



УДК 577.113.6

© 1990 г.

*М. Б. Готтих, М. Г. Ивановская, Е. А. Скрипкин,
З. А. Шабарова*

КОНСТРУИРОВАНИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, УСТОЙЧИВЫХ К ДЕЙСТВИЮ КЛЕТОЧНЫХ НУКЛЕАЗ

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская научно-исследовательская лаборатория молекулярной
биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Разработана схема синтеза нового типа олигонуклеотидных производных, содержащих одновременно остатки интеркалирующего агента и поликатонного пептида, присоединенные к обеим концевым фосфатным группам олигонуклеотида. Синтезировано производное ундскануклеотида, в котором к 3'-концевой фосфатной группе присоединен остаток антибиотика дауномицина, а к 5'-концевой — остаток полимиксина В₁. Установлено, что это производное значительно более устойчиво к гидролизу клеточными нуклеазами, чем немодифицированный олигонуклеотид, и, кроме того, лучше него сорбируется клетками. Полученное производное планируется использовать для ингибирования экспрессии генов.

В основе нового подхода к лечению инфекционных и онкологических заболеваний путем направленного ингибирования экспрессии определенных генов и избирательной инактивации инфекционных агентов лежит фундаментальное свойство олигонуклеотидов образовывать прочные специфические комплексы с комплементарными им участками нуклеиновых кислот и таким образом подавлять их функционирование.

Способность олигонуклеотидов подавлять процесс экспрессии впервые была обнаружена в работах П. Замечника и М. Стефенсона [1, 2] и в дальнейшем использовалась для направленного ингибирования трансляции [3—7], транскрипции [8, 9] и сплайсинга [10] различных нуклеиновых кислот. В этих работах было выяснено, что эффективность подавления геной экспрессии немодифицированными олигонуклеотидами невелика, поскольку они, во-первых, плохо проникают через клеточные мембраны [9, 10], и, во-вторых, быстро гидролизуются клеточными нуклеазами [9—11].

Улучшить транспорт олигонуклеотидов в клетку и повысить их устойчивость к ферментативному гидролизу удалось путем химической модификации всего их сахарофосфатного остова [12—17] или его концевых группировок [18—22].

Наиболее детально изученным вариантом модификации концевых групп олигонуклеотидов является присоединение к ним остатков интеркалирующих красителей [18, 19, 23—28]. В работах К. Элена с соавт. установлено, что производные олигонуклеотидов, содержащие на 3'-конце ковалентно связанный остаток 9-амино-2-метокси-6-хлоракиридина, гораздо эффективнее подавляют экспрессию определенных генов [24, 29, 30] и внутриклеточное развитие инфекционных агентов [18, 19], чем немодифицированные олигонуклеотиды. Это связано с тем, что акридиновый остаток предохраняет олигонуклеотид от гидролиза 3'-экзонуклеазами

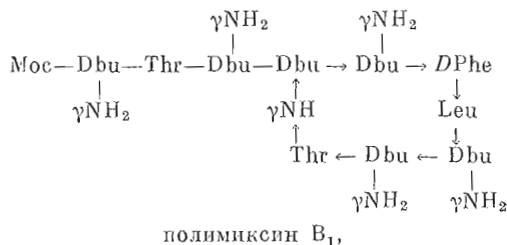
Принятые сокращения: Dnm-NH₂ — дауномицин, PmH — полимиксин В₁, EDC — 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид, р* — [³²P]фосфат. В форме дезоксиолигонуклеотидов префикс «д» опущен. На всех рисунках обозначения ХС и ВРВ указывают положения маркеров (ксиленцианола и бромфенолового синего соответственно).

[18, 19], улучшает его способность проникать через клеточные мембраны [18] и, кроме того, дополнительно стабилизирует комплекс олигонуклеотида с комплементарным ему участком нуклеиновой кислоты [23, 24]. Вместе с тем установлено, что акридиновые производные олигонуклеотидов эффективно подавляют внутриклеточное развитие инфекции только в достаточно высокой концентрации (≈ 80 мкМ) [18]. Авторы объясняют это тем, что, во-первых, производное не полностью проникает в клетку и, следовательно, внутриклеточная концентрация его ниже и, во-вторых, действие этого производного не может быть долговременным из-за его гидролиза эндонуклеазами и 5'-экзонуклеазами (период полугидролиза акридинового производного нонануклеотида в культуре клеток SDM 79—150 мин при 26° С, немодифицированного нонануклеотида — 30 мин [18]).

