а потім його кон'югат. Таких недоліків часто позбавлене пряме введення репортерних груп на етапі синтезу олігомеру на полімерному носіїві (рідше в розчині). В цьому випадку синтезують відповідно захищену фосфорильовану похідну репортерної молекули, яка може бути приєднана до олігонуклеотидного ланцюга в умовах міжнуклеотидної конденсації як звичайна нуклеотидна ланка [2, 21-25]. Використовують фосфітамідні (схема 1C) та *N*-фосфонатні, рідше фосфодієфірні похідні лігандів. Реакції проходять в органічних розчинниках і, як правило, з високим виходом. У цьому підході теж існують свої обмеження. Так, реагент повинен бути стабільним в умовах конденсації та деблокування олігонуклеотиду, що не завжди можливо. Крім того, очистка кінцевого кон'югату звичайно складніша, ніж у випадку пост-синтетичної модифікації. І, нарешті, сам синтез фосфорильованих лігандів часто складний. Незважаючи на це, пряма модифікація олігонуклеотидів сьогодні застосовується дуже широко.

Крім хімічних методів модифікації олігонуклеотидів, існують і ферментативні підходи [1, 2, 22, 23]. Вони обмежені субстратами, які може використовувати фермент, найчастіше ДНК-полімераза I *E. coli* та дезоксинуклеотид-трансфераза. Перший застосовують для модифікації будь-якого положення олігонуклеотиду з використанням комплементарної матриці, другий — для модифікації 3'-кінця олігомеру без матриці. Субстратами є модифіковані нуклеозид-трифосфати, в які введено репортерну групу. Ферментативний синтез широко застосовують при детекції ДНК із введенням флуоресцентних міток чи біотину за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Виділення та очистку кон'югатів здійснюють за допомогою електрофорезу та високо-ефективної хроматографії (HPLC). При хроматографічній очистці насамперед застосовують обернено-фазову хроматографію, де продукти, що містять гідрофобні групи, досить легко відділяються від немодифікованих олігомерів.

Особливо зручним є використання двоканалної детекції, коли хроматографічний профіль записують одночасно при 260 нм (приблизний максимум поглинання гетероциклічних основ НК) та при конкретній довжині хвилі смуги поглинання приєднаної репортерної групи. При електрофорезі кон'югати визначаються за рухливістю смуг у гелі, а у випадку флуоресцентних барвників (у тому числі інтеркаляторів) — за їх флуоресценцією при короткохвильовому опроміненні.

Описані вище загальні підходи застосовуються і в синтезі олігонуклеотидних кон'югатів з інтеркалюючими реагентами. Тепер розглянемо основні інтеркалятори, що приєднувались до полінуклеотидів (рис. 3).

**Акридин.** Олігонуклеотидні похідні акридину **1** вивчені найкраще. Саме на прикладі цього інтеркалятора всесторонньо досліджувались методи хімічного синтезу кон'югатів, їх біологічна активність, фактори, що впливають на гібридизацію з НК тощо [15-18, 20, 26-31]. Спершу приєднання проводили через 3'-фосфатну групу, а потім і в багатьох інших положеннях олігонуклеотидів, причому як природних фосфодиефірних, так і тіофосфатних аналогів [28] та  $\alpha$ -аномерних олігомерів [27], як пост-синтетично, так і з використанням фосфітамідних похідних ліганду [31]. В більшості випадків це похідні 9-аміноакридину, особливо 6-хлоро-2-метокси-9-аміноакридин, який демонструє найкращі інтеркаляційні властивості. Залишок акридину значно підвищує стійкість комплексів із комплементарними НК. Його приєднання до 3'-кінця оліготимідилату (dT)<sub>12</sub> збільшує T<sub>пл</sub> його комплексу з полі-А з 33,5 до 47,3 °C [15].

Акридин-модифіковані олігонуклеотиди мають високу біологічну активність за рахунок стабілізації комплементарних комплексів НК. Наприклад, трансляція мРНК гена 32 фагу Т4 інгібується кон'югатом, комплементарним до ділянки в районі послідовності Шайна-Далгарно, причому за відсутності приєданого інтеркалятора інгібування не відбувається. Ініціація трансляції блокується олігонуклеотидом, що зв'язується з транскрибованим ланцюгом у відкритому комплексі, утвореному РНК-полімеразою *E. coli* з промотором [26]. Акридинові кон'югати стабілізують не тільки дуплекси, а й

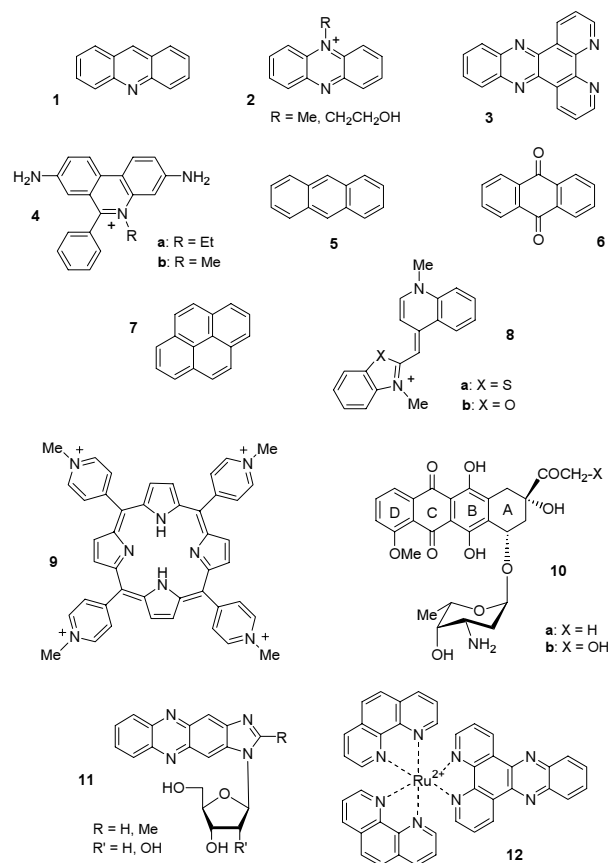


Рис. 3. Структури деяких інтеркаляторів, які ковалентно приєднувались до олігонуклеотидів: акридин (**1**), феназин (**2**), дипіридофеназин (**3**), етидій (**4a**), метидій (**4b**), антрацен (**5**), антрахінон (**6**), пірен (**7**), тiazоловий оранжевий (ТО, **8a**), оксазоловий жовтий (ЮО, **8b**), тетра(*N*-метилпіридил)порфін (ТМРуп, **9**), дауноміцин (**10a**), адріаміцин (**10b**), рибозид імідазофеназину (**11**), біс-фенантроліно-дипіридофеназинорутеній (II) (**12**).

триплексні ДНК. Спостерігалось інгібування транскрипції за рахунок утворення триплексів коротких антигенних олігонуклеотид-акридинових кон'югатів з поліпурин-поліпіримідиною послідовністю кодуєчої області генів *pol* та *nef* вірусу HIV-1. Немодифіковані олігомери не проявляли інгібуючого ефекту. Утворений триплексний бар'єр фізично блокує дію полімерази (polymerase arrest) [30].

**Феназин і дипіридофеназин.** Лабораторія В.Ф. Заритової однією з перших у світі одержала кон'югати ДНК з інтеркаляторами. У 1986 р. там синтезували олігонуклеотиди, модифіковані *N*-(2-гідроксietил)феназинієвими групами [19]. Ці групи вводили шляхом окислювального амінування катіонного інтеркаля-

тора **2** аміногрупою аміноалкіл-модифікованого олігонуклеотиду в м'яких умовах (схема 2). Хімічні властивості феназину дають змогу проводити кон'югацію без попереднього синтезу активованих похідних ліганду, що не надто часто зустрічається в хімії нуклеїнових кислот.

Феназинієва група різко підвищує стійкість комплементарних комплексів олігонуклеотидів. Залишок феназину стабілізує дуплекси на 13–19 °С, причому вільний барвник помітно не впливає на стабільність [19]. Феназин часто застосовували як ефектор для стабілізації комплексів реакційноздатних олігонуклеотидів, що містять алкілуєчі N-хлоретиламіногрупи для хімічної модифікації НК [32–34].

Залишок дипіридофеназину **3** вводили в різних місцях олігонуклеотидних послідовностей [35, 36]. Присутність кінцевого кон'югованого ліганду стабілізує дуплекси ДНК–ДНК і ДНК–РНК відповідно на 7,3–10,9 і 4,5–7,4 °С, а триплексні комплекси — на 3,8–11,1 °С. Приєднання ж цього інтеркалятора в середині олігомеру дуже слабо стабілізує дуплекси та перешкоджає утворенню триплексів [35].

**Етидій і метидій.** Етидійбромід **4a** — класичний інтеркалятор, що широко застосовується в молекулярній біології для детекції нуклеїнових кислот у гелях: при його зв'язуванні з двоспіральною ДНК відбувається різке зростання інтенсивності флуоресценції. Синтезовано й олігонуклеотидні 3'- та 5'-кон'югати етидію [37, 38]. Етидій-мічені олігонуклеотиди ефективні в системах переносу флуоресценції (FRET), коли гібридизація з мішенню двох олігомерів, мічених різними флуорофорами, дає змогу вивчати її просторову структуру, наприклад, утворення «шпильок» тощо [37]. Залишок етидію підвищує  $T_{\text{пл}}$  дуплексів із комплементарними полінуклеотидами на 20–30 °С. Приєднання етидію чи азидоетидію дає

можливість проводити фотохімічну модифікацію НК-мішеней. При опроміненні дуплексів відбувається розщеплення полінуклеотидної мішені, її модифікації та утворення ковалентних адуктів з етидій-модифікованим олігомером. Залежно від умов, рівень загальної модифікації мішені становить 10–70 % для етидієвих і 30–80 % для азидоетидієвих кон'югатів [38]. Залишок метидію **4b** також вводили в олігонуклеотиди, причому з використанням фосфітамідної похідної інтеркалятора [39]. Уведення фрагмента метидію в середину олігонуклеотидної послідовності приводило до зростання  $T_{\text{пл}}$  її дуплекса на 8,1 °С.

