

УДК 547.963:577.113.6

СИНТЕЗ КОВАЛЕНТНЫХ КОНЬЮГАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ПЕПТИДАМИ: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ N-ОКСИБЕНЗОТРИАЗОЛОВЫХ ЭФИРОВ

С. А. Кузнецова, Н. В. Сумбатян, К. Мальви*, Ж.-Р. Бертран*, А. Арель-Беллан**, Г. А. Коршунова***, Ф. П. Свиначук*

(кафедра химии природных соединений; e-mail: sumbtyan@genebee.msu.su)

Осуществлен синтез ковалентных конъюгатов олигодезоксирибонуклеотидов с пептидами, которые являются потенциальными ингибиторами и активаторами генной экспрессии. Для получения двух типов ковалентных конъюгатов использован простой и эффективный подход, заключающийся в конденсации в водной среде 3'- или 5'-фосфо-N-оксибензотриазолидов олигонуклеотидов с концевой аминогруппой пептидов. Конъюгаты первого типа содержали в качестве олигонуклеотидного фрагмента антисенсовый олигонуклеотид, 5'-GAACACGCCATGTCCp-3', комплементарный участку мРНК белка оболочки вируса лейкемии мышей *Friend*, а в качестве пептидных фрагментов [Leu⁵]-энкефалин и его [DAla², Ual⁵]-аналог, а также нуклеопептиды на основе δ -орнитиновой цепочки, в которой α -аминофункции орнитина модифицированы пиримидил-1- и пуринил-9-уксусными кислотами, или пиримидил-1- и пуринил-9-аланинами. Конъюгаты второго типа содержали пептиды H-GGG(PADALDDFDLDML)_n-OH, димер ($n = 2$, P₂) и тример ($n = 3$, P₃) активного домена транскрипционного фактора VP16, присоединенные к 3'- или 5'-концу олигонуклеотида 5'-GGAGGAGGAGGAGGGGGAGG-3', образующего прочные тройные комплексы с последовательностью промоторного участка *vrh* гена вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-2).

В последнее десятилетие интенсивно развивается новое направление биотехнологии, связанное с конструированием лекарств на основе синтетических олигонуклеотидов и их аналогов [1, 2]. Для улучшения фармакокинетических свойств олигонуклеотидов, таких как стабильность к действию ферментов нуклеинового обмена, способность проникать через клеточную мембрану и влиять на внутриклеточное распределение [3–5], используют различные подходы, одним из которых является конъюгация с молекулами пептидов [7, 8]. В таких конъюгатах пептидный фрагмент может способствовать проникновению олигонуклеотида через клеточную мембрану [5, 7], его локализации в клеточном ядре [4, 6], может связываться со структурированным фрагментом РНК, в то время как антисенсовый олигонуклеотид образует гибридный комплекс с одноцепочечным фрагментом РНК [9]. Для получения конъюгатов используют несколько типов пептидов: гидрофобные транспортные пептиды, рН чувствительные пептиды, меняющие свою конформацию с изменением рН, положительно заряженные пептиды типа полилизина или сигнальные пептиды [10–13].

Цель настоящего исследования состояла в получении двух типов ковалентных конъюгатов олигонуклеотидов с биологически активными пептидами. Конъюгаты первого типа представляли интерес как потенциальные ингибиторы генной экспрессии. В качестве олигонуклеотидного фрагмента они содержали антисенсовые олигонуклеотиды, комплементарные определенным участкам мРНК белка оболочки вируса лейкемии мышей *Friend*. В качестве

пептидных фрагментов были использованы аналоги энкефалинов, а также нуклеопептиды. Нуклеопептиды представляют собой пептиды, в структуру которых с определенной регулярностью, характерной для нуклеиновых кислот (НК), встроены нуклеиновые основания [14–16]. Наличие нуклеопептидного фрагмента может способствовать улучшению фармакокинетических свойств конъюгата за счет присутствия пептидного остова. Кроме того, нуклеопептидный фрагмент способен дополнительно стабилизировать НК-взаимодействия за счет присутствия нуклеиновых оснований, что позволяет использовать более короткий адресный домен в конъюгате [17, 18].