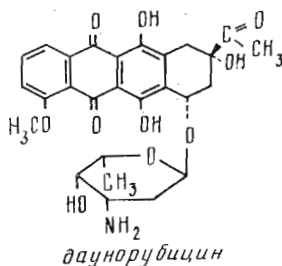
Чтобы увеличить эффективность и продолжительность действия олигонуклеотидов в клетке, что важно с точки зрения их реального практического использования, мы предлагаем модифицировать оба конца олигонуклеотида (это полностью защитит его по крайней мере от действия экзонуклеаз). К одному концу мы предлагаем присоединить остаток интеркалирующего красителя, а ко второму — соединение, способное улучшить транспорт олигонуклеотида через клеточную мембрану, например положительно заряженный пептид.

Возможность использования поликатионных пептидов для улучшения проникновения олигонуклеотидов в клетку подтверждена работами М. Леметра с соавт. [20, 21, 31] на примере конъюгата пентадекануклеотида с поли-*L*-лизинном. Этот конъюгат оказался эффективным ингибитором внутриклеточного развития вируса везикулярного стоматита, причем ингибирующее действие он проявляет даже при концентрации 100 нМ, в то время как для действия других олигонуклеотидов-ингибиторов необходима концентрация в 100—500 раз больше.

В нашей работе в качестве поликатионного пептида был выбран антибиотик полимиксин В₁, способный повышать проницаемость клеточных мембран [32], в качестве интеркалирующего соединения — антибиотик даунорубин (дауномицин, рубомицин):



где Moc — (+)-6-метилоктановая кислота, Dbu — *L*- α - γ -диаминомасляная кислота;



Условия присоединения указанных антибиотиков к концевым фосфатным группам олигонуклеотидов отрабатывали на синтетическом тридекануклеотиде ³²pCCAGTGATCCGTA (I). Анализ реакционных смесей осуществляли методом высоковольтного электрофореза в плоском 20%

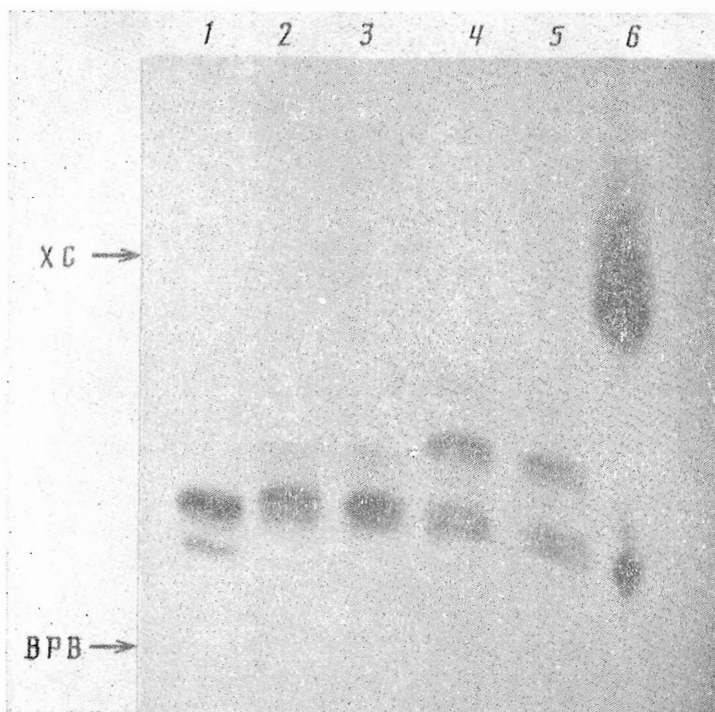


Рис. 1. Электрофореграмма олигонуклеотида (I) (1) и реакционных смесей, полученных при синтезе производных тридекануклеотида (I) с ω -аминоэнантиомной кислотой через 10 (2) и 16 ч (3) после начала реакции, с даунорубицином через 3 (4) и 10 ч (5) после начала реакции и с полимиксином B_1 (6)