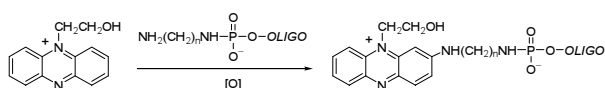
**Антрацен та антрахінон.** Антрацен **5**, інтеркалятор негетероциклічної природи, вводили в олігонуклеотиди з використанням фосфітамідів нуклеозидів, модифікованих лігандом по вуглеводному 2'-гідроксилу або 2-аміногрупі гуаніну [40–42]. Характерною для кон'югатів антрацену є здатність розрізняти комплементарні послідовності ДНК та РНК. Залишок антрацену стабілізує дуплекси з олігодезоксинуклеотидами з суттєвим зростанням їх  $T_{\text{пл}}$  за рахунок інтеркаляції, однак практично не впливає на стійкість дуплексів із комплементарною РНК. Навпаки, при утворенні дуплексів із РНК відбувається значне посилення флуоресценції ліганду, при зв'язуванні ж із ДНК подібні спектральні зміни не спостерігаються, тобто антрацен є РНК-специфічним флуоресцентним зондом.

Антрахінон **6** найчастіше вводять в олігонуклеотиди, використовуючи 2'-модифіковані нуклеозиди, подібно до антрацену [42–46]. Описано і введення через фосфорамідитні похідні [47]. Криві плавлення кон'югатів демонструють значний стабілізаційний вплив антрахінонового фрагмента на дуплекси як із ДНК, так і з РНК.

**Пірен.** Пірен **7** — один із найцікавіших інтеркаляторів з рядом унікальних властивостей. Його олігонуклеотидні кон'югати інтенсивно вивчаються [22, 42, 48–56]. Піренільний залишок вводять як пост-синтетично, так і в процесі твердофазного синтезу. Найчастіше з цією метою використовують 2'-піренільні похідні нуклеозидів [49–51]. Пірен виступав також агліконом в ациклічних нуклеозидах [53–55] та С-глікозидних реагентах [56]. Він

Схема 2

Приєднання феназину до аміноалкіл-модифікованого олігонуклеотиду [19]



підвищує стійкість комплексів НК за рахунок інтеркаляції [22, 52]. Олігонуклеотиди, що містять псевдонуклеозиди пірену, мають підвищену афінність до комплементарної одноланцюгової ДНК (стабілізація до 10,9 °С на модифікацію). Водночас такі піренові вставки різко знижують стійкість дуплексів із РНК. Піренові залишки значно сильніше взаємодіють із ДНК, де інтеркаляція є стабілізуючим фактором, який відсутній у випадку РНК [53, 55]. Таким чином, пірен-модифіковані олігонуклеотиди здатні розрізняти аналогічні рибоза дезоксирибо-последовності.

Інтеркаляція веде до зміни спектрально-флуоресцентних властивостей пірену. В його спектрі флуоресценції спостерігаються дві інтенсивні смуги при 372 та 373 нм. Особливістю ж барвника є легкість утворення ексімерів (максимум флуоресценції 470-480 нм), оскільки пірен має найбільший час затухання серед зондів-неметалів [22]. Характерним для пірену є значне гасіння флуоресценції у водному середовищі в присутності ДНК. Цей фактор, а також флуоресценція в короткохвильовій області зумовлюють те, що пірен практично не застосовується як звичайна флуоресцентна мітка. Інтерес до пірену пов'язаний з можливістю одержання структурної інформації за допомогою спектрів флуоресценції. Флуоресценція як мономеру, так і ексімеру пірену є індикатором гібридизації при гомогенній детекції НК [49].

Біс-піренільні реагенти, в яких дві піренові групи просторово зближені, демонструють інтенсивну ексімерну флуоресценцію, яка послаблюється в присутності дуплексної ДНК. Це відбувається за рахунок інтеркаляції одного з піренових залишків, у результаті чого стає неможливим ексімерний збуджений стан [22]. Біс-піренільна мітка була введена в олігонуклеотиди. При цьому у випадку гібридизації з ДНК внутрішньо модифікованого олігомеру спостерігалися незначні зміни флуоресценції, у випадку ж 5'-кінцевого мічення відбувалось значне (до 27 разів) зростання квантового виходу та 17-кратне збільшення співвідношення ексімерної і мономерної флуоресценції [52]. Цікавою рисою такої мітки є чутливість ексімерної та мономерної флуоресценції до нуклеотидної последовності в районі піренової мо-

дифікації, у т. ч. до точкових мутацій (mismatch) у НК-мішені [54].

**Ціаніни.** Ціаніни — чутливі флуоресцентні мітки для біополімерів. Особливо важливими є барвники, що інтеркаляційно зв'язуються з дуплексами ДНК, демонструючи різке зростання флуоресценції. Ціаніни можуть взаємодіяти з ДНК за допомогою кількох механізмів, і, крім інтеркаляції, можливим є борозенкове зв'язування мономерів й агрегація, коли барвник утворює агрегати, використовуючи ДНК як матрицю. Цікаво, що утворені ахіральними барвниками супрамолекулярні структури демонструють хіральні властивості, що базуються на характері правої спіралі ДНК.

Тип взаємодії ціанінових барвників із ДНК визначається їх структурними особливостями [57, 58]. Для опису механізму взаємодії монометинціанінів із ДНК запропоновано концепцію напівінтеркаляції [59-61]. Згідно з нею, один із двох гетероциклічних залишків молекули (а саме той, що має нижчі електронодонорні властивості, наприклад, бензотіазольний чи бензоксазольний) інтеркалює між парами основ ДНК, а більш основний гетероцикл (пірилієвий, піридинієвий) локалізується в борозенці ДНК близько до фосфатного остова. Утворення сендвіч-подібних агрегатів, що складаються з вільних та зв'язаних із ДНК молекул барвників, теж пояснюють, виходячи з моделі напівінтеркаляції [61]. В монометинінових барвниках іншого типу показана інтеркаляція лише хінолінової частини молекули [62].

Подібний механізм спостерігається і в деяких інших інтеркаляторів. Так, лише нафталінова група азиноміцину взаємодіє з ДНК шляхом інтеркаляції, інша ж частина молекули не бере в цьому участі [63]. В мезо-заміщених катіонних порфіринах лише половина порфіринового кільця необхідна для інтеркаляції [64]. Як буде описано нижче, в металокомплексі рутенію лише феназиновий фрагмент інтеркалює.

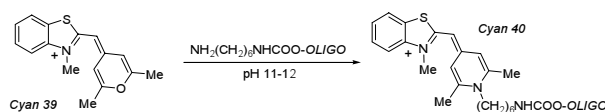
Монометинінові барвники типу тіазолового оранжевого (ТО, **8a**) та оксазолового жовтого (УО, **8b**) широко застосовуються для детекції НК у гелях. Димери деяких монометинціанінів, наприклад, тіазолового оранжевого (ТОТО), утворюють особливо стійкі комплекси з ДНК, в яких кожен хромофор інтеркалює між двома

парами основ, а лінкерна група, що зв'язує їх, знаходиться в малій борозенці дуплекса. Довжина лінкера повинна бути достатньою для утворення такої структури [65, 66]. Барвники з довгим поліметиновим ланцюгом (три-, пентаметинові) використовуються як флуоресцентні мітки біополімерів. Серед них відомі бренди фірми «Molecular Probes» Cy3 і Cy5 [65]. Методи мічення ними біомолекул добре розроблені, а відповідні реагенти комерційно доступні. Тут використовують стандартні методи одержання модифікованих біополімерів, описані вище. Мічені Cy3 і Cy5 олігонуклеотиди широко застосовуються як праймери в ланцюговій полімеразній реакції.

Монометинові ціанінові барвники TO та YO приєднували до олігонуклеотидів, використовуючи взаємодію COOH та аміногрупи або ж меркапто- та галоалкільної групи, приєднаних до компонентів реакції кон'югації [67-70]. Також, як і у випадку Cy3 та Cy5, можна застосувати ферментативне введення барвника з використанням ціанін-міченого нуклеозидтрифосфату [71].

Окремо стоїть цікавий метод введення монометинових ціанінових барвників в олігонуклеотиди (а також білки) з використанням реакції амінів з пірилієвими солями. При взаємодії аміноалкіл-модифікованого олігонуклеотиду з пірилієвим барвником типу Cyан 39 відбувається його ковалентне приєднання з одночасною трансформацією низькофлуоресцентного пірилію в піридинієву похідну з високою флуоресценцією (схема 3). Це один із доволі рідкісних прикладів приєднання ліганду без спеціального отримання його активованої похідної [72, 73]. Після утворення дуплекса з комплементарним олігонуклеотидом флуоресценція залишку Cyан 40 зростає в 1,9-2,1 разів, що значно нижче, ніж при взаємодії вільного барвника (800-кратне зростання [59]). Аналогічний результат спостерігали при порівнянні кон'югату TO (3,5-5-кратне зростання флуоресценції [74]) та вільного барвника (ріст на 3 порядки більший [75]). Ймовірно, це пов'язано з ускладненою через стеричні фактори інтеркаляцією приєданого ціаніну, тобто лінкер дає можливість лише зовнішньої взаємодії катіонної молекули барвника з дуплексом. Це підкреслює необхідність добору оп-

Схема 3  
Ковалентне приєднання пірилієвого барвника Cyан 39 до олігонуклеотиду з одночасною трансформацією в похідну піридинієвого барвника Cyан 40 [72, 73]



тимальної структури лінкерної групи. YO-модифіковані олігомери з оптимізованим лінкером демонструють різке зростання флуоресценції після гібридизації з комплементарною ДНК, тоді коли сам барвник та його кон'югат практично не флуоресціюють [69].