Принципиально иной подход был использован для конструирования конъюгатов второго типа, способных активировать генную экспрессию. Так, триплексообразующий олигонуклеотид (ТФО) может обеспечивать доставку биологически активного пептида, фрагмента транскрипционного фактора, к узнаваемому участку в ДНК, что будет способствовать образованию специфического продуктивного комплекса ДНК–белок и, как следствие, активации транскрипции гена. ТФО могут специфически связываться с молекулой ДНК, что делает их весьма привлекательными соединениями для ген направленной терапии [19]. ТФО обычно ингибируют биохимические процессы, препятствуя нормальным взаимодействиям между ДНК-мишенью и белковыми факторами [20]. Вместе с тем было показано, что определенным образом структурированные ТФО могут использоваться и для активации генной экспрессии [21]. В конъюгатах второго типа в качестве

* Институт Гюстава Русси, Вильжюиф, 94805, Франция, ** Федеративный институт рака, Вильжюиф, 94801, Франция, *** НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва.

олигонуклеотидной составляющей использовали 20-звенную гомопуриновую последовательность, образующую прочные тройные комплексы с последовательностью промоторного участка врх гена вируса иммунодефицита человека 2 [22], а в качестве пептидной составляющей химерной молекулы использовали синтетические пептиды, содержащие несколько повторов активного домена транскрипционного фактора VP16.

Условия эксперимента

В работе были использованы следующие ферменты и реагенты: Т4-полинуклеотидкиназа без 3'-фосфатазной активности (КФ 2.7.1.78, *new England Biolab*); протеиназа К (*Sigma*); [γ - 32 P]АТФ (*Amersham*); N-оксибензотриазол (НОВt, *Aldrich*); N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимид (EDC, *Sigma*),

Олигодезоксирибонуклеотиды

5'-pGGAGGAGGAGGAGGGGAGG-3' (TFO-5')

и 5'- GGAGGAGGAGGAGGGGAGGp-3' (TFO-3')

были синтезированы на фирме GeNSet (Франция) и очищены в денатурирующем 20%-м полиакриламидном геле (ПААГ).

Олигодезоксирибонуклеотид

5'-GAACACGCCATGTCTGp-3' (ON)

был синтезирован на автоматическом ДНК-синтезаторе «*Applied Biosystems 380 B*» (США) с использованием стандартной амидофосфитной схемы [23].

Пептиды

H-GGG(PADALDDFDLML)₂-OH (P₂)

и H-GGG(PADALDDFDLML)₃-OH (P₃)

были синтезированы на автоматическом пептидном синтезаторе «*Applied Biochemistry 432A*» (*Perkin Elmer*) в Институте Гюстава Русси (Вильжюиф, Франция) с использованием стандартной FMOC-стратегии. Строение исходных пептидов подтверждено с помощью

MALDI-масс-спектрометрии. Нуклеопептиды NPI и TFACNPII были получены твердофазным пептидным синтезом [24], а [Leu⁵]-энкефалин и [DAla²,Ual⁵]-энкефалин – методом активированных эфиров в растворе [25].

3'(5')-Фосфо-N-оксибензотриазоловые эфиры олигодезоксирибонуклеотидов получали в водном буферном растворе, содержащем ДМФА, под действием избытка НОВt и EDC в течение 2,5 ч при 8°, как описано в [26]. После завершения реакции к смеси добавляли 2 М раствор LiClO₄ и осаждали продукт 10 объемами ацетона, пересаживание повторяли трижды.

Синтез ковалентных конъюгатов олигонуклеотидов с пептидами

TFO-P. 1–50 нмоль N-оксибензотриазолового эфира олигонуклеотида TFO-5' или TFO-3' инкубировали с 1,5 ммольями пептида P₂ или P₃ в 5–30 мкл 0,4 М раствора N-метилимидазола (рН 8,0), содержащего 0,2 М NaCl, при 8° в течение 12 ч. Продукты реакции осаждали из реакционной смеси способом, описанным для 3'(5')-фосфо-N-оксибензотриазоловых эфиров олигодезоксирибонуклеотидов, и выделяли электрофорезом в 10%-м ПААГ, содержащем 7 М мочевины (в качестве буфера применяли 0,05 М трис-боратный буфер (рН 8,5), содержащий 1 мМ натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА)).