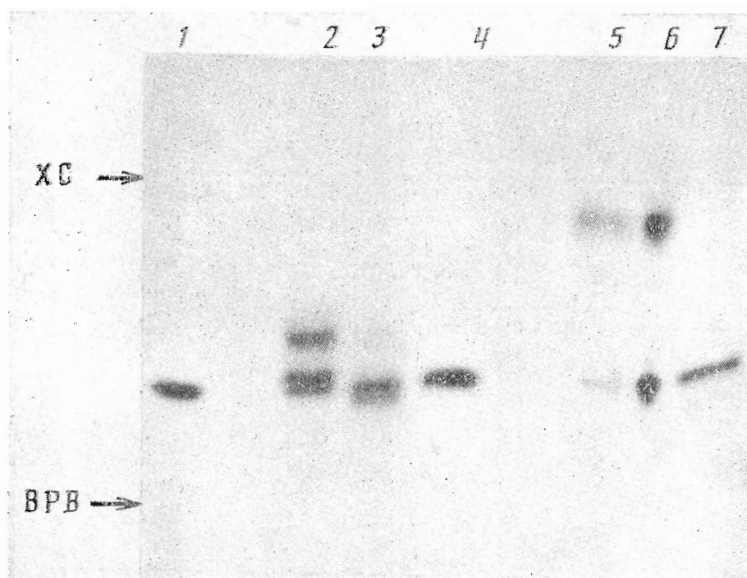


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов кислотного гидролиза соединений, полученных присоединением к тридекануклеотиду (I) антибиотиков даунорубицина и полимиксина B_1 : 1 — контрольный тридекануклеотид (I), 2 — реакционная смесь после синтеза производного с дауномицином (IV), пропущенная через дауэкс-50, 3 — ее гидролизат, 4 — контрольная смесь олигонуклеотида (I) с дауномицином, 5 — реакционная смесь после синтеза производного олигонуклеотида (I) с полимиксином B_1 , пропущенная через дауэкс-50, 6 — ее гидролизат, 7 — контрольная смесь олигонуклеотида (I) с полимиксином B_1

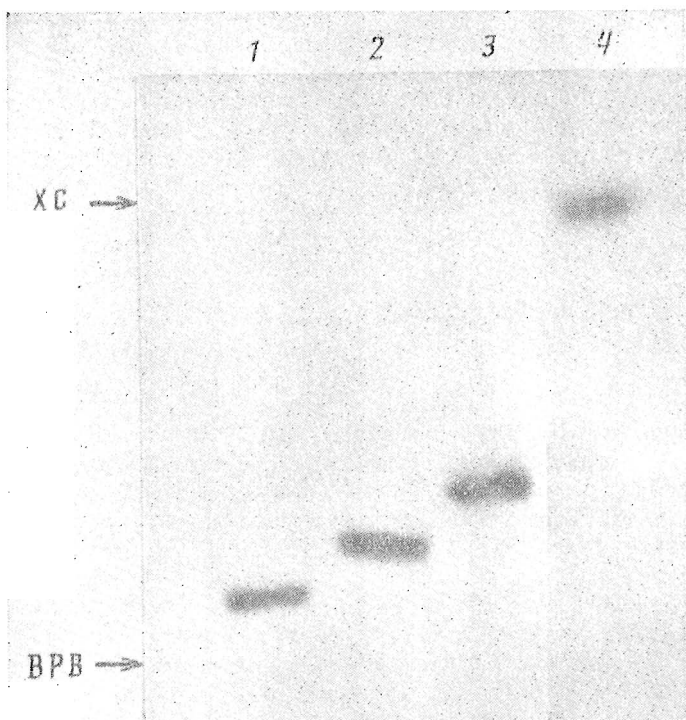


Рис. 3. Электрофореграмма ундекануклеотида (VI) (1), его производного с ω -амино-энантиковой кислотой (VIII) (2), с даунорубицином (IX) (3) и бифункционального производного олигонуклеотида (VI) с даунорубицином и полимиксином B_1 (V) (4)

