

Нові реагенти для модифікації олігонуклеотидів імідазофеназином

І.Я. Дубей, Д.М. Федоряк¹

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

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

Резюме. Описано синтез нових реагентів для модифікації олігонуклеотидів інтеркалятором імідазо[4,5-*b*]феназином. Похідні імідазофеназину **5** і **8** одержували алкілуванням гетероциклу бромалкільним реагентом — етилбромпропіонатом та бромбутилацетатом — із наступним деблокуванням та, у випадку реагенту **8**, фосфорилуванням. Одержаний карбоксиалкільний реагент **5** може бути використаний для пост-синтетичної модифікації олігонуклеотидів через аміноалкільний лінкер, а *N*-фосфонатний реагент **8** — для прямого твердофазного синтезу 5'-модифікованих олігонуклеотидів.

Ключові слова: імідазофеназин, олігонуклеотиди, інтеркалятори, модифікація, кон'югати.

Вступ. Хімічно модифіковані олігонуклеотиди, які містять ковалентно приєднані залишки інших молекул, сьогодні широко застосовуються в молекулярно-біологічних і медичних дослідженнях та біотехнології. Їх використовують як зонди для визначення ДНК і РНК, праймери для секвенування нуклеїнових кислот та полімеразної ланцюгової реакції, у дослідженнях механізму дії ферментів, як специфічні антисенсові інгібітори експресії генів тощо. Серед модифікованих олігонуклеотидів можна назвати їх кон'югати з флуорофорами, інтеркаляторами, хімічними нуклеазами, ліпофільними молекулами, пептидами, білками та ін. [1-4].

Останнім часом інтенсивно розвивається синтез олігонуклеотидів, ковалентно мічених залишками інтеркаляторів. Цілий ряд інтеркаляторів, серед яких акридин, профлавін, антрацен, антрахінон, етидій, пірен, ціанінові барвники та ін., було ковалентно приєднано до синтетичних олігонуклеотидів у різних поло-

женнях [5, 6]. Приєднання інтеркаляторів до синтетичних олігонуклеотидів значно підвищує стабільність дуплексних та триплексних комплексів таких олігомерів з комплементарними послідовностями нуклеїнових кислот, у результаті чого зростає ефективність взаємодії олігонуклеотиду з його мішенню без помітної втрати специфічності, що особливо важливо для ефективного інгібування генів. Модифіковані інтеркаляторами олігонуклеотиди часто демонструють покращений транспорт у клітину та підвищену стійкість до дії клітинних нуклеаз. Крім того, інтеркалятори, що за своєю структурою є планарними ароматичними системами, як правило, мають флуоресцентні властивості. Тому вони одночасно можуть служити репортерними групами (флуорофорами), а їх кон'югати з олігонуклеотидами можуть бути легко детектовані. Таким чином, олігонуклеотиди, ковалентно модифіковані інтеркаляторами, мають цінні властивості для застосування в молекулярній біології та медицині.

Заритова та ін. вперше одержали кон'югати олігонуклеотидів з *N*-(2-гідроксиетил)феназинєвими групами [7]. Ці групи вводились

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

шляхом окислювального амінування барвника первинною аміногрупою аміноалкіл-модифікованого олігонуклеотиду. Катіонна феназинова гетероциклічна система різко підвищувала стабільність комплементарних комплексів нуклеїнових кислот.