ON-[Leu⁵]Enk и ON-[DAla²,Ual⁵]Enk. К 10 нмолям N-оксибензотриазолового эфира олигонуклеотида ON добавляли 10–100-кратный избыток пептида в воде (рН 10–11), смесь выдерживали при 8° в течение 12 ч. Продукты выделяли и очищали так же, как это описано для TFO-P в 20 %-м ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

ON-NPI и ON-TFACNPII получали так же, как ON-[Leu⁵]Enk и ON-[DAla²,Ual⁵]Enk, однако для более полного растворения нуклеопептидов в смесь добавляли 10–20% ДМФА. Продукты выделяли и очищали, как это

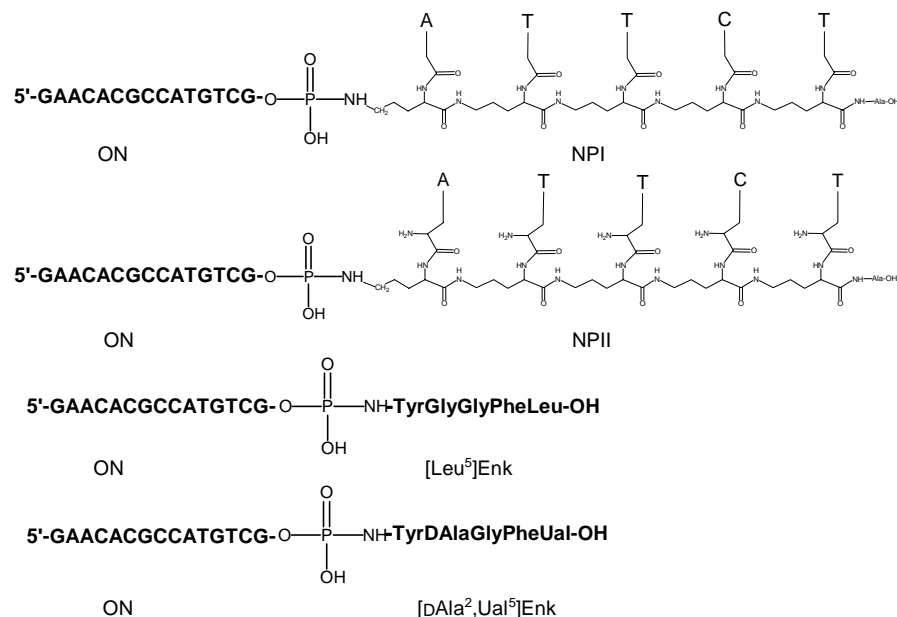


Рис. 1. Структура ковалентных конъюгатов 15-звенного олигодезоксирибонуклеотида (ON), комплементарного области AUG кодона мРНК белка оболочки вируса лейкемии мышей Friend, с нуклеопептидами (NPI и NPII), а также с [Leu⁵]-энкефалином и его аналогом [DAla²,Ual⁵]-энкефалином