Ціанінові кон'югати практично не застосовують для стабілізації дуплексів з метою підсилення їх біологічної активності. Насамперед їх використовують як зонди для детекції НК як у розчині, так і на полімерних носіях. Наприклад, барвник TO, уведений в олігонуклеотид через 5'-кінцевий фосфат, здатний до інтеркаляції при утворенні дуплекса з одноланцюговою ДНК, приєднаною до поверхні силікатного полімеру, що можна використати для створення біосенсорів на НК [68]. Особливо перспективним є застосування ціанінів у різних варіантах гомогенної детекції ДНК у розчині (молекулярні бекони, light-up probes тощо) [76-78]. Так, описано використання YO-модифікованих олігонуклеотидів для моніторингу процесу транскрипції в реальному часі, оскільки флуоресценція реакційної суміші демонструє лінійне, залежне від часу, зростання, що відповідає накопиченню синтезованої РНК [69].

**Порфірини.** Синтетичні катіонні порфірини, подібно до ціанінів, взаємодіють із ДНК трьома способами — інтеркаляція, зовнішнє зв'язування і зв'язування з самоагрегацією [79, 80]. Вони можуть індукувати фотохімічне розщеплення ДНК, а їх металокомплекси з перехідними металами (Mn(III), Fe(III), Cu(II) та ін.) відомі як хімічні нуклеази, здатні до окислювального розщеплення ДНК [81, 82]. Відомі сполуки цього класу — мезо-тетра(4-N-метилпіридил)порфін (TMPyP, **9**) та його аналоги — ефективно зв'язуються з ДНК за рахунок інтеркаляції (4- і 3-метилпіридинієві похідні) і неінтеркаляційних механізмів (2-метилпіри-



динієві похідні та мезо-N-триметиланілінійпорфіні) [79-82]. Можлива також комбінація кількох способів взаємодії. Співвідношення інтеркаляційного та зовнішнього зв'язування в алкілпіридинійпорфінах залежить від типу замісників та їх орієнтації [83]. Здатність конкретного порфірину до інтеркаляції визначається розміщенням і типом заряджених груп, планарністю порфіринового кільця і геометричним розміром молекули [79, 80, 83-85].

Для синтезу кон'югатів ТМРyP [86-90] звичайно використовували його аналог, в якому одна з піридинових груп замінена на фенільну, що містить карбоксиалкільний лінкер. Такий синтон можна приєднувати до аміно-модифікованих олігонуклеотидів. Було синтезовано похідні порфіринів та їх металокомплексів як по 5'-кінцю, так і по внутрішніх положеннях нуклеотидної послідовності через 2'-гідроксил відповідних нуклеотидів [89]. Описано і синтез кон'югатів через N-фосфонат порфірину [87]. Кон'югати порфіринів цікаві не так інтеркаляційними властивостями лігандів, як Red-Ox-активністю комплексів із деякими металами, що дає можливість направлено розщеплення ДНК-мішені в заданому положенні [81, 82, 86, 89].

**Інтеркалятори як аглікони в нуклеозидах.** Ряд природних і синтетичних інтеркаляторів є аналогами нуклеозидів. Кон'югація таких сполук має низку переваг порівняно з іншими методами. Так, нуклеозидний аналог можна ввести практично в будь-яке положення олігонуклеотиду, причому для цього не потрібно змінювати стандартний протокол олігонуклеотидного синтезу. Негативний вплив інтеркалятора на специфічність гібридизації тут часто нижчий, ніж у випадку приєднання через синтетичний лінкер. Флуоресценція хромофора в таких кон'югатах може бути використана, наприклад, для контролю за правильністю гібридизації. Розглянемо ряд представників цього класу сполук.

**Антрацикліни.** Антрацикліни, у тому числі дауноміцин **10a** (інша назва даунорубіцин) та адріаміцин **10b** (доксорубіцин), відомі як антиракові препарати. Ці ліганди взаємодіють із ДНК із константами зв'язування близько  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  М [91, 92]. Антрацикліни складаються з двох основних структурних елементів — аро-

матичного аглікону антрахінонового типу й аміновуглеводу дауносаміну. Для них характерний цікавий механізм взаємодії з ДНК, в якому беруть участь обидва фрагменти молекули. Хромофор інтеркалює таким чином, що його довга вісь практично перпендикулярна до довгої осі пар основ в області інтеркаляції. Особливою геометрією комплексу антрацикліни відрізняються від більшості інших інтеркаляторів, що зв'язуються паралельно парам основ. Кільце D виступає у велику борозенку, а кільце A потрапляє в малу борозенку ДНК [91]. Аміноцукор взаємодіє з функціональними групами малої борозенки, додатково стабілізуючи комплекс [92]. Флуоресценція хромофора після інтеркаляції гаситься.

Приєднання дауноміцину до олігонуклеотидів значно підвищує ефективність утворення триплексів [93]. Кон'югати ефективно зв'язуються з двоспіральною ДНК одночасно шляхом утворення триплекса, інтеркаляції хромофора в області стику триплекс-дуплекс і взаємодії аміноцукру з малою борозенкою. Дауноміцин вводили через лінкер, приєднаний до фенольного атома Кисню кільця D або аміногрупи вуглевода, хоча остання необхідна для ефективного зв'язування ліганду з ДНК [94-96]. Приєднання дауноміцину підвищує біологічну активність олігомерів, зберігаючи високу сіквенс-специфічність. Так, його кон'югати, спрямовані проти промотора P2, критичного для транскрипції гена *c-myc*, інгібували транскрипцію *in vitro* та знижували активність *c-myc* у ракових клітинах [94]. Кон'югати, направлені проти гена *c-myc*, індукували апоптоз клітин раку простати, що експресують цей ген, практично не впливаючи при цьому на нормальні клітини з низьким рівнем експресії *c-myc*. Вільний же дауноміцин інгібує як ракові, так і нормальні клітини, тобто саме стабілізація анти-*c-myc* потрійних комплексів ДНК інтеркалятором лежить в основі антипроліферативної активності кон'югатів [96].

Синтезовано й доксорубіцин-олігонуклеотидні кон'югати [97]. Вони значно стабільніші в клітинному середовищі порівняно з немодифікованими олігомерами, а їх комплекси з комплементарними полінуклеотидами значно стійкіші. Цікаво, що кон'югати доксорубіцину

*in vitro* на порядок знижували рівень стійкості клітин карциноми людини до медичних препаратів (multidrug resistance).

**Імідазофеназин.** Рибозид імідазофеназину **11** запропоновано в 1991 р. в лабораторії А.С.Шаламая [98]. Використовуючи імідазофеназин-модифікований полімерний носій, одержують 3'-мічені олігонуклеотиди, а його Н-фосфонатні похідні дають змогу вводити цей аналог нуклеозиду в 5'- і внутрішні положення [99-102]. Залишок інтеркалятора, приєднаний на 3'-кінці (dT)<sub>10</sub>, підвищує T<sub>m</sub> дуплекса з полі(гА) на 10-12 °С, а триплекса з полі(dA)-полі(dT) — на 13 °С [101, 102]. Флуоресценція хромофора при інтеркаляції в послідовності G·C двоспиральних НК зменшується, при взаємодії ж із дуплексами А·Т чи А·U інтенсивність її зростає, а ефективність зв'язування ліганду з ними вища [103].

Олігонуклеотиди, що містять імідазофеназин, проявляють високу біологічну активність [104-106]. 3'-Модифіковані олігомери, комплементарні 3'-ділянці 16S-рибосомальної РНК молекул (т. зв. антисигнатурні), в концентрації 80 мкМ на 60 % інгібують процес трансляції у молекул. Однак немодифіковані олігомери лише в незначній мірі поступались кон'югатам (58 % пригнічення біосинтезу білка), тобто приєднання інтеркалятора мало впливає на ефективність трансляції. Цікаво, що олігомери, які містять два залишки інтеркалятора **11** на 3'- та 5'-кінці, демонструють значно нижчу інгібуючу активність (35 %) [105, 106]. Однак процес транскрипції *in vitro* дуже активно пригнічується імідазофеназин-модифікованими олігонуклеотидами (на 75-80 % в концентрації 100 нМ). При цьому 5'-модифіковані олігомери активніші, ніж 3'-похідні, проте ще вищу активність демонструють реагенти, що містять імідазофеназин в середині послідовності. Немодифіковані реагенти практично не діють на синтез РНК. Модифіковані олігонуклеотиди впливають на процес транскрипції двома шляхами: блокують синтез РНК за рахунок специфічного зв'язування з ДНК-мішенню, а також, в незначній мірі, за рахунок неспецифічної взаємодії з РНК-полімеразою [104, 106].

**Інші глікозиди.** Серед інтеркаляторів, що входять в нуклеозид як аглікони, можна на-

звати фенантрен, пірен і навіть порфірин [107]. В олігонуклеотиди вводили N-глікозиди таких лігандів, як піримідинофеноксазин, -фенотіазин, -карбазол, використовуючи Н-фосфонатні та фосфітамідні похідні цих нуклеозидних аналогів [108-110]. Олігонуклеотиди, що містять такі нуклеозиди, демонструють підвищену афінність до комплементарних нуклеїнових кислот, покращений транспорт через клітинну мембрану й антисенсну активність. Нуклеозидні аналоги на основі неазотовмісних інтеркаляторів було одержано у вигляді С-глікозидів [107].

**Металоінтеркалятори.** Кон'югати олігонуклеотидів з комплексом дипіридофеназинорутенію **12** утворюють стабілізовані сіквенс-специфічні дуплекси та триплекси з ДНК-мішеннями, в яких рутенієвий комплекс стає високофлуоресцентним. Сам металокомплекс у водному середовищі не флуоресцює. Рутенієві комплекси приєднували до олігонуклеотидів як по кінцевих положеннях через аміно- чи меркаптолінкер [36, 111-113], так і в середині нуклеотидних послідовностей у вигляді псевдонуклеозидів [36].

Стабілізація дуплексів ДНК відбувається за рахунок інтеркаляції дипіридофеназинової частини молекули металокомплексу, а фрагмент Ru(phen)<sub>2</sub> не бере в цьому участі [36]. При взаємодії кон'югатів з відповідними дуплексними ДНК утворюються потрійні спіралі, що мають довший час життя та дисоціюють при вищих температурах, ніж триплекси, утворені немодифікованими олігомерами. Інтеркалятор підвищує температуру переходу триплекс-дуплекс на 12 °С [113].