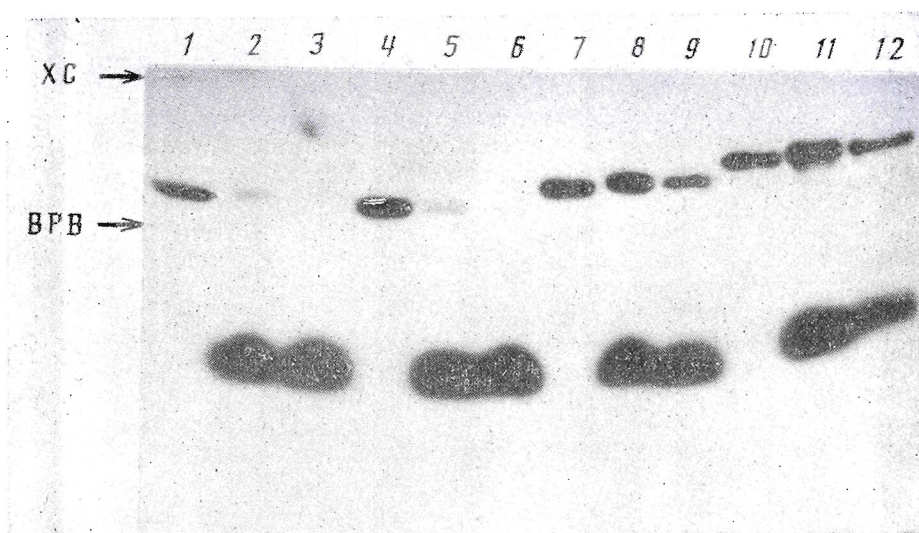


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов гидролиза фосфодиэстеразой зменного яда ундекануклеотида (VI) и его производных. Три дорожки, отвечающие каждому нуклеотиду, соответствуют (по порядку) ему самому до гидролиза и продуктам его гидролиза через 1 и 3 ч: 1—3 — ундекануклеотид (X), 4—6—3'-фосфорилированный ундекануклеотид (VI), 7—9 — производное (VIII) с ω -аминоэнантиковой кислотой, 10—12 — производное (IX) с даунорубицином

ПААГ в денатурирующих условиях с последующей автораднографией.

По данным К. Элена с соавт., наиболее эффективно стабилизирует образуемый олигонуклеотидом комплементарный комплекс интеркалирующий остаток, присоединенный к 3'-концу этого олигонуклеотида посредством пойки из 5—6 метиленовых звеньев [23, 24]. Поэтому для

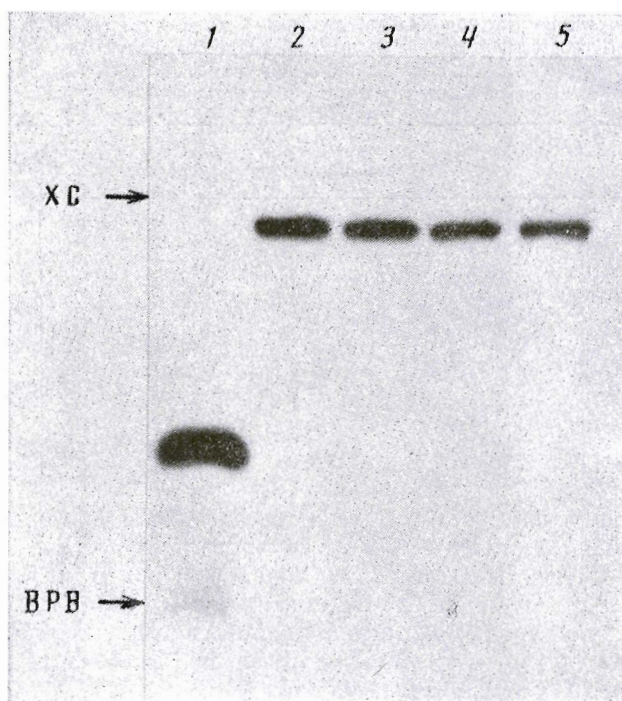


Рис. 5. Электрофореграмма увдекануклеотида (VI) (1) и продуктов гидролиза фосфодиэстеразой зменного яда производного с полимиксином В₁ (XI) через 1 (2), 3 (3), 5 (4) и 20 ч (5) после начала гидролиза

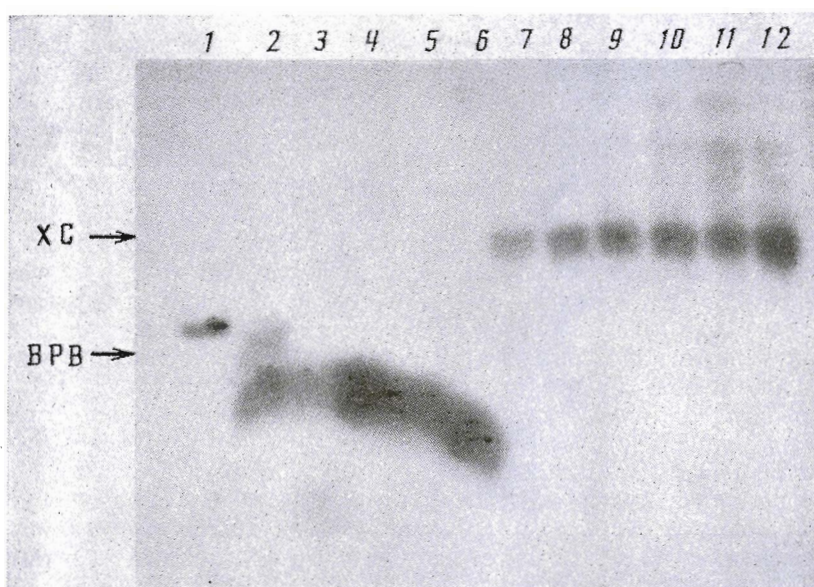


Рис. 6. Электрофореграмма увдекануклеотида (VI) (1) и бифункционального производного (V) (7), а также продуктов их нуклеазного гидролиза через 10 (2, 8), 40 мин (3, 9), 2 (4, 10), 5 (5, 11), 25 ч (6, 12) инкубации

