



УДК 547.963.3:577.113.6

## СЕНСИБИЛИЗИРОВАННАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ДНК БИНАРНЫМИ СИСТЕМАМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ КОНЪЮГАТОВ. V\*. ВЛИЯНИЕ СТРОЕНИЯ ДНК-МИШЕНИ. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ

© 1999 г. М. И. Добриков<sup>#</sup>, С. А. Гайдамаков, Т. И. Гайнутдинов, Т. М. Иванова, В. В. ВласовНовосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 23.03.98 г. Принята к печати 18.06.98 г.

Изучена сенсibilизированная фотомодификация ряда одноцепочечных ДНК-мишеней бинарными системами олигонуклеотидных конъюгатов, комплементарных соседним участкам ДНК. Один из конъюгатов содержал сенсibilизатор – пирен, антрацен или 1,2-бензантрацен, второй – фотореагент – 4-азидотетрафторбензальгидразон. Сенсibilизированная фотомодификация инициируется светом 365–580 нм за счет эффективного переноса энергии с фотовозбужденного сенсibilизатора на фотореагент в комплементарном комплексе бинарной системы с ДНК-мишенью, в котором сенсibilизатор и фотореагент стерически сближены.

Найдены условия осуществления количественной фотомодификации одноцепочечной ДНК бинарной системой олигонуклеотидных конъюгатов. Предельная степень фотомодификации зависит от числа остатков гуанозина в (pG)<sub>n</sub>-последовательности ДНК-мишеней в месте модификации: при  $n = 1$  выход ковалентных аддуктов составил 62–68%, при  $n = 2$  – 75–82% и при  $n = 4$  – 98–99%.

*Ключевые слова:* антисмысловые олигонуклеотиды; фотомодификация ДНК; перенос энергии; сенсibilизация.

Реакционноспособные олигонуклеотидные конъюгаты – перспективные инструменты для селективного подавления экспрессии генов и потенциальные противовирусные и противоопухолевые препараты [2, 3].

Фотореакционноспособные производные олигонуклеотидов, несущие остатки псораленов [4–6], порфиринов [7, 8], хлоринов [9], металлотексафоринов [10, 11], полиароматических азидов [12], нафто- [13] и антрахинонов [14, 15], обладают значительными преимуществами перед химически активными производными. Они нетоксичны и инертны в темноте. Процесс фотоактивации легко регулировать во времени [9, 16]. Многие фотореагенты при облучении длинноволновым видимым [7–12] и даже ИК-светом [10, 11, 16] генерируют высокореакционноспособные частицы, способные ковалентно присоединяться к нуклеиновым кислотам [4–6, 12, 13] или расщеплять их [7–11, 14, 15].

Фотоактивные конъюгаты антисмысловых олигонуклеотидов связываются с вирусной РНК и после облучения ингибируют трансляцию [8]. Фотоактивные олигонуклеотидные конъюгаты, спо-

собные образовывать триплексы с двухцепочечной ДНК, после облучения ингибируют репликацию и транскрипцию *in vitro* [4–6] и *in vivo* [5, 6].

Увеличение эффективности и специфичности воздействия реакционноспособных конъюгатов олигонуклеотидов – одна из основных задач на пути создания ген-направленных биологически активных веществ терапевтического приложения [2, 3]. Для увеличения специфичности фотомодификации ДНК нами предложены бинарные системы олигонуклеотидных конъюгатов [1, 17–23]. Такие системы состоят из двух олигонуклеотидов, комплементарных соседним участкам мишени и несущих остатки сенсibilизатора и фотореагента. В качестве сенсibilизаторов были использованы полициклические ароматические соединения на основе пирена [17, 18, 21, 23], 1,2-бензантрацена [19, 20] и перилена [1, 22], в качестве фотореагентов – перфторированные ароматические азиды.