Властивості кон'югатів значною мірою залежать від того, який із діастереомерів металокомплексу застосовано. Значно відрізняється електрофоретична рухливість дуплексів [112]. Їх стійкість і стереохімічна доступність фосфодиефірних зв'язків в області інтеркаляції (у тому числі для нуклеаз) також визначаються хіральністю комплексу рутенію **12** [36]. Кон'югати олігонуклеотидів з такими металокомплексами, як і металопорфіринами, застосовують для вивчення процесів фотохімічної модифікації та окислювального розщеплення нуклеїнових кислот, а також процесу переносу заряду в ДНК, коли окисно-відновний

ініціатор інтеркалює в строго визначеному місці [111, 114].

**Стабілізація триплексної ДНК інтеркаляторами.** Сіквенс-специфічне зв'язування олігонуклеотидів з двоспіральною ДНК з утворенням потрійної спіралі — потужний метод селективного модулювання експресії генів і один із потенційних засобів генної терапії [3, 5, 115-117]. Утворення триплексів можливе у випадку, коли в двоспіральній ДНК-мішені присутній гомопурин-гомопіримідиновий тракт. Лише тоді гарантується достатня специфічність зв'язування та стабільність потрійного комплексу. Триплекси утворюються на основі т. зв. хугстинівських (Hoogsteen) водневих зв'язків, які, на відміну від класичного уотсон-криківського спарювання, об'єднують три гетероциклічні основи НК. Олігонуклеотиди утворюють хугстинівські зв'язки з поліпуриновими ланцюгами дуплексної ДНК, причому поліпуринові олігомери зв'язуються антипаралельно, а поліпіримідинові паралельно до поліпуринового ланцюга ДНК-мішені. В обох випадках в утвореному комплексі триплексоформуючий олігонуклеотид (ТФО) локалізується у великій борозенці подвійної спіралі. Утворення триплексів дає можливість інгібувати транскрипцію та реплікацію ДНК (антигенні олігонуклеотиди), спрямовано розщеплювати її, вводити сайт-специфічні мутації та ін. Час перебування ТФО в комплексі з дуплексною мішенню є ключовим фактором, що визначає рівень і тривалість біологічного ефекту. Хімічна модифікація ТФО інтеркаляторами — один із основних способів підвищити стабільність триплексів та біологічну активність олігомерів.

Розглянуті вище дуплекс-специфічні ліганди часто здатні зв'язуватись із триспіральною ДНК. Наприклад, залишки акридину, приєднані до 3'- чи 5'-кінця олігонуклеотидів, інтеркалюють на стику триплекс-дуплекс, значно стабілізуючи потрійну спіраль [26, 30]. Однак існує окремий клас інтеркаляторів, що специфічно взаємодіють саме з триплексною ДНК. Одержано олігонуклеотидні кон'югати з такими сполуками, серед них оксазоліпіридокарбазол, бензопіридохіноксалін, бензоіндохінолін та ін., в яких приєднані ліганди ефективно стабілізують утворені триплекси з

двоспіральними мішенями ДНК [3, 8, 20, 118, 119]. Особлива геометрія взаємодії гетероциклічних основ у триплексах висуває особливі вимоги до структури лігандів, специфічних до тримерних ДНК. Це, як правило, тетраци пентациклічні молекули, причому звичайно не лінійні, а «загнуті» таким чином, щоб їх  $\pi$ -системи ефективно перекривались із  $\pi$ -системами хугстинівських комплексів, утворених трьома нуклеотидними основами, що лежать в основі триспіральної ДНК. На жаль, обмежений розмір огляду не дає нам змоги детально зупинитись на цьому питанні. Відсилаємо читача до недавніх оглядів та книг, присвячених цій проблемі [118-121].

**Біологічна активність кон'югатів і фактори, що впливають на неї.** Біологічна активність олігонуклеотидів базується на їх здатності специфічно та з високою афінністю зв'язуватись із нуклеїновими кислотами і таким чином регулювати процеси нуклеїнового обміну — реплікацію, транскрипцію, трансляцію тощо. Ефективність олігонуклеотидів багато в чому визначається стабільністю комплексів, утворених із НК-мішенями. Приєднання інтеркаляторів до олігомерів підвищує стійкість їх дуплексів і триплексів із комплементарними НК, у результаті чого зростає ефективність взаємодії з мішенню, що особливо важливо для інгібування генів.

Крім типу інтеркалятора, надзвичайно великий вплив на стабільність дуплексів має довжина та структура лінкера, що з'єднує олігонуклеотид із лігандом, який повинен взаємодіяти зі спіраллю [1, 15-17, 19, 29, 42]. Лінкер повинен забезпечити просторовий доступ ліганду до місця його взаємодії з НК та оптимальне положення інтеркалятора для  $\pi$ - $\pi$  взаємодії з сусідніми парами основ без порушення їх водневих зв'язків. Невеликі зміни довжини лінкера можуть впливати на ефективність комплексоутворення. Конструкція лінкерної групи є ключовим фактором досягнення високої біологічної активності кон'югованих чи імібілізованих на полімерних носіях біомолекул, тобто в тих випадках, коли їх рухливість чи доступність обмежені. Як правило, збільшення довжини лінкера в певних межах дещо підвищує стабільність комплементарних комплексів [15, 16], хоча в інших випадках йо-

го подовження може привести і до зниження  $T_{пл}$  [19]. Довжина лінкера прямо зв'язана з розміром молекули інтеркалятора [42]. В середньому, найкращі результати демонструють 5-6-членні спейсери [2, 15, 16]. Безумовно, відіграє роль не лише довжина, а й структура лінкерної групи, її гнучкість, гідрофобність та інші параметри.

Значний вплив на стабільність комплексів НК справляє і місце приєднання інтеркалятора (гідроксильні групи, кінцеві та міжнуклеотидні фосфати, нуклеозидні основи олігомеру та ін.) [1, 16, 20, 42]. Інтеркалятори здатні як стабілізувати комплекс, так і в деяких випадках дестабілізувати його. Наприклад, при модифікації міжнуклеотидної фосфатної групи на  $T_{пл}$  комплексів впливають електронна природа та заряд замісника і стереохімічні фактори, що в сумі може привести до місцевого порушення гібридизації та дестабілізації комплексів [1]. Такі ефекти можливі для будь-яких модифікацій міжнуклеотидних фосфатів, навіть при заміні природних фосфодиефірних груп на близькі за розміром, проте нейтральні метилфосфонатні. Інтеркалятори як достатньо великі молекули здійснюють значний стеричний вплив. Зрозуміло, що серйозно порушує гібридизацію приєднання інтеркаляторів чи інших молекул до внутрішніх гетероциклічних основ олігомерів. Дестабілізуючий вплив ліганду може компенсуватися стабілізуючим ефектом за рахунок інтеркаляції. Можливе і підвищення стійкості комплексу лігандом поза власне інтеркаляцією. Наприклад, за рахунок нейтралізації заряду фосфатної групи зменшується електростатичне відштовхування ланцюгів НК, що стабілізує дуплекс [1]. Цей ефект максимальний при низькій йонній силі розчину, де екранування зарядів найменше. Як правило, стеричний вплив лігандів дестабілізує комплекси НК, як і їх електронні ефекти, що, наприклад, можуть приводити до порушення гідратації НК [122]. З іншого боку, бороzenки гібрида утворюють більш гідрофобне оточення, вигідне для гідрофобних замісників, що сприяє гібридизації. В літературі є дані про посилення гібридизації в результаті зростання ліпофільності модифікуючих груп [123].

У цілому, сумарна  $T_{пл}$  комплексу визначається як результат дії ряду факторів.

Відносний вплив різних факторів залежить як від зовнішніх умов, таких як концентрація солей, так і від внутрішніх параметрів, серед яких довжина олігонуклеотиду, ступінь його модифікації, положення модифікацій в олігомері, послідовності основ навколо місця модифікації [1, 2, 122]. Таким чином, наслідки включення в олігонуклеотид конкретної репортерної групи в різних випадках будуть різними, і багатофакторність ситуації ускладнює передбачення впливу приєднання ліганду на гібридизацію. Модифікація кінцевих положень олігонуклеотиду в меншій мірі, порівняно з внутрішніми модифікаціями, впливає на утворення комплементарних комплексів НК, оскільки відбувається на їх периферії. Справді, неоднократно було показано, що інтеркалятор на кінці олігонуклеотиду, особливо на 3'-кінці, є більш ефективним, ніж приєднаний усередині послідовності. Цікаво, що введення другої інтеркалюючої групи часто вже не дає додаткових переваг [16, 104-106, 124].

За деякими винятками [18], в кон'югатах зберігається висока специфічність зв'язування з мішенями. Специфічний компонент кон'югату, а саме олігонуклеотидна послідовність, відіграє головну роль в утворенні комплексу, інтеркаляційна ж група впливає на його стабільність. Зв'язування інтеркаляторів звичайно відбувається за рахунок включення між парами основ утвореного комплементарного комплексу, хоча воно може проходити і на його периферії, в т. ч. шляхом йонної взаємодії катіонного ліганду з фосфат-аніонами. За рахунок стабілізаційного впливу ліганду для ефективної гібридизації вдається використовувати коротші ніж звичайно олігонуклеотиди. Цікаво, що часто спостерігається різниця в енергії зв'язування кон'югатів із ДНК та РНК. Так, акридин-модифіковані олігомери значно сильніше зв'язуються з РНК, ніж із дезоксирибо-послідовностями [27]. Навпаки, піренові похідні дають стійкіші комплекси з полідезоксинуклеотидами [53-55], як і антраценові кон'югати [40-42].