Синтез соединения (IX) осуществляли по методике, описанной выше для синтеза производного (IV). Соединение (IX) отделяли от избытка дауномицина и EDC с помощью осаждения ацетоном из 2 М водного раствора LiClO₄ и инкубировали с АТР и Т4-полинуклеотидкиназой. Производное (V) получали конденсацией 5'-фосфорилированного производного (IX) с полимиксином В₁ под действием EDC.

Влияние различных группировок, присоединенных к 3'-концу ундекануклеотида (IX) на его устойчивость к гидролизу фосфодиэстеразой змеиного яда $2,6 \cdot 10^{-2}$ ед. акт. фермента на $0,01 \text{ OE}_{260}$ олигонуклеотида в $0,2 \text{ M}$ трис-HCl (pH 8,5), содержащем $0,04 \text{ M}$ MgCl_2 (37°C)

Соединение	3'-Концевая группировка олигонуклеотида	Время гидролиза, ч	Степень гидролиза, %
(X)	ОН	1	95-97
		3	99
(VI)	OPO_3^{2-}	1	95-97
		3	99
(VIII)	$\text{p}[\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}]$	1	65-68
		3	84-87
(IX)	$\text{p}[\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{CONH-Dnm}]$	1	53-55
		3	64-67
		5	85-87
(XI)	$\text{p}(\text{Pm})$	20	96-99
		20	0

Для контроля за ходом реакций алиquotы реакционных смесей при синтезе соединений (VIII)—(IX) инкубировали с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и T4-поли-нуклеотидкиназой и анализировали электрофорезом в ПААГ (рис. 3). Электрофоретическая подвижность соединений (V), (VIII), (IX) в ПААГ хорошо согласуется с данными, полученными при анализе производных тридекануклеотида (I) с дауномицином и полимиксином B_1 (рис. 1).

Производное (V) выделяли электрофорезом в ПААГ, суммарный выход его относительно исходного ундекануклеотида (VI) составил 20%.

Как отмечалось выше, мы предположили, что присоединение дауномицина и полимиксина B_1 к олигонуклеотиду улучшает его способность проникать в клетку и повысить его устойчивость к гидролизу клеточными нуклеазами. В связи с этим в первую очередь исследовали устойчивость полученного производного (V) к ферментативному гидролизу. В частности, изучали, как различные группировки, присоединенные к концу олигонуклеотида, блокируют его экзонуклеазное расщепление.

Для этого проводили гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда $5'\text{-}^{32}\text{P}$ -меченых ундекануклеотида TGTAAAACGAC (X), его 3'-фосфорилированного аналога (VI), производного с ω -аминоэнантовой кислотой (VIII) и с даунорубицином (IX) и специально синтезированного $\text{TGTAAAACGACp}(\text{Pm})$ (XI) (рис. 4, 5, таблица). Результаты гидролиза показали, что введение ненуклеотидных группировок по 3'-концу олигонуклеотида замедляет скорость его экзонуклеазного гидролиза; так, аминокислотное производное (VIII) более устойчиво к гидролизу, чем ундекануклеотид (VI), присоединение остатка дауномицина к аминокислоте дополнительно повышает эту устойчивость. Остаток полимиксина полностью блокирует экзонуклеазный гидролиз олигонуклеотида.