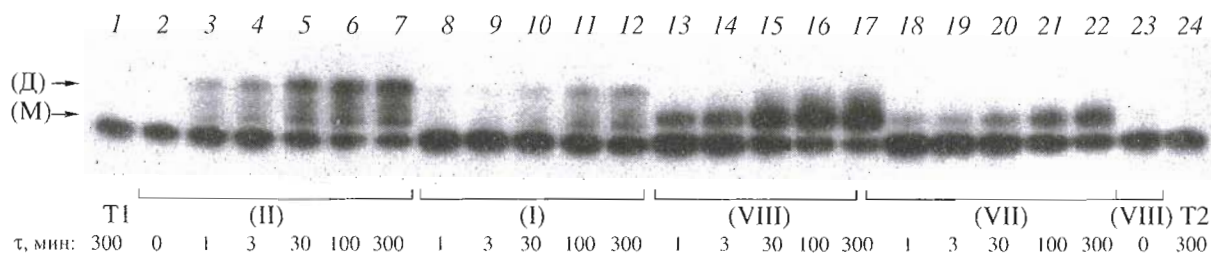
При связывании конъюгатов с ДНК-мишенью сенсibilизатор и фотореагент стерически сближаются и формируют фотореакционноспособный центр, обладающий новыми свойствами. Облучение длинноволновым светом комплекса конъюгатов с ДНК-мишенью приводит к возбуждению сенсibilизатора, активации реагента за счет эффективного переноса энергии с фотовоз-

Префикс “d” в обозначениях дезоксирибоолигонуклеотида опущен.

\* Сообщение IV см. [1].

# Автор для переписки.





**Рис. 1.** Радиоавтограф геля, полученный при прямой (8–12, 18–22) и сенсibilизированной (3–7, 13–17) фотомодификации  $5^{32}\text{P}$ -меченых ДНК-мишеней Т1 (2–12) и Т2 (13–23) олигонуклеотидным реагентом (2) при облучении видимым светом 400–440 нм, концентрации компонентов  $[\text{T1}] = [\text{T2}]$  0,1 мкМ,  $[\text{1}] = [\text{2}]$  50 мкМ в комплексах: Т1 – 1; (II) – 2–7; (I) – 8–12; (VIII) – 13–17, 23; (VII) – 18–22; Т2 – 24. Время облучения, мин: 0 – 2, 23; 1 – 3, 8, 13, 18; 3 – 4, 9, 14, 19; 30 – 5, 10, 15, 20; 100 – 6, 11, 16, 21; 300 – 1, 7, 12, 17, 22, 24. (М) и (Д) – ковалентные аддукты, по электрофоретической подвижности соответствующие присоединению одного и двух остатков олигонуклеотидного реагента (2) к ДНК-мишеням.

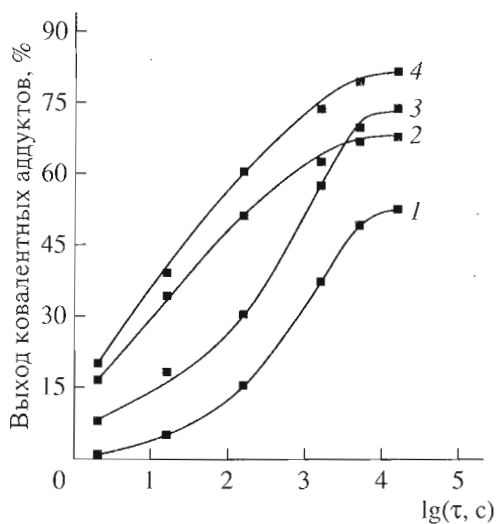
модификации этим же реагентом неполностью комплементарной ДНК-мишени Т2 в составе комплексов (VII) и (VIII) в основном образуется один аддукт, по электрофоретической подвижности соответствующий присоединению одного олигонуклеотидного реагента к мишени (дор. 13–22). Не наблюдается образования ни ковалентных аддуктов, ни продуктов спонтанного расщепления при выдерживании комплексов (II) (дор. 2) и (VIII) (дор. 23) в темноте или при облучении ДНК-мишеней Т1 (дор. 1) и Т2 (дор. 24) в отсутствие конъюгатов.