Шаламай зі співр. запропонували вводити в олігонуклеотиди нейтральну поліциклічну основу — імідазо[4,5-*b*]феназин (ImPhz) [8]. Ця похідна феназину водночас близька за структурою до тетрациклічних хромофорів відомих активних антибіотиків-інтеркаляторів ряду дауноміцину. На основі спектрально-флуоресцентних досліджень встановлено, що імідазофеназин взаємодіє з нуклеїновими кислотами за механізмом інтеркаляції, стабілізуючи відповідні дуплекси й триплекси. Для введення цього інтеркалятора в олігонуклеотиди було розроблено підхід, в якому феназозоловий хромофор уводиться в олігонуклеотидний ланцюг, заміщаючи гетероциклічну основу в певному місці нуклеотидної послідовності [9]. Для цього було одержано глікозид імідазофеназину за допомогою реакції силільної конденсації гетероциклу з перацильованою рибозою [10]. Твердофазним Н-фосфонатним методом синтезовано ряд олігонуклеотидів, що містять рибо- й дезоксирибонуклеозиди ImPhz у різних положеннях ланцюга. Серед них як модельні послідовності для вивчення фізико-хімічних властивостей модифікованих олігонуклеотидів, так і олігомери, комплементарні певним ділянкам рибосомальних РНК і рибосомального оперону молюсків [9, 11-16]. Такі олігонуклеотиди виявились ефективними антисенсовими реагентами, що інгібують трансляцію й транскрипцію в модельних системах і клітинах молюсків [14-16] та стабілізують олігонуклеотидні комплекси. Так, 3'-кінцевий залишок ImPhz підвищував температуру плавлення дуплекса міченого (dT)₁₀ із полі(А) чи (dA)₁₅ на 10-12 °С, а триплексних комплексів — з полі(dA)-полі(dT) на 13 °С порівняно з немодифікованим олігомером [11-13, 17]. Основним типом зв'язування нейтрального імідазофеназину з нуклеїновими кислотами є інтеркаляція хромофора, тоді коли у випадку катіонних феназинієвих солей відбувається додаткова електростатична взаємодія з фосфатними групами [17]. Останній тип взаємо-

дії, ймовірно, знижує специфічність упізнання комплементарних нуклеїнових кислот-мішеней олігонуклеотидами, міченими інтеркалятором катіонної природи.

На жаль, синтез нуклеозидів імідазофеназину — достатньо складна багатостадійна процедура. Тому ми вирішили одержати простіші похідні ImPhz для введення цього інтеркалятора в олігонуклеотиди через аліфатичну лінкерну групу. В цій роботі описано хімічний синтез нових реагентів для одержання олігонуклеотидних кон'югатів з імідазо[4,5-*b*]феназином.

Експериментальна частина. В дослідженні використано етиловий ефір 3-бромпропіонової кислоти й 4-бромбутилацетат виробництва Aldrich (США), інші реактиви й розчинники виробництва «Макрохім» і «Хімлаборреактив» (Україна). Абсолютні розчинники одержували в такий спосіб: ацетонітрил почергово переганяли над P₂O₅ та гідридом кальцію, піридин — над КОН, нінгідрином та CaH₂. Диметилформамід переганяли у вакуумі. Колонкову хроматографію проводили на силікагелі Silica gel 60 (Sigma, США), тонкошарову — на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, Німеччина) в системі хлороформ-метанол 9:1. Спектри ¹H ЯМР записували на спектрометрі Bruker AC-250 (250 MHz) у DMSO-d₆ з використанням тетраметилсилану як внутрішнього стандарту. Величини хімічних зсувів наведено в м.д. Electro-spray-мас-спектри (ESI-MS) одержували на мас-спектрометрі API 100 LC/MS (Perkin-Elmer Sciex) із детекцією позитивних іонів. Спектри поглинання записано на спектрофотометрі Specord UV/Vis (Karl Zeiss Jena, Німеччина).

2,3-Діамінофеназин **2** одержали за методом [18]. 3,24 г о-фенілендіаміну (30 ммоль) і 7,62 г йоду (30 ммоль) у 100 мл етанолу нагрівали на киплячій водяній бані зі зворотним холодильником упродовж 6 год. Основну частину розчинника відганяли, до залишку додавали 100 мл води та концентрований аміак до рН 10. Осад відфільтровували, промивали водою і розчиняли в 10 % HCl (100 мл). Нерозчинний матеріал відфільтровували, продукт осаджували з фільтрату додаванням NH₄OH, промивали водою (3x50 мл) та висушували. Вихід 2,80 г (89 %) червонувато-коричневого порош-

ку. Продукт використовували на наступній стадії без додаткової очистки.