Нами была также изучена устойчивость бифункционального производного (V) к гидролизу клеточными нуклеазами. Для этого $5'\text{-}^{32}\text{P}$ -меченые соединения (V) и (VI) инкубировались в суспензии клеток *E. coli* JM103 (ночная культура клеток с $A\text{-}2 \text{ OE}_{590}$) при 37°C , через определенные промежутки времени отбирались алиquotы смесей и анализировались электрофорезом в ПААГ. Оказалось, что немодифицированный ундекануклеотид (VI) полностью гидролизуеться уже через 40 мин (рис. 6, 1-6), в то время как заблокированный по обоим концам ундекануклеотид (V) в значительной степени сохраняется в течение 1 сут (рис. 6, 7-12). Необходимо отметить, что в результате гидролиза ундекануклеотида (VI) образуются ^{32}P -меченые мононуклеотид и неорганический фосфат, находящиеся в геле ниже соединения (VI). Производное (V) содержит остаток полимиксина B_1 , который имеет положительный заряд (+4) и большую молекулярную массу. При гидролизе (V) образуются ^{32}P -меченые продукты, содержащие полимиксин, у которых большая масса и меньший, чем у исходного соединения (V), отрицательный заряд (у моно-, ди- и тринуклеотидов заряд положительный), поэтому эти продукты располагаются в геле выше соединения (V).

Полученные результаты подтвердили наши предположения о том, что присоединение даунорубина и полимиксина В₁ к обоим концам олигонуклеотида предохраняет его от экзонуклеазного расщепления и значительно повышает продолжительность его существования в присутствии клеточных нуклеаз. Следующим важным моментом работы явилось изучение того, как влияет присоединение указанных антибиотиков к олигонуклеотиду на его сорбцию клетками. Установлено, что при инкубации в экспоненциально растущей культуре клеток *E. coli* при 37° С за 10 мин клетками сорбируется 10—13% производного (V), в то время как немодифицированный ундекануклеотид (VI) сорбируется в этих же условиях не более чем на 1%. Понятно, что весь сорбируемый клеткой олигонуклеотид не обязательно проникает через мембрану, часть может связаться с ней, поэтому в дальнейшем мы планируем более детально изучить, каким образом модифицированный олигонуклеотид связывается клетками.

Таким образом, в настоящей работе впервые предложена схема синтеза нового типа соединений — производных олигонуклеотидов, содержащих одновременно остатки интеркалирующего агента и соединения, способного увеличивать проницаемость клеточных мембран. Осуществлен синтез производного ундекануклеотида с дауномицином и полимиксином В₁ и установлено, что это производное гораздо лучше сорбируется клетками и значительно более устойчиво к гидролизу клеточными нуклеазами, чем немодифицированный олигонуклеотид. Эти данные позволяют надеяться, что предложенный тип соединений окажется эффективным ингибитором экспрессии генетических структур.

Авторы выражают глубокую благодарность В. А. Петренко, П. И. Позднякову и Г. Ф. Сиволобовой (НИКТИ БАВ, НПО «Вектор») за предоставленные ими олигонуклеотиды.

Экспериментальная часть

В работе использованы N-гидроксibenзотриазол (Fluka, Швейцария), гидрохлорид 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимида (Merck, ФРГ), фосфодиэстераза змеиного яда (Sigma, ФРГ), дрожжевой экстракт и бактотриптон (Difco, США); остальные реактивы отечественного производства.

Гель-фильтрацию осуществляли на колонке (8 × 170 мм) с биогелем P-2 (200—400 меш, Bio-Rad, США). Гель-электрофорез ³²P-меченых соединений проводили в пластинах толщиной 0,3 мм 20% ПААГ, содержащего 7 М мочевины, в 0,05 М трис-боратном буфере (рН 8,3), содержащем 1 мМ EDTA. Для препаративного выделения синтезированных производных использовали гель-электрофорез в пластинах толщиной 1 мм 20% ПААГ в тех же условиях. Вещества из геля элюировали 0,5—1 М водным раствором LiClO₄ (4 ч, 37° С), элюат концентрировали *n*-бутанолом до получения раствора с 2 М концентрацией LiClO₄ и осаждали, используя 5—10-кратный избыток ацетона (по объему). Олигодезоксирибонуклеотиды получены из НПО «Вектор».

Синтез N-оксибензотриазоловых эфиров (II) и (VII) олигонуклеотидов (I) и (VI) проводили по методике [34]. По данным ионообменной микроколоночной хроматографии на колонках (2 × 62 мм) с полисилиом СА в линейном градиенте концентрации калий-пирофосфатного буфера (0—0,12 М, рН 7,0) в 20% водном ацетонитриле на приборе «Милихром», степень превращения олигонуклеотида в N-оксибензотриазоловый эфир не ниже 95%.