Начальная скорость (дор. 18) и предельная степень прямой (дор. 22) и сенсibilизированной фотомодификации (дор. 13, 17) мишени Т2 выше, чем комплементарной мишени Т1 (дор. 8, 12 и 3, 7 соответственно).

Полученные результаты можно объяснить тем, что эффективность протекания реакции по остатку  $\text{G}^{12}$  в мишени Т2 намного больше, чем по остатку  $\text{A}^{12}$  в мишени Т1, и это – определяющий фактор. В связи с этим изучена фотомодификация мишени Т2 комплементарным ей олигонуклеотидным реагентом (3) и сопоставлена с модификацией неполностью комплементарным реагентом (2) (рис. 2). Было найдено, что при фотомодификации мишени Т2 в комплементарных комплексах (V) и (VI) начальная скорость и предельная степень модификации (кривые 3, 4) выше, чем в неполностью комплементарных комплексах (VII) и (VIII) (кривые 1, 2 соответственно).

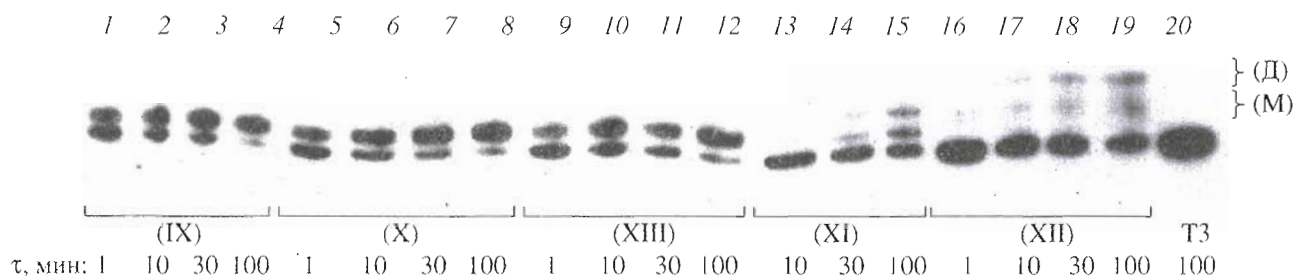
Сравнение фотомодификации двух мишеней комплементарными им олигонуклеотидными реагентами в комплексах (I), (II), (V), (VI) подтверждает, что предельная степень сенсibilизированной (рис. 2, 4) и особенно прямой (рис. 2, 3) фотомодификации мишени Т2 (75 и 72%) больше, чем мишени Т1 (68 и 41%, рис. 1, дор. 7, 12 соответственно). Следовательно, эффективность фотомодификации возрастает в том случае, когда в предполагаемом месте модификации ДНК-мишени находятся два остатка гуанозина.

Для определения позиционной направленности реакции фотомодификации в комплементарных (I), (II), (V), (VI) и неполностью комплементарных (III), (IV), (VII), (VIII) комплексах реакционные смеси расщепляли пиперидином (рис. 3). Дегградации облученных в отсутствие фотореагентов мишеней Т1 (дор. 7) и Т2 (дор. 11) не наблюдается. Прямая и сенсibilизированная фотомодификация мишеней Т1 и Т2 в комплементарных комплексах (панель а) протекает по остатку  $\text{G}^{11}$  (дор. 1, 2) и по остаткам  $\text{G}^{11}$ ,  $\text{G}^{12}$  (дор. 5, 6 соответственно). Фотомодификация мишеней Т1 и Т2 в неполностью комплементарных комплексах (панель б) протекает менее эффективно и менее специфично. Основное расщепление ДНК Т1 наблюдается по остаткам  $\text{G}^{11}$  и  $\text{T}^{13}$ , незначительное расщепление происходит по остаткам  $\text{T}^{10}$  и  $\text{A}^{12}$  (дор. 8, 9). Обработка пиперидином фотомодифи-



**Рис. 2.** Выход ковалентных аддуктов при прямой (1, 3) и сенсibilизированной конъюгатом (1) (2, 4) фотомодификации мишени Т2 олигонуклеотидными реагентами (2) (1, 2) и (3) (3, 4). Концентрации компонентов и условия облучения как на рис. 1.