Крім покращення зв'язування з НК-мішенями, ковалентне приєднання інтеркаляторів до олігонуклеотидів має і ряд додаткових переваг. Модифіковані олігонуклеотиди часто мають підвищену стійкість до дії клітинних

нуклеаз [1, 2, 27]. Приєднання об'ємних груп до 3'- та 5'-кінцевих положень олігонуклеотиду ускладнює атаку відповідних екзонуклеаз, що важливо для терапевтичного використання олігонуклеотидних препаратів [18, 28, 125]. Уведення в олігонуклеотиди ліпофільних молекул, у т. ч. інтеркаляторів, як правило, підвищує здатність полярних олігомерів проникати в клітину [1, 2, 28, 110, 125, 126]. При цьому флуоресценція інтеркаляторів може забезпечити простий метод вивчення клітинного транспорту кон'югатів [1].

У цілому, ключовими факторами, що обумовлюють використання синтетичних олігонуклеотидів як антисенсних та антигенних реагентів, є здатність до проникнення в клітину, стійкість до нуклеаз і стабільність гібридів, утворених із НК-мішенями [1-3, 22, 23]. Для покращення цих характеристик добирають відповідні хімічні модифікації. Ковалентне ж приєднання інтеркаляторів може мати позитивний ефект на всі ці параметри. В літературі описано велику кількість прикладів застосування таких кон'югатів як високоспецифічних біологічно активних препаратів [18, 30, 94, 96, 97, 104-106, 110, 127-129]. Однак слід мати на увазі, що при хімічній модифікації завжди існує небезпека внесення небажаної біологічної активності і навіть токсичності. Так, тіофосфатні аналоги олігонуклеотидів виявились

недостатньо специфічними і досить добре зв'язуються з деякими білками та можуть інгібувати певні ферменти, наприклад, ДНК-полімерази [1, 129]. Спостерігався і неспецифічний вплив деяких кон'югатів на транскрипцію в результаті їх зв'язування з РНК-полімеразою [26, 104, 106].

**Висновки.** Олігонуклеотидні кон'югати інтеркаляторів, що останнім часом отримали комерційну назву INA<sup>TM</sup> (Intercalating Nucleic Acids [42, 53, 54]), демонструють підвищену афінність до комплементарних нуклеїнових кислот. Інтеркаляція є оборотним процесом, при якому в тій чи іншій мірі порушується структура нуклеїнового комплексу, однак, на відміну від молекул, здатних до хімічної чи фотохімічної модифікації НК, інтеркалятори не викликають хімічних змін в останніх. Стабілізуючий ефект інтеркалятора залежить від ряду факторів, основними з яких є тип хромофора, структура та довжина лінкера між лігандом та олігонуклеотидом і місце приєднання ліганду. Олігонуклеотиди, модифіковані інтеркаляторами, мають цінні біологічні властивості. Вони знаходять застосування як у молекулярно-біологічних дослідженнях, так і в медицині, і на їх основі можуть бути створені терапевтичні препарати нового покоління.

Надійшла до редакції 20.06.2006 р.

#### Oligonucleotide conjugates with intercalating agents: synthesis and biological activity

I.Ya. Dubey

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine  
150 Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine

**Abstract.** Modification of oligonucleotides with intercalating agents improves their binding affinity to target nucleic acids while maintaining high sequence specificity that allows an efficient regulation of gene expression by blocking the replication, transcription or translation process. Intercalators are planar polyaromatic compounds that interact with DNA double and triple helix. They bind by insertion between adjacent base pairs and stabilize complementary complexes of nucleic acids. These conjugates have been extensively studied *in vitro* and *in vivo* as a tool to investigate the biological processes and as potential anticancer and antiviral therapeutic agents. In this review, the various approaches to the synthesis of modified oligonucleotides are summarized, and their conjugates with major intercalating agents are described. Factors influencing the hybridization efficiency and biologic activity of conjugates are discussed.

**Key words:** Oligonucleotide conjugates, intercalating agents, DNA, duplexes, triple helix.

## Перелік літератури

1. *Uhlmann E., Peyman A.* Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle // *Chem. Rev.* — 1990. — Vol. 90, No 4. — P. 543-584.
2. *Goodchild J.* Conjugates of oligonucleotides and modified oligonucleotides: a review of their synthesis and properties // *Bioconjugate Chem.* — 1990. — Vol. 1, No 3. — P. 165-187.
3. *Thuong N.T., Helene C.* Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by oligonucleotides // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 1993. — Vol. 32, No 5. — P. 666-690.
4. *Reese C.B.* Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis // *Org. Biomol. Chem.* — 2005. — Vol. 3, No 21. — P. 3851-3868.
5. *Da Ros T., Spalluto G., Prato M., Saison-Behmoaras T., Boutorine A., Cacciari B.* Oligonucleotides and oligonucleotide conjugates: a new approach for cancer treatment // *Curr. Med. Chem.* — 2005. — Vol. 12, No 1. — P. 71-88.
6. *Lerman L.S.* Structural considerations in the interaction of deoxyribonucleic acid and acridines // *J. Mol. Biol.* — 1961. — Vol. 3. — P. 18-20.
7. *Шабарова З.А., Богданов А.А.* Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. — М.: Химия, 1978. — С. 317-318.
8. *Helene C.* Rational design of sequence-specific DNA ligands for artificial control of gene expression // *Pure Appl. Chem.* — 1994. — Vol. 66, No 4. — P. 663-669.
9. *Graves D.E., Velea L.M.* Intercalative binding of small molecules to nucleic acids // *Curr. Org. Chem.* — 2000. — Vol. 4, No 9. — P. 915-929.
10. *Brana M.F., Cacho M., Gradillas A., de Pascual-Teresa B., Ramos A.* Intercalators as anticancer drugs // *Curr. Pharm. Des.* — 2001. — Vol. 7, No 17. — P. 1745-1780.
11. *Martinez R., Chacon-Garcia L.* The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work // *Curr. Med. Chem.* — 2005. — Vol. 12, No 2. — P. 127-151.
12. *Dedon P.G.* Determination of binding mode: intercalation // In: *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* (Ed. by *Beaucage S.L., Bergstrom D.E., Glick G.D., Jones R.A.*). John Wiley & Sons: New York, 2003. — P. 8.1.1-8.1.13.
13. *Tse W.C., Boger D.L.* A fluorescent intercalator displacement assay for establishing DNA binding selectivity and affinity // *Acc. Chem. Res.* — 2004. — Vol. 37, No 1. — P. 61-69.
14. *Letsinger R.L., Schott M.E.* Selectivity in binding a phenanthridinium-dinucleotide derivative to homopolynucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* — 1981. — Vol. 103, No 24. — P. 7394-7396.
15. *Asseline U., Delarue M., Lancelot G., Toulme F., Thuong N.T., Montenay-Garestier T., Helene C.* Nucleic acid-binding molecules with high affinity and base sequence specificity: intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1984. — Vol. 81, No 11. — P. 3297-3301.
16. *Asseline U., Toulme F., Thuong N.T., Delarue M., Montenay-Garestier T., Helene C.* Oligodeoxynucleotides covalently linked to intercalating dyes as base sequence-specific ligands. Influence of dye attachment site // *EMBO J.* — 1984. — Vol. 3, No 4. — P. 795-800.
17. *Asseline U., Thuong N.T., Helene C.* Oligonucleotides covalently linked to intercalating agents. Influence of positively charged substituents on binding to complementary sequences // *J. Biol. Chem.* — 1985. — Vol. 260, No 15. — P. 8936-8941.
18. *Toulme J.J., Krisch H.M., Loreau N., Thuong N.T., Helene C.* Specific inhibition of mRNA translation by complementary oligonucleotides covalently linked to intercalating agents // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1986. — Vol. 83, No 5. — P. 1227-1231.
19. *Зарьтова В.Ф., Кутявин И.В., Сильников В.Н., Шижкин Г.В.* Модификация нуклеиновых кислот в стабилизированных комплементарных комплексах. I. Синтез алкилирующих производных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих на 5'-конце остаток N-(2-оксиэтил)феназина // *Биоорганическая химия.* — 1986. — Т. 12, № 7. — С. 911-920.
20. *Asseline U., Thuong N.T., Helene C.* Synthesis and properties of oligonucleotides covalently linked to intercalating agents // *New J. Chem.* — 1997. — Vol. 21, No 1. — P. 5-17.
21. *Beaucage S.L., Iyer R.P.* The functionalization of oligonucleotides via phosphoramidite derivatives // *Tetrahedron.* — 1993. — Vol. 49, No 10. — P. 1925-1963.
22. *Коршун В.А., Берлин Ю.А.* Введение нерадиоактивных репортерных групп в синтетические олигонуклеотиды и их детекция // *Биоорганическая химия.* — 1994. — Т. 20, № 6. — С. 565-616.
23. *Protocols for oligonucleotide conjugates: synthesis and analytical techniques* (Ed. by *Agrawal S.*). Methods in molecular biology, Vol. 26. — Humana Press: Totowa, New Jersey, 1993. — 390 pp.
24. *Bioconjugate Techniques* (Ed. by *Hermanson G.T.*). Academic Press: San Diego-New York-Boston, 1996. — 785 pp.
25. *Synthesis of modified oligonucleotides and conjugates* // In: *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* (Ed. by *Beaucage S.L., Bergstrom D.E., Glick G.D., Jones R.A.*). — John Wiley & Sons: New York, 2003. — P. 4.0.1-4.9.28.
26. *Helene C., Montenay-Garestier T., Saison T., Takasugi M., Toulme J.J., Asseline U., Lancelot G., Maurizot J.C., Toulme F., Thuong N.T.* Oligodeoxynucleotides covalently linked to intercalating agents: a new class of gene regulatory substances // *Biochimie.* — 1985. — Vol. 67, No 7-8. — P. 777-783.
27. *Thuong N.T., Asseline U., Roig V., Takasugi M., Helene C.* Oligo(alpha-deoxynucleotide)s covalently linked to intercalating agents: differential binding to ribo- and deoxyribopolynucleotides and stability towards nuclease digestion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1987. — Vol. 84, No 15. — P. 5129-5133.
28. *Stein C.A., Mori K., Loke S., Subasinghe C., Shinozuka K., Cohen J.S., Neckers L.M.* Phosphorothioate and normal oligodeoxyribonucleotides with 5'-linked acridine: characterization and preliminary kinetics of cellular uptake // *Gene.* — 1988. — Vol. 72, No 1-2. — P. 333-341.
29. *Asseline U., Bonfils E., Dupret D., Thuong N.T.* Synthesis and binding properties of oligonucleotides covalently linked to an acridine derivative. A new study of the influence of the dye attachment site // *Bioconjugate Chem.* — 1996. — Vol. 7, No 3. — P. 369-379.
30. *Giovannangeli C., Perrouault L., Escude C., Nguyen T., Helene C.* Specific inhibition of in vitro transcription elongation by triplex-forming oligonucleotide-intercalator conjugates targeted to HIV proviral DNA // *Biochemistry.* — 1996. — Vol. 35, No 32. — P. 10539-10548.
31. *Shi Y., Machida K., Kuzuya A., Komiyama M.* De-

sign of phosphoramidite monomer for optimal incorporation of functional intercalator to main chain of oligonucleotide // *Bioconjugate Chem.* — 2005. — Vol. 16, No 2. — P. 306-311.