Імідазо[4,5-*b*]феназин **3** синтезували модифікованим методом [19]. 2,70 г 2,3-діамінофеназину **2** (12,9 ммоль) та 35 мл 80% НСООН нагрівали на киплячій водяній бані протягом 3 год. Після охолодження реакційної суміші повільно додавали 10 % NaOH до рН 7. Осад відфільтровували, розчиняли в 10% HCl, продукт переосаджували концентрованим аміаком. Імідазофеназин кілька разів промивали водою, висушували й перекристалізували з етанолу з активованим вугіллем. Продукт висушували за 120 °С (5 год). Вихід 1,08 г (38 %). Золотисті кристали зі слабкою жовтою флуоресценцією. Аналітичний зразок додатково очищали хроматографією на силікагелі. Колонку промивали 5 % MeOH у хлороформі, продукт змивали 10 % метанолу в СНCl₃, після упарювання відповідних фракцій продукт **3** кристалізували з етанолу. R_f 0,45. Обчислено для C₁₃H₈N₄: N 25,44 %. Знайдено: N 25,41 %.

Етил-3-(*N*1-імідазо[4,5-*b*]феназил)пропіонат **4**. Імідазофеназин **3** (80 мг, 0,36 ммоль), порошокподібні карбонат калію (70 мг, 0,5 ммоль) і йодид калію (66 мг, 0,4 ммоль) перемішували в 2 мл ДМФ із 64 мкл (0,5 ммоль) етилового ефіру 3-бромпропіонової кислоти за кімнатної температури. Через 24 год знову додавали 0,2 ммоль (26 мкл) етилбромпропіонату та продовжували перемішування ще 12 год. Неорганічні солі відфільтровували, а фільтрат упарювали у вакуумі. Продукт очищали хроматографією на силікагелі в градієнті концентрації 0-2 % метанолу в хлороформі. Вихід 94 мг (81 %) коричнювато-жовтого порошку. R_f 0,72. ¹H ЯМР: δ 8,86 (s, 1H, H-Im), 8,64 (s, 1H, Ar), 8,62 (s, 1H, Ar), 8,30-8,45 (m, 2H, Ar), 7,95-8,05 (m, 2H, Ar), 4,80 (t, 2H, J=6,6 Hz, CH₂-N), 4,14 (q, 2H, J=7,0 Hz, CH₂ (Et)), 3,18 (t, 2H, J=6,6 Hz, CH₂-CO), 1,21 (t, 3H, J=7,0 Hz, CH₃ (Et)). ESI-MS: *m/z* 342,9 [(M+Na)⁺], 321,0 [(M+H)⁺], 292,8 [(M-Et+2H)⁺].

3-(*N*1-Імідазо[4,5-*b*]феназил)пропіонова кислота **5**. Етиловий ефір **4** (80 мг, 0,25 ммоль) розчиняли в 20 мл 0,1 М етанольного розчину NaOH. Через 30 хв ТШХ показала повне перетворення вихідного матеріалу в продукт із низькою рухливістю. Розчин упарювали у вакуумі, залишок розчиняли в 2 мл води, а про-

дукт осаджували обережним додаванням розбавленої HCl. Осад відфільтровували, промивали холодною водою (3x1 мл) і висушували. Вихід 52 мг (71 %) жовтого порошку. R_f 0,07. Кристалізувати продукт не вдалось. ¹H ЯМР: δ 12,6 (br.s., 1H, COOH), 8,85 (s, 1H, H-Im), 8,64 (s, 1H, Ar), 8,62 (s, 1H, Ar), 8,30-8,45 (m, 2H, Ar), 7,95-8,10 (m, 2H, Ar), 4,77 (t, 2H, J=6,6 Hz, CH₂-N), 3,10 (t, 2H, J=6,6 Hz, CH₂-CO). ESI-MS: *m/z* 293,0 [(M+H)⁺].

*N*1-(4-Ацетоксибутил)імідазо[4,5-*b*]феназин **6**. Імідазофеназин **3** (330 мг, 1,5 ммоль) та порошокподібні K₂CO₃ (207 мг, 1,5 ммоль) та KI (249 мг, 1,5 ммоль) перемішували в 5 мл ДМФ із 284 мкл 4-бромбутилацетату (2 ммоль) протягом 24 год за кімнатної температури. Суміш профільтровували, фільтрат упарювали у вакуумі досуха. Після очистки на колонці з силікагелем у градієнті 0-2 % MeOH у хлороформі продукт перекристалізували з бензолу. Вихід жовтих кристалів 378 мг (75 %). T_{пл} 149-151 °С. R_f 0,69. Обчислено для C₁₉H₁₈N₄O₂: N 16,76 %. Знайдено: N 16,92 %. ¹H ЯМР: δ 8,92 (s, 1H, H-Im), 8,66 (s, 1H, Ar), 8,62 (s, 1H, Ar), 8,30-8,40 (m, 2H, Ar), 7,95-8,05 (m, 2H, Ar), 4,59 (t, 2H, J=7,0 Hz, CH₂-N), 4,17 (t, 2H, J=4,7 Hz, CH₂-O), 2,0-2,15 (m, 5H, CH₃ (s, 2,09) + CH₂ внутр.), 1,70-1,85 (m, 2H, CH₂ внутр.). ESI-MS: *m/z* 357,0 [(M+Na)⁺], 335,0 [(M+H)⁺].