нуклеопептиды, такая конструкция узла связи двух компонент химерной молекулы является оптимальной, так как расстояние между нуклеиновыми основаниями соседних концевых звеньев олигонуклеотида и пептида является таковым, что не нарушаются их взаимодействия с соответствующими основаниями в комплементарной цепи. На рис. 1 представлена структура ковалентных конъюгатов 15-звенного олигодезоксирибонуклеотида, комплементарного области AUG кодона мРНК белка оболочки вируса лейкемии мышей *Friend*, с нуклеопептидами (ON-NPI и ON-NPII), а также с [Leu⁵]-энкефалином и его аналогом [DALa²,Ual⁵]-энкефалином (ON-[Leu⁵]ENk и ON-[DALa²,Ual⁵]ENk). Оба нуклеопептида содержат по 5 нуклеиновых оснований (последовательность нуклеиновых оснований, начиная с N-конца: АТТСТ), присоединенных к δ-орнитинному пептидному остову таким образом, что расстояние по пептидному остову между соседними основаниями составляет 6 простых связей. Было показано, что такое расстояние является оптимальным для образования олигонуклеотидными аналогами, не содержащими фосфатного остова, стабильных комплексов с комплементарными олигонуклеотидами [42, 43]. В нуклеопептиде NPI нуклеиновые основания присоединены к α-аминогруппам орнитиновых остатков путем ацилирования последних пиридил-1- и пуринил-9-уксусными кислотами. В нуклеопептиде NPII δ-орнитинный остов модифицирован нуклеоаминокислотами: 3-(тиминил-1)аланином, 3-(цитозинил-1)аланином, 3-(аденил-9)аланином). Конъюгаты ON-[Leu⁵]ENk и ON-[DALa²,Ual⁵]ENk были получены для обработки метода конъюгации олигонуклеотидов с пептидами относительно простого строения и для их использования в качестве контрольных препаратов в физико-химических и биологических экспериментах с конъюгатами, содержащими нуклеопептиды.

Структура ковалентных конъюгатов триплексообразующих олигонуклеотидов с протяженными пептидными молекулами (TFO-P) приведена на рис. 2. В этом случае δ-аминогруппы пептидов также присоединены к 3'- или 5'-концевой фосфатной группе олигонуклеотида, поскольку других нуклеофильных групп, способных взаимодействовать с фосфатной группой олигонуклеотида, пептиды

H-GGG(PADALDDFDLDM_L)₂ (P₂)

и H-GGG(PADALDDFDLDM_L)₃-OH (P₃)

не содержали.

Олигонуклеотиды 5'-GAACACGCCATGTCGp-3' (ON), 5'-pGGAGGAGGAGGAGGGGGAGG-3' (TFO-5') и

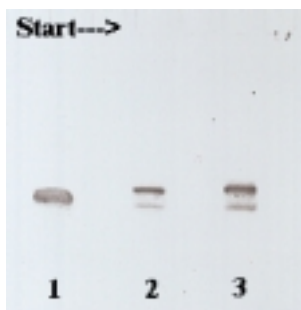


Рис. 3. Электрофореграмма реакционных смесей, образующихся при синтезе ковалентных конъюгатов в 20%-м ПААГ. 1 – 5'-GAACACGCCATGTCGp-3'; 2 – реакционная смесь, образующаяся при синтезе ON-[Leu⁵]ENk; 3 – реакционная смесь, образующаяся при синтезе ON-[DALa²,Ual⁵]ENk

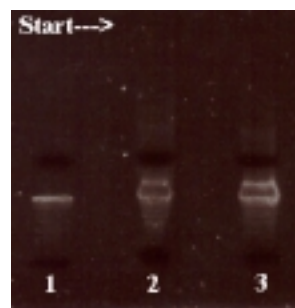


Рис. 4. Электрофореграмма реакционных смесей, образующихся при синтезе ковалентных конъюгатов и нуклеопептидов, ON-NPI и ON-TFACNPII соответственно в 20%-м ПААГ: 1 – исходный олигонуклеотид ON; 2 – реакционная смесь, образующаяся при синтезе ON-NPI; 3 – реакционная смесь, образующаяся при синтезе ON-TFACNPII

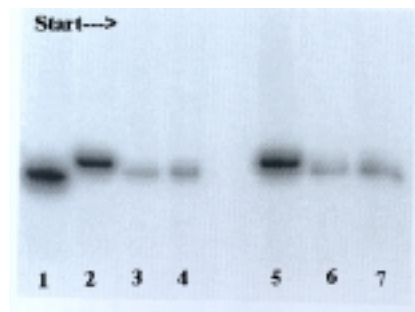


Рис. 5. Радиоавтограф электрофореза в 20%-м денатурирующем ПААГ реакционных смесей, образующихся при обработке ON-NPI и ON-NPII 50%-й уксусной кислотой (50°, 2 ч) и протеиназой К (20 мкг/мл, 37°, 24 ч). 1 – исходный олигонуклеотид 5'-³²P-ON; 2 – ковалентный конъюгат ³²P-ON-NPI; 3, 6 – реакционные смеси, образующиеся при обработке ³²P-ON-NPI и ³²P-ON-NPII 50%-й уксусной кислотой соответственно; 4 – ковалентный конъюгат ³²P-ON-NPII; 5, 7 – реакционные смеси, образующиеся при обработке ³²P-ON-NPI и ³²P-ON-NPII протеиназой К