Синтез аминокислотных производных (III) и (VIII) олигонуклеотидов (II) и (VII) проводили по методу [33]. К полученному по предыдущей методике N-оксибензотриазоловому эфиру олигонуклеотида (1—50 нмоль) прибавляли 50—100 мкл 1 М водного раствора ω-аминоэнантовой кислоты, предварительно оттитрованного до рН 11. Смесь инкубировали при 8° С в течение 10 ч и олигонуклеотидный материал обессоливали гель-фильтрацией на биогеле P-2. По данным гель-электрофореза, степень превращения олигонуклеотида (I) в аминокислотное производное (III) —

70—75%, а олигонуклеотида (VI) в производное (VIII) — не ниже 80%.

Синтез производных с даунорубицином (IV) и (IX). Полученные в предыдущей методике аминокислотные производные (III) и (VIII) растворяли в 30 мкл 0,5 М водного раствора гидрохлорида даунорубицина, добавляли 1 мг EDC и смесь инкубировали 3 ч при 8°С. Затем добавляли 170 мкл 2 М LiClO₄ и олигонуклеотидный материал осаждали 1 мл ацетона, переосаждали 2 раза, промывали ацетоном, высушивали и выделяли производные (IV) и (IX) гель-электрофорезом как описано выше. Выходы соединений (IV) и (IX) относительно исходных олигонуклеотидов (I) и (VI) составили 40 и 55% соответственно.

Синтез производных олигонуклеотидов (I) и (VI) с полимиксином. Олигонуклеотид (1—20 нмоль) растворяли в 15 мкл воды, добавляли 3 мк сульфата полимиксина В₁ и 1,5 мг EDC. Реакционную смесь тщательно перемешивали и выдерживали 16 ч при 8°С. Затем добавляли 180 мкл 2 М водного раствора LiClO₄ и осаждали олигонуклеотидный материал 1 мл ацетона, переосаждали 2—3 раза, промывали ацетоном и высушивали. Полученные производные выделяли гель-электрофорезом как описано выше. Выход производного тридекануклеотида (I) с полимиксином 80%, выход производного (V) относительно исходного ундекануклеотида (VI) 20%.

Препаративное ферментативное 5'-фосфорилирование проводили по методике [35]. Эффективность фосфорилирования соединения (IX) составила 95—97% по данным ионообменной микроколоночной хроматографии.

Определение эффективности сорбции соединений (V) и (VI) клетками E.coli. ³²P-меченые соединения (V) и (VI) добавляли в клетки *E.coli*, штамм IM103, на фазе экспоненциального роста в LB-среде. Плотность клеток составляла 0,3 ОЕ₅₉₀. Олигонуклеотиды инкубировали в суспензии клеток в течение 10 мин при 37°С. В предварительных экспериментах было показано, что в данных условиях не происходит нуклеазного расщепления олигодезоксирибонуклеотидов. После инкубации клетки осаждали центрифугированием на центрифуге Eppendorf (16 000 об/мин, 1 мин). Определяли радиоактивность осадка и супернатанта по Черенкову на счетчике радиоактивности «Дельта».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zamecnik P. C., Stephenson M. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 1. P. 280—284.
2. Stephenson M. S., Zamecnik P. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 1. P. 285—288.
3. Kawasaki E. S. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 13. P. 4991—5004.
4. Haeuptle M.-T., Frank R., Dobberstein B. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 3. P. 1427—1448.
5. Gupta K. C. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 16. P. 7492—7496.
6. Wickstrom E. L., Bacon T. A., Gonzalez A., Freeman D. L., Lyman G. H., Nickstrom E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 4. P. 1028—1032.
7. Toulme J.-J., Helene C. // Gene. 1988. V. 72. № 1—2. P. 51—58.
8. Winkler M. E., Mullis K., Barnett J., Stroynowski I., Yanofsky C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 7. P. 2181—2185.
9. Геддон Ю. З., Лисовская К. В., Дуанов Г. Л., Баранов Л. В., Кумарев В. П., Сагаган Р. И. // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 1984. № 11. С. 32—36.
10. Zamecnik P. C., Goodchild J., Taguchi Y., Sarin P. S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 14. P. 4143—4146.
11. Wickstrom E. // J. Biochem. and Biophys. Methods. 1986. V. 13. № 2. P. 97—102.
12. Moran F., Rayner B., Imbach J.-L., Thenet S., Bertrand J.-R., Paoletti J., Paoletti C., Maley C. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 8. P. 3421—3473.
13. Blake K. R., Murakami A., Spitz S. A., Glave S. A., Reddy M. P., Ts'o P. O. P., Miller P. S. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 22. P. 6139—6145.
14. Sarin P. S., Agrawal S., Civeira M. P., Goodchild J., Ikeuchi T., Zamecnik P. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 20. P. 7448—7451.
15. Зарытова В. Ф., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Попова В. С., Стефанович Л. Е., Шешегова Е. А. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 255. № 1. С. 110—113.
16. Matsukura M., Shinozuka R., Zon G., Mitsuya H., Reitz M., Cohen J. S., Broder S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 2. P. 7706—7710.
17. Agrawal S., Goodchild J., Civeira M. P., Thornton A. H., Sarin P. S., Zamecnik P. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 19. P. 7079—7083.
18. Verspieren P., Cornelissen A. W. C. A., Thuong N. T., Helene C., Toulme J. J. // Gene. 1987. V. 61. № 3. P. 307—315.