*N*1-(4-Гідроксибутил)імідазо[4,5-*b*]феназин **7**. Ацетоксибутильну похідну ImPhz **6** (267 мг, 0,80 ммоль) розчиняли в 15 мл суміші конц. аміак-діоксан (2:1) і витримували 6 год за температури 50 °С. Суміш упарювали у вакуумі й двічі упарювали з етанолом для видалення води. Залишок перекристалізували з бензолу. Вихід жовтого порошку 202 мг (86 %). T_{пл} 158-160 °С. R_f 0,43. ¹H NMR: δ 8,91 (s, 1H, H-Im), 8,65 (s, 1H, Ar), 8,58 (s, 1H, Ar), 8,30-8,40 (m, 2H, Ar), 7,95-8,05 (m, 2H, Ar), 4,62 (t, 1H, J=5,2 Hz, OH), 4,57 (t, 2H, J=7,0 Hz, CH₂-N), 3,56 (q, 2H, J=5,2 Hz, 6,2 Hz, CH₂-O), 2,0-2,15 (m, 2H, CH₂ внутр.), 1,50-1,65 (m, 2H, CH₂ внутр.). ESI-MS: *m/z* 315,1 [(M+Na)⁺], 293,0 [(M+H)⁺].

4-(*N*1-Імідазо[4,5-*b*]феназил)бутил-*H*-фосфонат **8** одержували за модифікованою схемою синтезу нуклеозид-*H*-фосфонатів [20]. 1,2,4-Тріазол (690 мг, 10 ммоль) двічі упарювали з абсолютним піридином і суспендували в 10 мл абсолютного піридину. Додавали 1,1 мл

N-метилморфоліну (10 ммоль), суміш охолоджували до 4-5 °С, додавали при перемішуванні 220 мкл PCl_3 (2,5 ммоль) та витримували за кімнатної температури 30 хв при періодичному перемішуванні. Після цього додавали розчин фосфорилуючого реагенту до 141 мг імідазофеназинової похідної **7** (0,5 ммоль), попередньо упареної з 5 мл абсолютного піридину. Через 30 хв реакційну суміш виливали в 50 мл 0,25 М триетиламонійбікарбонатного буфера (TEAB, рН7.5). Продукт екстрагували хлороформом (3x25 мл), екстракт промивали 0.25 TEAB (10 мл) та водою (10 мл), висушували над Na_2SO_4 й упарювали у вакуумі. Залишок двічі упарювали з толуолом для видалення піридину. Продукт хроматографували на силікагелі. Колонку промивали 5 % метанолу в хлороформі, продукт змивали 10 % MeOH в хлороформі, що містить 1 % триетиламіну. Елюат упарювали, продукт переосажували з хлороформу в гексан, відфільтровували й висушували у вакуумі над P_2O_5 . Одержали 124 мг (вихід 54 %) фосфонату **8** у вигляді триетиламонійної солі. Жовтий порошок, R_f 0,05. ESI-MS: m/z 357,0 $[(M+H)^+]$.