5'-GGAGGAGGAGGAGGGGGAGGp-3' (TFO-3') были синтезированы стандартным амидофосфитным методом, пептиды P₂ и P₃ синтезированы на автоматическом пептидном синтезаторе с использованием стандартного протокола синтеза. Структура исходных пептидов подтверждена с помощью MALDI-масс-спектрологии. Нуклеопептиды NPI и защищенный по α-аминогруппам нуклеоаминокислотных остатков трифторацетильными группировками TFACNPII были получены твердофазным пептидным синтезом [24], [Leu⁵]-энкефалин и [DALa²,Ual⁵]-энкефалин – методом активированных эфиров в растворе [25].

N-Оксибензотриазоловые эфиры олигонуклеотидов получали, как описано в [26], их выделение из реакционной смеси проводили двукратным осаждением ацетоном из 2M раствора перхлората лития.

Синтез ковалентных конъюгатов олигонуклеотида ON с энкефалином и его аналогом проводили в воде при pH 10–11 в течение 12 ч. На рис. 3 представлена электрофореграмма реакционных смесей ON-[Leu⁵]ENk и ON-[DALa²,Ual⁵]ENk. Продукты отделяли от исходных соединений в 20%-м денатурирующем ПААГ. Выходы ковалентных конъюгатов составили 80 и 50% соответственно.

В аналогичных условиях были получены конъюгаты ON с нуклеопептидами NPI и TFACNPII. Так как нуклеопептиды хуже растворялись в воде, чем энкефали-

ны, на стадии конъюгации в реакционную смесь добавляли 10–20% ДМФА. Однако выходы целевых конъюгатов составили лишь около 10% в обоих случаях, что, по-видимому, связано с плохой растворимостью пептидов и вследствие этого недостаточной концентрацией в растворе пептидного компонента. Электрофореграмма реакционных смесей представлена на рис. 4. После выделения полученного конъюгата ON-TFACNPII α-аминогруппы боковых цепей деблокировали обработкой 0,2 н. водным раствором едкого натра в течение 10 мин. Структуру соединений ON-[Leu⁵]ENk, ON-[DAla²,Ual⁵]ENk, ON-NPI и ON-NPII подтверждали избирательным гидролизом фосфоамидной связи, образующейся между пептидным и олигонуклеотидным фрагментами, 50%-й уксусной кислотой (50°) и протеолизом пептидного фрагмента протеиназой К. На рис. 5 в качестве примера приведен радиоавтограф электрофореза в 20%-м денатурирующем ПААГ реакционных смесей, образующихся при обработке ON-NP и ON-NPII 50%-й уксусной кислотой и протеиназой К. Следует отметить, что нуклеопептиды подвергаются ферментативному расщеплению значительно медленнее, чем пептиды, состоящие из белковых аминокислот, поэтому соответствующие конъюгаты выдерживали с протеиназой К длительное время (до суток). Как видно из рисунка, в результате гидролиза фосфоамидной связи наблюдалось образование исходного олигонуклеотида ON. Структуры полученных конъюгатов ON-[Leu⁵]ENk и ON-[DAla²,Ual⁵]ENk были, кроме того, подтверждены данными MALDI масс-спектрологии: значения масс (рассчитанных и детектируемых) составили 5179,5 и 5180±1,6; 5261,5 и 5262±2,5 соответственно.