32. *Kutyavin I.V., Podyminogin M.A., Bazhina Yu.N., Fedorova O.S., Knorre D.G., Levina A.S., Mamayev S.V., Zarytova V.F.* N-(2-Hydroxyethyl)phenazinium derivatives of oligonucleotides as effectors of the sequence-specific modification of nucleic acids with reactive oligonucleotide derivatives // *FEBS Lett.* — 1988. — Vol. 238, No 1. — P. 35-38.

33. *Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutyavin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F.* Synthesis and high stability of complementary complexes of N-(2-hydroxyethyl)phenazinium derivatives of oligonucleotides // *Bioconjugate Chem.* — 1992. — Vol. 3, No 5. — P. 414-419.

34. *Levina A.S., Tabatadse D.R., Khalimskaya L.M., Prikhodko T.A., Shishkin G.V., Alexandrova G.V., Zarytova V.F.* Oligonucleotide derivatives bearing reactive and stabilizing groups attached to C5 of deoxyuridine // *Bioconjugate Chem.* — 1993. — Vol. 4, No 5. — P. 319-325.

35. *Ossipov D., Zamaratski E., Chattopadhyaya J.* Dipyrido[3,2-a:2,3-c]phenazine-Tethered Oligo-DNA: Synthesis and thermal stability of their DNADNA and DNARNA duplexes and DNADNADNA triplexes // *Helv. Chim. Acta.* — 1999. — Vol. 82, N 12. — P. 2186-2200.

36. *Ossipov D., Pradeepkumar P.I., Holmer M., Chattopadhyaya J.* Synthesis of [Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup>-tethered oligo-DNA and studies on the metallointercalation mode into the DNA duplex // *J. Am. Chem. Soc.* — 2001. — Vol. 123, No 15. — P. 3551-3562.

37. *Mergny J.-L., Boutorine A.S., Garestier T., Belloc F., Rougee M., Bulychev N.V., Koshkin A.A., Bourson J., Lebedev A.V., Valeur B., Thuong N.T., Helene C.* Fluorescence energy transfer as a probe for nucleic acid structures and sequences // *Nucleic Acids Res.* — 1994. — Vol. 22, No 6. — P. 920-928.

38. *Koshkin A.A., Kropachev K.Yu., Mamaev S.V., Bulychev N.V., Lokhov S.G., Vlassov V.V., Lebedev A.V.* Ethidium and azidoethidium oligonucleotide derivatives: Synthesis, complementary complex formation and sequence-specific photomodification of the single-stranded and double-stranded target oligo- and polynucleotides // *J. Mol. Recogn.* — 2004. — Vol. 7, No 3. — P. 177-188.

39. *Timofeev E.N., Smirnov I.P., Haff L.A., Tishchenko E.I., Mirzabekov A.D., Florentiev V.L.* Methidium intercalator inserted into synthetic oligonucleotides // *Tetrahedron Lett.* — 1996. — Vol. 37, No 47. — P. 8467-8470.

40. *Casale R., McLaughlin L.W.* Synthesis and properties of oligodeoxynucleotides containing a polycyclic aromatic hydrocarbon site specifically bound to the N2 amino group of a 2'-deoxyguanosine residue // *J. Am. Chem. Soc.* — 1990. — Vol. 112, No 13. — P. 5264-5271.

41. *Yamana K., Aota R., Nakano H.* Oligonucleotides having covalently linked anthracene at specific sugar residue: differential binding to DNA and RNA and fluorescent properties // *Tetrahedron Lett.* — 1995. — Vol. 36, No 46. — P. 8427-8430.

42. *Christensen U.B., Wamberg M., El-Essawy F.A.G., Ismail A.E.-H., Nielsen C.B., Filichev V.V., Jessen C.H., Petersen M., Pedersen E.B.* Intercalating nucleic acids: the influence of linker length and intercalator type on their duplex stabilities // *Nucleosides Nucleotides.* — 2004. — Vol. 23, No 1-2. — P. 207-225.

43. *Mori K., Subasinghe C., Cohen J.S.* Oligodeoxynucleotide analogs with 5'-linked anthraquinone // *FEBS Lett.* — 1989. — Vol. 249, No 2. — P. 213-218.

44. *Yamana K., Nishijima Y., Ikeda T., Gokota T., Ozaki H., Nakano H., Sangen O., Shimidzu T.* Synthesis and interactive properties of an oligonucleotide with anthraquinone at the sugar fragment // *Bioconjugate Chem.* — 1990. — Vol. 1, No 5. — P. 319-324.

45. *Yamana K., Mitsui T., Yoshioka J., Isuno T., Nakano H.* Incorporation of two anthraquinonylmethyl groups into the 2'-positions of oligonucleotides: increased affinity and sequence specificity of anthraquinone-modified oligonucleotides in hybrid formation with DNA and RNA // *Bioconjugate Chem.* — 1996. — Vol. 7, No 6. — P. 715-720.

46. *Whittemore N.A., Mullenix A.N., Inamati C.B., Manoharan M., Dan Cook P., Tuinman A.A., Baker D.C., Chambers J.Q.* Synthesis and electrochemistry of anthraquinone-oligodeoxynucleotide conjugate // *Bioconjugate Chem.* — 1999. — Vol. 10, No 2. — P. 261-270.

47. *Moriguchi T., Sekiguchi H., Tachibana M., Shinozuka K.* Synthesis and duplex-forming property of oligonucleotides bearing a novel polyamine-modified intercalator at the terminal or the internal position // *Nucleosides Nucleotides.* — 2006. — Vol. 25, No 4-6. — P. 601-612.

48. *Telser J., Kruickshank K.A., Morrison L.E., Netzel T.L.* Synthesis and characterization of DNA oligomers and duplexes containing covalently attached molecular labels: comparison of biotin, fluorescein and pyrene labels by thermodynamic and optical spectroscopic measurements // *J. Am. Chem. Soc.* — 1989. — Vol. 111, No 18. — P. 6966-6976.

49. *Yamana K., Ohashi Y., Nunota K., Kitamura M., Nakano H., Sangen O., Shimidzu T.* Synthesis of oligonucleotide derivatives with pyrene group at sugar fragment // *Tetrahedron Lett.* — 1991. — Vol. 32, No 44. — P. 6347-6351.

50. *Yamana K., Kumamoto S., Nakano H.* Homopyrimidine oligonucleotides modified by a pyrenylmethyl group at the terminal position: enhanced fluorescence upon binding to double helical DNA // *Chem. Lett.* — 1997. — Vol. 26, No 11. — P. 1173-1174.

51. *Yamana K., Zako H., Asazuma K., Iwase R., Nakano H., Murakami A.* Fluorescence detection of specific RNA sequences using 2'-pyrene modified oligoribonucleotides // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2001. — Vol. 40, No 6. — P. 1104-1106.

52. *Yamana K., Iwai T., Ohtani Y., Sato S., Nakamura M., Nakano H.* Bis-pyrene-labeled oligonucleotides: sequence specificity of excimer and monomer fluorescence changes upon hybridization with DNA // *Bioconjugate Chem.* — 2002. — Vol. 13, No 6. — P. 1266-1273.

53. *Christensen U.B., Pedersen E.B.* Intercalating nucleic acids containing insertions of 1-O-(1-pyrenylmethyl)glycerol: stabilisation of dsDNA and discrimination of DNA over RNA // *Nucleic Acids Res.* — 2002. — Vol. 30, No 22. — P. 4918-4925.

54. *Christensen U.B., Pedersen E.B.* Intercalating nucleic acids with pyrene nucleotide analogues as next-nearest neighbors for excimer fluorescence detection of single-point mutations under nonstringent hybridization conditions // *Helv. Chim. Acta.* — 2003. — Vol. 86, No 6. — P. 2090-2097.

55. *Filichev V.V., Vester B., Hansen L.H., Pedersen E.B.* Easily denaturing nucleic acids derived from intercalating nucleic acids: thermal stability studies, dual duplex

invasion and inhibition of transcription start // *Nucleic Acids Res.* — 2005. — Vol. 33, No 22. — P. 7129-7137.

56. *Rex X.-F.R., Chaudhuri N.C., Paris P.L., Rumney S., Kool E.T.* Naphthalene, phenanthrene and pyrene as DNA base analogues: synthesis, structure, and fluorescence in DNA // *J. Am. Chem. Soc.* — 1996. — Vol. 118, No 33. — P. 7671-7678.

57. *Sovenyhazi K.M., Bordelon J.A., Petty J.T.* Spectroscopic studies of the multiple binding modes of a trimethine-bridged cyanine dye with DNA // *Nucleic Acids Res.* — 2003. — Vol. 31, No 10. — P. 2561-2569.

58. *B.A. Armitage.* Cyanine dyes-DNA interactions: intercalation, groove binding, and aggregation // In: *DNA Binders and Related Subjects* (Ed. by Waring M.J., Chaires J.B.). *Topics in Current Chemistry*, Vol. 253. — Springer: Berlin — Heidelberg, 2005. — P. 55-76.