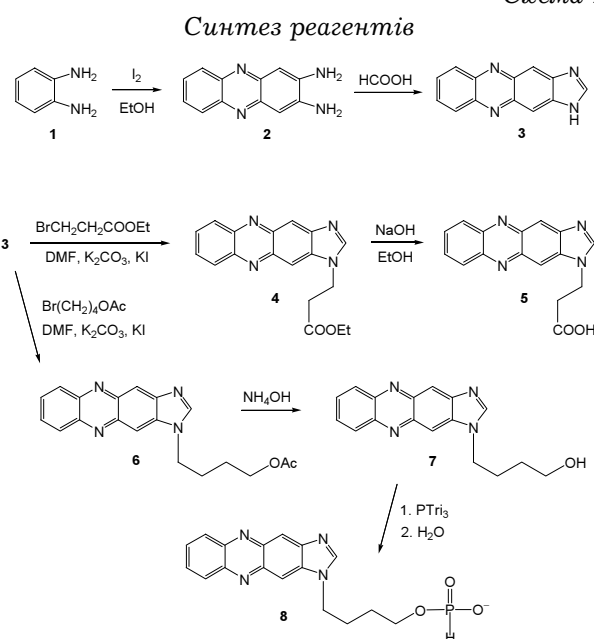
Результати й обговорення. Одержання олігонуклеотидних кон'югатів на сьогодні залишається складною й недостатньо розробленою проблемою. Одним з основних підходів до їх синтезу є попередня функціоналізація олігонуклеотиду аміноалкілним чи меркаптоалкілним лінкером з подальшою реакцією одержаного олігомера з певною реакційноздатною похідною призначеної для кон'югації сполуки, здатною до селективної взаємодії з аміно- чи меркаптогрупою. В іншому варіанті модифікації проводять пряме включення репортерної групи в олігонуклеотид безпосередньо на етапі твердофазного синтезу нуклеотидної послідовності. Для цього застосовують фосфорильовану похідну репортерної молекули, що виступає як аналог нуклеотидного компонента в реакції міжнуклеотидної конденсації. У цьому випадку репортерна молекула повинна бути стійкою в умовах синтезу та деблокування олігонуклеотиду.

Нами одержано похідні імідазофеназину для обох основних методів одержання кон'югатів — реагенти, що містять карбоксильну та N-фосфонатну групи на алкілних лінкерах.

Метод синтезу реагентів представлено на схемі 1. Гетероциклічну систему імідазо[4,5-*b*]феназину синтезували в дві стадії відповідно до раніше описаних методик. Окисленням *o*-фенілендіаміну еквімолярною кількістю йоду одержували 2,3-діамінофеназин **2** [18], який при нагріванні з мурашиною кислотою циклізувався в потрібний феназазоловий гетероцикл [19].

Для введення реакційних груп в імідазофеназинове ядро гетероцикл алкілували відповідними реагентами, а саме бромалкілними похідними, що містять захищену карбоксильну чи гідроксигрупу, — етилбромпропіонатом і бромбутилацетатом. Було знайдено ефективний метод м'якого N1-алкілювання ImPhz. Звичайні методи N-алкілювання імідазолів базуються на реакції алкілгалогенідів з імідазолами в присутності лугів. У нашому випадку такий підхід виглядає малоприйнятним, оскільки алкілюючі реагенти містять основнолабільні складнофірні групи, тому необхідні м'які умови реакції алкілювання. Реакція імідазофеназину з алкілгалогенідами в ДМФ у присутності триетиламіну відбувалася лише при нагріванні, причому утворювалася суміш продуктів і відбувалося значне потемніння реакційної суміші. Однак реакція в ДМФ у присутності потащу як основи та йодиду калію як

Схема 1



Примітка. *Tri* — триазол.

каталізатора виявилась ефективною за кімнатної температури. Цей метод було раніше застосовано нами для О-алкілювання флуоресцеїну [21]. Реакція алкілювання з використанням 1,25-1,5 екв алкілюючого реагенту та 1 екв КІ в цих умовах легко проходить за 24-36 год з утворенням єдиного продукту реакції з вищим, порівняно з вихідним ImPhz, значенням R_f та інтенсивною жовтою флуоресценцією. Характерно, що флуоресценція N-алкільних похідних значно вища, ніж вихідного гетероциклу. Слід відмітити, що для високої ефективності реакції неорганічні солі повинні використовуватись у вигляді тонкодисперсних порошоків. При використанні каталітичної кількості йодиду калію (0,2 екв відносно ImPhz) реакція алкілювання проходить повільніше (до 72 год). Продукти алкілювання **4** та **6** очищали хроматографією на силікагелі та перекристалізацією. Вихід продуктів становив 75-81 %.