Синтез ковалентных конъюгатов TFO-3'-P₂, TFO-3'-P₃, TFO-5'-P₂ и TFO-5'-P₃ проводили в 0,4 М N-метилимидазольном буфере (рН 8,0), содержащем 0,2 М NaCl, при 8° в течение 12 ч, поскольку в отсутствие N-метилимидазола эффективность реакции резко снижалась. Продукты отделяли от исходных соединений в 10%-м денатурирующем ПААГ. Выходы ковалентных конъюгатов составили 10–45% в зависимости от структуры пептида и условий реакции. На рис. 6 приведен радиоавтограф электрофореза реакционной смеси, образующейся при синтезе соединения TFO-5'-P₃. Как и ожидалось, в результате конден-

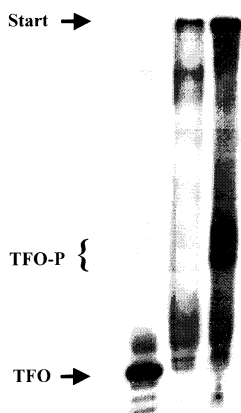


Рис. 6. Радиоавтограф электрофореза в 10%-м ПААГ реакционной смеси, образующейся при синтезе ковалентного конъюгата ³²P-TFO-5' и P₃: 1 – исходный олигонуклеотид ³²P-TFO-5'; 2 – N-оксибензотриазольный эфир 5'-³²P-TFO в условиях проведения конденсации в отсутствие пептида; 3 – реакционная смесь, образующаяся при синтезе TFO-5'-P₃

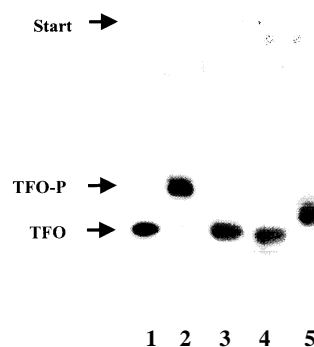


Рис. 7. Радиоавтограф электрофореза в 15%-м денатурирующем ПААГ реакционных смесей, образующихся при обработке ³²P-TFO-3'-P₂ 50%-й уксусной кислотой (50°) и протеиназой К: 1 – исходный олигонуклеотид ³²P-TFO-3'; 2 – ковалентный конъюгат ³²P-TFO-3'-P₂; 3, 4 – реакционные смеси, образующиеся при обработке ³²P-TFO-3'-P₂ 50%-й уксусной кислотой в течение 30 и 120 мин соответственно; 5 – реакционная смесь, образующаяся при обработке ³²P-TFO-3'-P₂ протеиназой К (100 мкг/мл, 60 мин, 40°)

сации наблюдали образование продукта с более низкой электрофоретической подвижностью. Структуру синтезированных конъюгатов подтверждали с помощью MALDI масс-спектрологии. Для соединений TFO-3'-P₂ и TFO-5'-P₃ значения масс (рассчитанных и детектируемых) составили 10991 и 10991±2,26, 9558,5 и 9558±1 соответственно.

Структуру полученных ковалентных конъюгатов TFO-3'-P₂, TFO-3'-P₃, TFO-5'-P₂ и TFO-5'-P₃ подтверждали избирательным гидролизом фосфоамидной связи 50%-й уксусной кислотой (50°) и протеолизом пептидного фрагмента протеиназой К. Как видно из рис. 7, при удалении пептидной части ковалентного конъюгата TFO-3'-P₂ протеиназой К наблюдалось образование продукта с несколько меньшей электрофоретической подвижностью, чем TFO-3', что может происходить вследствие повышенной устойчивости к протеолизу нескольких аминокислот, непосредственно прилегающих к олигонуклеотиду. Следует отметить, что при обработке уксусной кислотой и протеиназой К соединения, находящегося вблизи старта (см. рис. 6) образуются те же продукты, что и при обработке ковалентных конъюгатов TFO-P. Мы полагаем, что это соединение может представлять собой нековалентные комплексы (агрегаты) триплексообразующих олигонуклеотидов TFO и/или TFO-P. Большое количество остатков G и высокий отрицательный заряд пептида свидетельствуют в пользу этой гипотезы.

В физико-химических экспериментах и в опытах *in vitro* была подтверждена способность синтезированных ковалентных конъюгатов TFO-P образовывать триплексы с ДНК-мишенью, проверена внутриклеточная стабильность синтезированных конъюгатов, а также способность активации гена люциферазы. Оказалось, что из четырех синтезированных конъюгатов только TFO-5'-P₃ обладал активирующим действием, значительно увеличивая экспрессию гена люциферазы [44].