59. *Yarmoluk S.M., Kovalska V.B., Kovtun Yu.P.* Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 5. Towards model of «half-intercalation» of monomethylene cyanine dyes into double-stranded nucleic acids // *Биополимеры и клетка.* — 1999. — Т. 15, № 1. — С. 75-82.

60. *Yarmoluk S.M., Lukashov S.S., Ogul'chansky T.Yu., Losytskiy M.Yu., Korniyushyna O.S.* Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XXI. Arguments for half-intercalation model of interaction // *Biopolymers.* — 2001. — Vol. 62, No 4. — P. 219-227.

61. *Ogul'chansky T.Yu., Losytskiy M.Yu., Kovalska V.B., Yashchuk V.M., Yarmoluk S.M.* Interactions of cyanine dyes with nucleic acids. XXIV. Aggregation of monomethylene cyanine dyes in presence of DNA and its manifestation in absorption and fluorescence spectra // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* — 2001. — Vol. 57, No 7. — P. 1525-1532.

62. *Mikelsons L., Carra C., Shaw M., Schweitzer C., Scaiano J.C.* Experimental and theoretical study of the interaction of single-stranded DNA homopolymers and a monomethylene cyanine dye: nature of specific binding // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2005. — Vol. 4, No 10. — P. 798-802.

63. *Zang H., Gates K.S.* DNA binding and alkylation by the «left half» of azinomycin B. *Biochemistry.* — 2000. — Vol. 39, No 48. — P. 14968-14975.

64. *Sari M.A., Battioni J.P., Dupre D., Mansuy D., Le Pecq J.B.* Interaction of cationic porphyrins with DNA: importance of the number and position of the charges and minimum structural requirements for intercalation // *Biochemistry.* — 1990. — Vol. 29, No 17. — P. 4205-4215.

65. *Haughland R.P.* Handbook of fluorescence probes and research chemicals // *Molecular Probes*: Eugene, OR, 1996. — 679 pp.

66. *Petersen M., Hamed A.A., Pedersen E.B., Jacobsen J.P.* Bis-intercalation of homodimeric Thiazole Orange dye derivatives in DNA // *Bioconjugate Chem.* — 1999. — Vol. 10, No 1. — P. 66-74.

67. *Privat E., Asseline U.* Synthesis and binding properties of oligo-2'-deoxynucleotides covalently linked to a thiazole orange derivative // *Bioconjugate Chem.* — 2001. — Vol. 12, No 5. — P. 757-769.

68. *Wang X., Krull U.J.* Tethered thiazole orange intercalating dye for development of fibre-optic nucleic acid biosensors // *Anal. Chim. Acta.* — 2002. — Vol. 470, No 1. — P. 57-70.

69. *Ishiguro T., Saitoh J., Yawata H., Otsuka M., Inoue T., Sugiura Y.* Fluorescence detection of specific sequence of nucleic acid by oxazole yellow-linked oligonucleotides. Homogeneous quantitative monitoring of *in vitro* tran-

scription // *Nucleic Acids Res.* — 1996. — Vol. 24, No 24. — P. 4992-4997.

70. *Inoue T., Sugiura Y., Saitoh J., Ishiguro T., Otsuka M.* Fluorescence property of oxazole yellow-linked oligonucleotide. Triple helix formation and photocleavage of double-stranded DNA in the presence of spermine // *Bioorg. Med. Chem.* — 1999. — Vol. 7, No 6. — P. 1207-1211.

71. *Yu H., Chao J., Patek D., Mujumdar R., Mujumdar S., Waggoner A.S.* Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes // *Nucleic Acids Res.* — 1994. — Vol. 22, No 15. — P. 3226-3232.

72. *Yarmoluk S.M., Kostenko A.M., Kornushyna O.S., Dubey I.Y.* Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. 4. Efficient 5'-fluorescent labelling of oligonucleotides with monomethylene pyrylium cyanine dye Cyan 39 // *Биополимеры и клетка.* — 1998. — Т. 14, № 1. — С. 82-86.

73. *Yarmoluk S.M., Kostenko A.M., Dubey I.Y.* Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. Part 19. New method for the covalent labeling of oligonucleotides with pyrylium cyanine dyes // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2000. — Vol. 10, No 19. — P. 2201-2204.

74. *Pitner J.B., Mize P.D., Linn C.P.* Synthesis and fluorescence properties of covalent thiazole orange-oligonucleotide conjugates // *3<sup>rd</sup> Int. Symp. on Functional Dyes* (July 16-21, 1995). — Santa Cruz, CA, 1995. — P. 52.

75. *Rye H.S., Quesada M.A., Peck K., Mathies R.A., Glazer A.N.* High-sensitivity two-color detection of double-stranded DNA with a confocal fluorescence gel scanner using ethidium homodimer and thiazole orange // *Nucleic Acids Res.* — 1991. — Vol. 19, No 2. — P. 327-333.

76. *Svanvik N., Westmen G., Wang D., Kubista M.* Light-up probes: thiazole orange conjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogeneous solution // *Anal. Biochem.* — 2000. — Vol. 281, No 1. — P. 26-35.

77. *Isacson J., Cao I., Ohlson L., Nordgren S., Svanvik N., Westmen G., Kubista M., Sjoback R., Sehlstedt U.* Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes // *Mol. Cell Probes.* — 2000. — Vol. 17. — P. 321-328.

78. *Svanvik N., Nygren J., Westmen G., Kubista M.* Free-probe fluorescence of light-up probes // *J. Am. Chem. Soc.* — 2001. — Vol. 123, No 5. — P. 802-809.

79. *Fiel R.J.* Porphyrin-nucleic acid interactions: a review // *J. Biomol. Struct. Dyn.* — 1989. — Vol. 6, No 6. — P. 1259-1274.

80. *Carvlin M.J., Fiel R.J.* Intercalative and nonintercalative binding of large cationic porphyrin ligands to calf thymus DNA // *Nucleic Acids Res.* — 1983. — Vol. 11, No 17. — P. 6121-6139.

81. *Sigman D.S., Mazumder A., Perrin D.M.* Chemical nucleases // *Chem. Rev.* — 1993. — Vol. 93, No 6. — P. 2295-2316.

82. *Pratviel G., Bernadou J., Meunier B.* Carbon-hydrogen bonds of DNA sugar units as targets for chemical nucleases and drugs // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 1995. — Vol. 34, No 7. — P. 746-769.

83. *Ghazaryan A.A., Dalyan Y.B., Haroutiunian S.G., Tikhomirova A., Taulier N., Wells J.W., Chalikian T.V.* Thermodynamics of interactions of water-soluble porphyrins with RNA duplexes // *J. Am. Chem. Soc.* — 2006. — Vol. 128, No 6. — P. 1914-1921.

84. *Croke D.T., Perrouault L., Sari M.A., Battioni J.P., Mansuy D., Helene C., Le Doan T.* Structure-activity