Етилпропіонільну похідну імідазофеназину **4** деблокували етанольним NaOH. Одержаний при цьому реагент **5**, що містить карбоксильну групу, достатньо добре розчинний як у розбавлених водних лугах, так і в кислотах, тому для осадження цього продукту реакційну суміш треба нейтралізувати обережно. Карбоксильний реагент **5** може бути використаний для постсинтетичної модифікації олігонуклеотидів через аміноалкільний лінкер. Реагент **5** може взаємодіяти з аліфатичною аміногрупою на біополімері чи то в присутності конденсуючого реагенту (карбодіміди, онієві реагенти та ін.), чи то у вигляді відповідного активованого ефіру, наприклад, оксисукцинімідного. Аміноалкільний лінкер вдається ввести практично в будь-яке положення синтетичного олігонуклеотиду (3'- та 5'-кінці, міжнуклеотидні фосфати, гетероциклічні основи нуклеозидів тощо), і залишок ImPhz за допомогою реагенту **5** можна включити в будь-яке місце олігонуклеотидної послідовності. Методи ж функціоналізації олігонуклеотидів аміноалкільними групами добре розроблені [1-4, 22-25].

При алкілюванні імідазофеназину 4-бромбутилацетатом в аналогічних умовах було одержано похідну **6**, що містить ацетоксибутильну групу. Ацетильну групу відщеплювали амонілізом, а утворений при цьому гідроксибутильний інтермедіат **7** фосфорильовали

тріс(тріазоліл)фосфіном стандартним методом одержання Н-фосфонатів нуклеозидів [20] з деякими модифікаціями. Реакцію фосфорильовання проводили в піридині, оскільки вихідна сполука **7** недостатньо розчинна в ацетонітрилі. Н-фосфонат імідазофеназину **8** очищали хроматографією на силікагелі. При цьому спостерігалась досить помітна неспецифічна сорбція продукту, тому, ймовірно, більш ефективним методом очистки тут могла б виявитись обернено-фазова хроматографія. Реагент **8** може застосовуватись як Р-компонент в синтезі олігонуклеотидів в умовах реакції Н-фосфонатної міжнуклеотидної конденсації, подібно до звичайних нуклеозид-Н-фосфонатів. Було проведено тестове фосфорильовання 3'-бензоїлтимідину реагентом **8** у піридині в присутності півалоїлхлориду як конденсуючого реагенту [20]. Підтверджено ефективне приєднання залишку ImPhz до нуклеозиду (дані будуть опубліковані). Імідазофеназинова гетероциклічна система повністю стійка в умовах амонілізу, що підтверджено обробкою гідроксибутильної похідної **7** концентрованим водним аміаком (24 год за 55 °С). При цьому не спостерігалось і відщеплення N-алкільної лінкерної групи від гетероциклу. Таким чином, Н-фосфонатний реагент **8** може використовуватись для прямого мічення олігонуклеотидів по 5'-кінцю, оскільки він повністю сумісний із досить жорсткими умовами деблокування синтетичних олігонуклеотидів.

Структури одержаних реагентів та інтермедіатів підтверджено за допомогою ЯМР- та мас-спектрометрії, а також елементного аналізу. Для повного віднесення сигналів у спектрах ПМР при необхідності застосовували $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ -гомодекаплінг (ефект Оверхаузера). Так, наприклад, сигнали протонів $\text{CH}_2\text{-N}$ та OH у спектрі сполуки **7** утворюють складний мультиплет, положення індивідуальних сигналів у якому визначали цим методом.

Висновки. Отже, нами одержано два нових реагенти для введення залишку інтеркалятора імідазофеназину в олігонуклеотиди як шляхом пост-синтетичної модифікації, так і прямим включенням репортерної групи під час твердофазного синтезу олігомерів. Зараз проводиться робота із синтезу імідазофеназин-олігонуклеотидних кон'югатів з викорис-

танням цих реагентів. Безумовно, одержані реагенти можна у разі необхідності застосовувати і для ковалентного приєднання залишку ImPhz через NH₂ та OH-групи не лише до олігонуклеотидів, але й до інших біополімерів та низькомолекулярних сполук.

Подяка. Автори вдячні д-ру С. Рішелю (Dr. Suzy Richelme, Service de Spectrométrie de

Masse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France) за запис спектрів ESI-MS. Робота виконана за підтримки УНТЦ (грант № 3172 «Потенційні протиракові агенти, що базуються на взаємодії порфіринів з G-квадруплексами теломерної ДНК»).