Фармакокинетические свойства ковалентных конъюгатов 15-звенного олигодезоксирибонуклеотида, комплементарного области AUG кодона мРНК белка оболочки вируса лейкемии мышей *Friend*, с нуклеопептидами ON-NP I и ON-NP II, а также с [Leu⁵]-энкефалином и его аналогом [DAla²,Ual⁵]-энкефалином (ON-[Leu⁵]ENk и

ON-[DAIa²,Ual⁵]ENk) исследуются в настоящее время в Институте Гюстава Русси (Вильжюиф, Франция).

Таким образом, в настоящей работе разработан простой и эффективный способ конъюгации, заключающийся в конденсации 3'- или 5'-фосфо-N-оксибензотриазолидов олигонуклеотидов с концевой аминогруппой пептидов. Этот подход не требует предварительной защиты большинства функциональных групп биополимеров, синтез протекает в водной среде и является перспективным для получения конъюгатов протяженных олигонуклеотидов и пептидов различного строения и длины, в том числе нуклеопептидов. Хотя недостаточная растворимость отдельных пептидов в воде может ограничивать использование

этого метода, с его помощью синтезирован ряд ковалентных конъюгатов олигонуклеотидов с биологически активными пептидами. Использование разработанного подхода к синтезу ковалентных конъюгатов позволит в будущем существенно расширить спектр потенциальных генетических лекарств и сделает их доступными для последующих фармакологических испытаний.