- relationships for DNA photocleavage by cationic porphyrins // *J. Photochem. Photobiol. B.* — 1993. — Vol. 18, No 1. — P. 41-50.
85. Zupan K., Herenyi L., Toth K., Egyeki M., Csik G. Binding of cationic porphyrin to isolated DNA and nucleoprotein complex: quantitative analysis of binding forms under various experimental conditions // *Biochemistry.* — 2005. — Vol. 44, No 45. — P. 15000-15006.
86. Casas C., Lacey C.J., Meunier B. Preparation of hybrid «DNA cleaver oligonucleotide» molecules based on a metallotris(methylpyridinio)porphyrin motif // *Bioconjugate Chem.* — 1993. — Vol. 4, No 5. — P. 366-371.
87. Li H., Fedorova O.S., Trumble W.R., Fletcher T.R., Czuchajowski L. Site-specific photomodification of DNA by porphyrin-oligonucleotide conjugates synthesized via a solid phase H-phosphonate approach // *Bioconjugate Chem.* — 1997. — Vol. 8, No 1. — P. 49-56.
88. Dubey I., Pratiel G., Meunier B. Preparation of cationic non-metallated- or zinc-porphyrin-oligonucleotide fluorescent conjugates // *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris.* — Ser. IIC. — 1998. — Vol. 1, No 4. — P. 259-267.
89. Dubey I., Pratiel G., Meunier B. Synthesis and DNA cleavage of 2'-O-amino-linked metalloporphyrin-oligonucleotide conjugates // *J. Chem. Soc. Perkin 1.* — 2000. — No 18. — P. 3088-3095.
90. Balaz M., Li B.C., Steinkruger J.D., Ellestad G.A., Nakanishi K., Berova N. Porphyrins conjugated to DNA as CD reporters of the salt-induced B to Z-DNA transition // *Org. Biomol. Chem.* — 2006. — Vol. 4, No 10. — P. 1865-1967.
91. Frederick C.A., Williams L.D., Ughetto G., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A., Wang A.H. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin // *Biochemistry.* — 1990. — Vol. 29, No 10. — P. 2538-2549.
92. Chaires J.B., Satyanarayana S., Suh D., Fokt I., Przewloka T., Priebe W. Parsing the free energy of anthracycline antibiotic binding to DNA // *Biochemistry.* — 1996. — Vol. 35, No 7. — P. 2047-2053.
93. Garbesi A., Bonazzi S., Zanella S., Capobianco M.L., Giannini G., Arcamone F. Synthesis and binding properties of conjugates between oligodeoxynucleotides and daunorubicin derivatives // *Nucleic Acids Res.* — 1997. — Vol. 25, No 11. — P. 2121-2128.
94. Carbone G.M., McGuffie E., Napoli S., Flanagan C.E., Dembech C., Negri U., Arcamone F., Capobianco M.L., Catapano C.V. DNA binding and antigene activity of a daunomycin-conjugated triplex-forming oligonucleotide targeting the P2 promoter of the human *c-myc* gene // *Nucleic Acids Res.* — 2004. — Vol. 32, No 8. — P. 2396-2410.
95. Capobianco M.L., De Champdore M., Arcamone F., Garbesi A., Gulanvarch D., Arimondo P.B. Improved synthesis of daunomycin conjugates with triplex-forming oligonucleotides. The polypurine tract of HIV-1 as a target // *Bioorg. Med. Chem.* — 2005. — Vol. 13, No 9. — P. 3209-3218.
96. Napoli S., Negri U., Arcamone F., Capobianco M.L., Carbone G.M., Catapano C.V. Growth inhibition and apoptosis induced by daunomycin-conjugated triplex-forming oligonucleotides targeting the *c-myc* gene in prostate cancer cells // *Nucleic Acids Res.* — 2006. — Vol. 34, No 2. — P. 734-744.
97. Ren Y., Wei D., Liu J., Su W. An antisense oligodeoxynucleotide-doxorubicin conjugate: preparation and its reversal multidrug resistance of human carcinoma cell line *in vitro* // *Nucleosides Nucleotides.* — 2004. — Vol. 23, No 10. — P. 1595-1607.
98. Makitruk V.L., Yarmoluk S.N., Shalamay A.S., Alexeeva I.V. Oligonucleotides modified with phenazine derivatives // *Nucleic Acids. Res. Symp. Ser.* — 1991. — No 24. — P. 244.
99. Зозуля В.М., Благой Ю.П., Дубей І.Я., Федоряк О.Д., Щербаківа А.С., Федоряк Д.М. Стабілізація дуплексних та триплексних комплексів оліготимідилату ковалентно приєднаним глікозидом імідазофеназину // *Биополимеры и клетка.* — 1998. — Т. 14, № 1. — С. 54-61.
100. Макітрук В.Л., Шаламай А.С., Дубей І.Я., Федоряк Д.М. Синтез та вивчення антисенсових олігонуклеотидів, модифікованих імідазофеназиновими нуклеозидами // *Биополимеры и клетка.* — 1999. — Т. 15, № 5. — С. 367-373.
101. Zozulya V., Shcherbakova A., Dubey I. Calculating helix-to-coil transitions of duplexes formed by phenazine-conjugated oligonucleotide, using fluorescence melting data // *J. Fluorescence.* — 2000. — Vol. 10, No 1. — P. 49-53.
102. Zozulya V., Blagoi Yu., Dubey I., Fedoryak D., Makitruk V., Ryazanova O., Shcherbakova A. Anchorage of an oligonucleotide hybridization by a tethered phenazine nucleoside analogue // *Biopolymers-Biospectroscopy.* — 2003. — Vol. 72, No 4. — P. 264-273.
103. Zozulya V., Blagoi Yu., Lober G., Voloshin I., Winter S., Makitruk V., Shalamay A. Fluorescence and binding properties of phenazine derivatives in complexes with polynucleotides of various base composition and secondary structure // *Biophys. Chem.* — 1997. — Vol. 65, No 1. — P. 55-63.
104. Бабичев В.В., Скрипаль І.Г., Безуглий С.В., Панченко Л.П., Шаламай А.С., Макітрук В.Л., Гончаренко В.С., Шимко Н.Н. Олигодезоксирибонуклеотиди, комплементарні участкам рибосомального оперона молликутов, як інгібітори транскрипції *in vitro* // *Мікробіол. журн.* — 1993. — Т. 55, № 6. — С. 29-35.
105. Коробкова Е.С., Панченко Л.П., Шаламай А.С., Скрипаль І.Г. Спосібність олигодезоксирибонуклеотидів, комплементарних 3'-концевому участку 16S-рРНК молликутов, подавляти трансляцію на їх рибосомах *in vitro* // *Мікробіол. журн.* — 1995. — Т. 57, № 3. — С. 30-36.
106. Skripal I.G., Babichev V.V., Panchenko L.P., Egorov O.V., Korobkova K.S., Dubey I.Y., Fedoryak D.M., Shalamay A.S. Antisignature oligonucleotides and their analogs as inhibitors of mollicutes — cofactors of HIV // *Мікробіол. журн.* — 1997. — Т. 59, № 2. — С. 3-11.
107. Kool E.T. Replacing the nucleobases in DNA with designer molecules. *Acc. Chem. Res.* — 2002. — Vol. 35, No 11. — P. 936-943.
108. Lin K.-Y., Jones R.J., Matteucci M. Tricyclic 2'-deoxycytidine analog: synthesis and incorporation into oligodeoxynucleotides which have enhanced binding to complementary RNA // *J. Am. Chem. Soc.* — 1995. — Vol. 117, No 13. — P. 3873-3874.
109. Matteucci M.D., von Krosigk U. Hybridization properties of oligonucleotides bearing a tricyclic 2'-deoxycytidine analog based on carbazole ring system // *Tetrahedron Lett.* — 1996. — Vol. 37, No 29. — P. 5057-5060.
110. Flanagan W.M., Wagner R.W., Grant D., Lin K.-Y., Matteucci M.D. Cellular penetration and antisense activity by a phenoxazine-substituted heptanucleotide // *Nature Biotechnol.* — 1999. — Vol. 17, No 1. — P. 48-52.
111. Jenkins Y., Barton J.K. A sequence-specific mol-

ecule light switch: tethering of oligonucleotide to a dipyrrophenazine complex of ruthenium (II) // *J. Am. Chem. Soc.* — 1992. — Vol. 114, No 22. — P. 8736-8738.

112. *Holmlin P.E., Dandliker P.J., Barton J.K.* Synthesis of metallointercalator-DNA conjugates on a solid support // *Bioconjugate Chem.* — 1999. — Vol. 10, No 6. — P. 1122-1130.

113. *Grimm G.N., Boutorine A.S., Lincoln P., Helene C.* Design and simple routes of oligonucleotide conjugates for studies of DNA triple helix formation // *Nucleosides Nucleotides.* — 2001. — Vol. 20, No 4-7. — P. 909-914.

114. *Rack J.J.* Electron transfer in DNA // *ChemTracts — Inorg. Chem.* — 1997. — Vol. 10, No 7. — P. 555-570.

115. *Chan P.P., Glazer P.M.* Triplex DNA: fundamentals, advances, and potential applications for gene therapy // *J. Mol. Med.* — 1997. — Vol. 75, No 4. — P. 267-282.

116. *Praseuth D., Guiteysse A.L., Helene C.* Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1999. — Vol. 1489, No 1. — P. 181-206.

117. *Casey B.P., Glazer P.M.* Gene targeting via triple-helix formation // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* — 2001. — Vol. 67. — P. 163-192.

118. *Faria M., Giovannangeli C.* Triplex-forming molecules: from concepts to applications // *J. Gene Med.* — 2001. — Vol. 3, No 4. — P. 299-310.

119. *Fox K.R., Darby R.A.J.* Triple helix-specific ligands // In: *Small molecule DNA and RNA binders* (Ed. by Demeunynck M., Bailly C., Wilson W.D.). — Wiley-VCH Verlag: Berlin, 2004, Vol. 2. — P. 360-383.

120. *Besch R., Giovannangeli C., Degitz K.* Triplex-forming oligonucleotides — Sequence-specific DNA ligands as tools for gene inhibition and for modulation of DNA-associated functions // *Curr. Drug Targ.* — 2004. — Vol. 5, No 8. — P. 691-703.

121. *Escude C., Sun J.-S.* DNA major groove binders: triple helix-forming oligonucleotides, triple helix-specific DNA ligands and cleaving agents // In: *Topics Curr. Chem.*—Springer: Berlin-Heidelberg, 2005, Vol. 253. — P. 109-148.

122. *Bower M., Summers M.F., Powell C., Shinozuka K., Regan J.B., Zon G., Wilson W.D.* Oligodeoxyribonucleotide

methylphosphonates. NMR and UV spectroscopic studies of R<sub>p</sub>-R<sub>p</sub> and R<sub>p</sub>-S<sub>p</sub> methylphosphonate (Me) modified duplexes of {d[GGAATTCC]}<sub>2</sub> // *Nucleic Acids Res.* — 1987. — Vol. 15, No 12. — P. 4915-4930.

123. *Letsinger R.L., Bach S.A., Eadie J.* Effects of pendant groups on phosphorus on binding properties of d-ApA analogues // *Nucleic Acids Res.* — 1986. — Vol. 14, N 8. — P. 3487-3499.

124. *Asseline U., Thuong N.T.* Oligothymidylates substitués par un dérivé de l'acridine en position 5', à la fois en position 5' et 3' ou sur phosphate internucleotidique // *Nucleosides Nucleotides.* — 1988. — Vol. 7. — P. 431-455.

125. *Boidot-Forget M., Chassignol M., Takasugi M., Thuong N.T., Helene C.* Site-specific cleavage of single-stranded and double-stranded DNA sequences by oligodeoxyribonucleotides covalently linked to an intercalating agent and an EDTA-Fe chelate // *Gene.* — 1988. — Vol. 72, No 1-2. — P. 361-371.

126. *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.* Synthesis of alkylating oligonucleotide derivatives containing cholesterol or phenazinium residues at their 3'-terminus and their interaction with DNA within mammalian cells // *FEBS Lett.* — 1989. — Vol. 254, No 1-2. — P. 129-132.

127. *Cazenave C., Loreau N., Thuong N.T., Toulme J.J., Helene C.* Enzymatic amplification of translation inhibition of rabbit β-globin mRNA mediated by antimessenger oligodeoxynucleotides covalently linked to intercalating agents // *Nucleic Acids Res.* — 1987. — Vol. 15, No 12. — P. 4717-4735.

128. *Zerial A., Thuong N.T., Helene C.* Selective inhibition of the cythopathic effect of type A influenza viruses by oligodeoxynucleotides covalently linked to an intercalating agent // *Nucleic Acids Res.* — 1987. — Vol. 15, No 23. — P. 9909-9919.

129. *Gao W., Stein C.A., Cohen J.S., Dutchman G.E., Cheng Y.C.* Effect of phosphorothioate homooligodeoxynucleotides on herpes simplex virus type 2-induced DNA polymerase // *J. Biol. Chem.* — 1989. — Vol. 264, No 19. — P. 11521-11526.