Надійшла до редакції 24.10.2006 р.

Novel reagents for oligonucleotide labeling with imidazophenazine

I.Ya. Dubey, D.M. Fedoryak¹

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

¹Institute of Bioorganic and Petroleum Chemistry, NAS of Ukraine
1 Murmanska Str., Kyiv, 02094, Ukraine

Summary. The synthesis of new reagents for the modification of oligonucleotides with intercalating agent imidazo[4,5-*b*]phenazine is described. Imidazophenazine derivatives **5** and **8** were prepared by heterocycle alkylation with protected bromoalkyl reagents, ethyl 3-bromopropionate and 4-bromobutylacetate in the presence of potassium carbonate and iodide, followed by deprotection and, in the case of **8**, phosphorylation. Carboxyalkyl reagent **5** can be used for the post-synthetic oligonucleotide modification via aminoalkyl linker group, whereas H-phosphonate reagent **8** will be useful for the direct solid phase synthesis of 5'-modified oligonucleotides.

Keywords: imidazophenazine, oligonucleotides, intercalators, modification, conjugates.

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. *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.
4. *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.
5. *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.
6. *Дубей І.Я.* Кон'югати олігонуклеотидів з інтеркаляторами: синтез та біологічна активність // *Ukr. Bioorgan. Acta.* — 2006. — Т. 4, № 1. — P. 42-59.
7. *Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Сильников В.Н., Шишкин Г.В.* Модификация нуклеиновых кислот в стабилизированных комплементарных комплексах. I. Синтез алкилирующих производных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих на 5'-конце остаток N-(2-оксиэтил)феназиния // *Биоорг. химия.* — 1986. — Т. 12, № 7. — С. 911-920.
8. *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.
9. *Макитрук 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.
10. *Макитрук В.Л., Шаламай А.С., Кондратюк И.В.* Синтез и изучение рибофуранозидов ряда феназазолов // *Биополимеры и клетка.* — 1997. — Т. 13, № 6. — С. 453-459.
11. *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.
12. *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.
13. *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.
14. *Бабичев В.В., Скрипаль И.Г., Безуглый С.В., Панченко Л.П., Шаламай А.С., Макитрук В.Л., Гончаренко В.С., Шимко Н.Н.* Олигодезоксирибонуклеотиды, комплементарные участкам рибосомального оперона молликутов, как ингибиторы транскрипции *in vitro* // *Мікробіол. журн.* — 1993. — Т. 55, № 6. — С. 29-35.

15. Коробкова Е.С., Панченко Л.П., Шаламай А.С., Скрипаль И.Г. Способность олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарных 3'-концевому участку 16S-рРНК молликутов, подавлять трансляцию на их рибосомах в системе *in vitro* // Мікробіол. журн. — 1995. — Т. 57, № 3. — С. 30-36.
16. 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.
17. 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.
18. Knoevenagel E. Uber die katalytischen Wirkungen des Jods // J. Pract. Chem. [2]. — 1914. — Bd. 89, No 1-2. — S. 1-50.
19. Пенюгалова З.П., Пушкарева З.В., Дунаева Л.В., Дариенко Е.П. Некоторые реакции 2,3-диаминофеназина // Ж. орг. хим. — 1965. — Т. 1, вып. 2. — С. 358-362.
20. Froehler B.C., Ng P.G., Matteucci M.D. Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates // Nucleic Acids Res. — 1986. — Vol. 14, No 13. — P. 5399-5407.
21. Dubey I.Y., Fedoryak O.D., Tkachuk O.M., Fedoryak D.M. Preparation of the fluorescein reagent for solid phase oligonucleotide 5'-labelling and its use for the synthesis of fluorescently labelled PCR primers for HIV-1 detection // Биополимеры и клетка. — 1995. — Т. 11, № 3-4. — С. 35-41.
22. Beaucage S.L., Iyer R.P. The functionalization of oligonucleotides via phosphoramidite derivatives // Tetrahedron. — 1993. — Vol. 49, No 10. — P. 1925-1963.
23. Коршун В.А., Берлин Ю.А. Введение нерадиоактивных репортерных групп в синтетические олигонуклеотиды и их детекция // Биоорг. химия. — 1994. — Т. 20, № 6. — С. 565-616.
24. 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.
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.