Авторы благодарят доктора Аллена Деруссана (Институт Гюстава Русси, Вильжюиф, Франция) за проведение масс-спектрометрических анализов. Данная работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 00-04-48312, 00-04-48253 и 00-04-22003), а также гранта Ведущей научной школы 00-15-97944.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zon G. Antisense Research and applications. / Eds. S.T. Crooke. 1993.
- Cook P.D. // Nucl.&Nucl. 1999. **18**. P. 1141.
- Juby C.D., Richardson C.D., Brousseau R. // Tetrahedron Lett. 1991. **32**. P. 879.
- Arar K., Aubertin A.M., Roche A.S., Monsigny M., Mayer M. // Bioconjug. Chem. 1995. **6**. P. 573.
- Pichon C., Arar K., Stewart A.J., Dodon M.D., Gazzolo L., Courtoy P.L., Mayer R., Monsigny M., Roche A.C. // Mol. Pharmacol. 1997. **51**. P. 431.
- Reed M.W., Frada D., Schwartz D.E., Scoller J., Hinrichsen R.D. // Bioconjug. Chem., 1995. **6**. P. 101.
- Soukchareun S., Tregear G.W., Haralambidis J. // Bioconjug. Chem. 1995. **6**. P. 43.
- Derossi D., Chassaing G., Prochiantz A. // Trends in Cell Biol. 1998. **8**. P. 84.
- Tung C.H., Wang J., Leibowitz M.J. // Bioconjug. Chem. 1995. **6**. P. 292.
- Morris M.C., Vidal P., Chaloin L., Heitz F., Divita G. // Nucl. Acids Res. 1997. **25**. P. 2730.
- Pichon C., Freulon I., Midoux P., Mayer R., Monsigny M., Roche A.C. // Antisense Nucl. Acid Drug Dev. 1997. **7**. P. 335.
- Degols G., Leonetti J-P., Benkirane M., Devaux C., Lebleu B. // Antisense Res. Dev. 1992. **2**. P. 293.
- Sebestyen M.G., Ludtke J., Bassik M., Zhang G., Budker V., Lukhanov E.A., Hagstrom J., Wolff J.A. // Nature Biotechnol. 1998. **16**. P. 80.
- Швачкин Ю.П., Мишин Г.П., Кориунова Г.А. // Успехи химии. 1982. **51**. С. 311.
- Korshunova G.A., Plicheva I.A., Sumbatyan N.V., Hyun K. // Letters in Peptide Science. 1997. **4**. P. 473.
- Ичетовкин И.Е., Сумбатян Н.В., Багерзадех Г., Кориунова Г.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Химия. 1997. **38**. С. 120.
- Лудак М.Ю., Раукас Э.Э., Кришане В.Э., Паэгле Р.А., Райм Т.А., Кооли К.Л., Порутере С.Е. // Химия гетероцикл. соед. 1983. **3**. С. 402.
- Семилетов Ю.А., Тяглов Б.В., Пермогоров В.И., Швачкин Ю.П. // ЖОХ. 1981. **51**. С. 230.
- Giovannangeli M., Diviacco S., Labrousse V., Gyasnov S., Charneau P., Helene C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. **94**. P. 79.
- Maher L.J.R. // Cancer Invest. 1996. **14**. P. 66.
- Svinarchuk F., Nagibneva I., Cherny D., Ait-Si-Ali S., Pritchard L.L., Robin P., Malvy C., Harel-Bellan A. // Nucleic Acids Res. 1997. **25**. P. 3459.
- Debin A., Malvy C., Svinarchuk F. // Nucleic Acids Res. 1997. **25**. P. 1965.
- Atkinson T., Smith M. // Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach / Ed. M.J. Gait. Oxford, Washington, 1984. P. 35.
- Sumbatyan N.V., Artsatbanova E.A., Baeva O.V., Hyun K.-C., Kuznetsova S.A., Gottikh M.B., Korshunova G.A. // Nucl.&Nucl. 1999. **18**. P. 1489.
- Рябцева О.Н., Петрова М.Г., Кориунова Г.А., Швачкин Ю.П. // ЖОХ. 1987. **57**. С. 963.
- Gottikh M.B., Asseline U., Tuong, N.T. // Tetrahedron Lett. 1990. **31**. P. 6657.
- Haralambidis J., Duncan L., Treggear G.W. // Tetrahedron Lett. 1987. **28**. P. 5199.
- Lukhtanov E.A., Kutuyavin I.V., Meyer R. // Bioconjug. Chem. 1996. **7**. P. 564.
- Soukchareun S., Tregear G.W., Haralambidis J. // Bioconjug. Chem. 1995. **6**. P. 43.
- Endo M., Azuma Y., Saga Y., Kuzuya A., Kawai G., Komiyama M. // J. Org. Chem. 1997. **62**. P. 846.
- Peyrottes S., Mestre B., Burlina F., Gait M.J. // Tetrahedron. 1998. **54**. P. 12513.
- Harrison J.G., Balasubramanian S. // Nucl. Acids Res. 1998. **26**. P. 3136.
- Tung C.H., Rudolph M.J., Stein S. // Bioconjug. Chem. 1991. **2**. P. 464.
- Svinarchuk F.P., Konevets D.A., Pliasunova O.A., Pokrovsky A.G., Vlassov V.V. // Biochimie. 1993. **75**. P. 49.
- Пышный Д.В., Репкова М.Н., Лохов С.Г. // Биоорган. химия. 1997. **23**. С. 497.
- Shabarova Z.A. // Biochimie. 1988. **70**. P. 1323.
- Исагуляню М.Г., Ивановская М.Г., Потанов В.К., Шабарова З.А. // Биоорган. химия. 1985. **11**. С. 239.
- Ivanovskaya M.G., Gottikh M.B., Shabarova Z.A. // Nucl.&Nucl. 1995. **6**. P. 913.
- Ивановская М.Г., Готтих М.Б., Шабарова З.А. // Доклады Акад. наук СССР. 1987. **293**. С. 477.
- Gilham P.T. // J. Am. Chem Soc. 1962. **84**. P. 687.
- Таран Е.А., Ивановская М.Г., Гайт М., Шабарова З.А. // Молекуляр. биол. 1998. **32**. С. 832.
- Nielsen P.E., Egholm M., Berg R. N., Buchardt O. // Science. 1991. **254**. P. 1497.
- Nielsen P. E., Egholm M., Buchardt O. // Bioconjug. Chem. 1994. **5**. P. 3.
- Kuznetsova S., Ait-Si-Ali S., Troalen F., Le Villain J.-P., Harel-Bellan A., Svinarchuk F. // Nucl. Acids Res. 1999. **27**. P. 3995.