19. Zerial A., Thuong N. T., Helene C. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 23. P. 9909—9919.
20. Lemaitre M., Bayard B., Lebleu B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 3. P. 648—652.
21. Leonetti J. P., Rayner B., Lemaitre M., Gagnor C., Milhaud P. G., Imbach J.-L., Lebleu B. // Gene. 1988. V. 72. № 1—2. P. 323—332.
22. Власов В. В., Иванова Е. М., Кутявин И. В., Райт А. С., Юрченко Л. В., Якубов Л. А., Абдукаюмов М. Н., Скоблов Ю. С. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. Вып. 1. С. 93—100.
23. Asseline V., Toulme F., Thuong N. T., Delarue M., Montenay-Garestier T., Helene C. // EMBO J. 1985. V. 3. № 4. P. 795—800.
24. Asseline V., Delarue M., Lancelot G., Toulme F., Thuong N. T., Montenay-Garestier T., Helene C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 6. P. 3297—3301.
25. Helene C., Montenay-Garestier T., Saison T., Takasugi M., Toulme J. J., Asseline V., Lancelot G., Maurizot J. C., Touline F., Thuong N. T. // Biochimie. 1985. V. 67. P. 777—783.
26. Asseline V., Thuong N. T., Helene C. // Nucleosides and Nucleotides. 1986. V. 5. № 1. P. 45—63.
27. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911—920.
28. Gautier C., Moran F., Rayner B., Huynh-Dinh T., Igolen J., Imbach J.-L., Paoletti C., Paoletti J. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 16. P. 6625—6641.
29. Toulme J. J., Krisch H. M., Loreau N., Thuong N. T., Helene C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 5. P. 1227—1231.
30. Cazenave C., Loreau N., Toulme J. J., Helene C. // Biochimie. 1986. V. 68. № 9. P. 1063—1069.
31. Lemaitre M., Bisbal C., Bayard B., Lebleu B. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1, 2. P. 311—316.
32. Антибиотики — пептиды (Структура, функция, биосинтез) / Ред. Егоров Н. С. М.: Изд-во МГУ, 1987. С. 5—41.
33. Ивановская М. Г., Готтих М. Б., Шабарова З. А. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 293. № 2. С. 477—481.
34. Ivanovskaya M. G., Gottikh M. B., Shabarova Z. A. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 5. P. 913—934.
35. Экспериментальные методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Ред. Прокофьев М. А. М.: Изд-во МГУ, 1985. С. 122—125.

Поступила в редакцию
24.IV.1989

M. B. GOTTIKH, M. G. IVANOVSKAYA, E. A. SKRIPKIN, Z. A. SHABAROVA
DESIGN OF NEW OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES RESISTANT
TO CELL NUCLEASES DEGRADATION

*A. N. Blozrsky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
Moscow State University*

A new type of modified antisense oligodeoxyribonucleotides is suggested, containing an intercalating drug (e. g., daunomycin (Dnm-NH₂)) at one end of the oligonucleotide, and a compound, improving the oligonucleotide transport into the cell, e. g., polymyxin B₁ (PmH) at its other end. Schemes for joining these antibiotics to the terminal groups of oligonucleotides have been developed. From undecanucleotide pTGAAAACGACp (I), the corresponding derivative (Pm)pTGAAAACGACp (NH-Dnm) (II) was obtained with 20% yield. It was found that joining of daunomycin significantly lowers the rate of the oligonucleotide's exonuclease degradation, whereas joining of polymyxin blocks the degradation completely. Derivative (II) is much more stable to hydrolysis by cell enzymes than the unmodified oligonucleotide (I): upon incubation with *E. coli* cells (I) is quantitatively hydrolyzed within 40 minutes while (II) is hydrolyzed by 30% within 24 h. Derivative (II) is also better adsorbed by *E. coli* cells. This sort of derivative of antisense oligonucleotides may prove to be efficient inhibitors of the gene expression.