**Рис. 4.** Радиоавтограф геля, полученный при фотомодификации  $5'$ - $^{32}\text{P}$ -меченой мишени Т3 олигонуклеотидными реагентами (5) и (6) при облучении светом (365–580 нм), в комплексах (IX) – 1–4; (X) – 5–8; (XIII) – 9–12; (XI) – 13–15; (XII) – 16–19; Т3 – 20. Концентрации компонентов [Т3] 1 мкМ. (4), (5), (6), (7) по 50 мкМ. Время облучения, мин: 1 – 1, 5, 9, 16; 10 – 2, 6, 10, 13, 17; 30 – 3, 7, 11, 14, 18; 100 – 4, 8, 12, 15, 19, 20. (М) и (Д) – ковалентные аддукты, по электрофоретической подвижности соответствующие присоединению одного и двух остатков олигонуклеотидных реагентов (5) и (6) к ДНК-мишени.

ментарными участку  $\text{A}^5\text{--A}^{24}$  ДНК-мишени. Синтез конъюгатов (4) и (7), несущих остатки сенсibilизатора – пиренил-1-метиламина, и конъюгатов (5) и (6), содержащих остатки фотореагента R, проводили по ранее описанным методам [21]. Фотомодификацию мишени Т3 проводили в комплексах (IX)–(XII) и в тандемном комплексе (XIII) с двумя фотоактивными конъюгатами (схема 2).

Прямая и сенсibilизированная фотомодификация 3'-концевым реагентом (5) приводит к высокоэффективному образованию аддукта (М), по электрофоретической подвижности соответствующего присоединению к мишени одной молекулы реагента (рис. 4, дор. 1–8). Фотомодификация конъюгатом (6) с 5'-концевым расположением реагента приводит к образованию двух аддуктов, с меньшей, чем в случае 3'-концевого реагента подвижностью (дор. 13–19).

И начальная скорость (рис. 4, дор. 1, 5), и предельная степень модификации (дор. 4, 8) при расположении фотореагента на 3'-концевом фосфате намного выше, чем соответствующие характеристики для конъюгата с фотореагентом на 5'-концевом фосфате (дор. 13, 16 и 15, 19 соответственно). Это согласуется с ранее полученными данными по фотомодификации ДНК-мишени Т1 [21].

На рис. 4 (дор. 9–12) представлены результаты фотомодификации мишени Т3 тандемом олигонуклеотидных реагентов, несущих два фотоактивных остатка. Скорость и предельная степень прямой фотомодификации в комплексах (IX) (дор. 1–4) и (XIII) (дор. 9–12) практически одинаковы, следовательно, вклад 5'-концевого реагента в суммарную степень модификации в тандеме (XIII) мал и такой подход не позволяет увеличить предельную степень модификации.

Предельные степени фотомодификации мишени Т1, несущей один остаток гуанозина в месте модификации, олигонуклеотидным фотореагентом (2), сенсibilизированной олигонуклеотидным производным бензантрацена (1) или пирена [18],

составляют 68 и 62% соответственно. Предельные степени сенсibilизированной фотомодификации мишеней Т2 и Т3, разных по последовательности, но несущих по два остатка гуанозина в предполагаемом месте модификации, заметно больше и достигают 75 и 82% соответственно.

Отсюда можно сделать заключение о том, что влияние на сенсibilизированную реакцию строения ДНК-мишени за пределами фотореакционного центра незначительно, но в сайте модификации строение мишени существенно влияет на предельную степень фотореакции.

Методом пиперидинового расщепления ковалентных аддуктов была изучена позиционная направленность прямой и сенсibilизированной фотомодификации ДНК-мишени Т3 (табл. 1). Основная модификация 3'-концевым фотореагентом наблюдается по остаткам  $\text{G}^{14}$  и  $\text{G}^{15}$  (табл. 1, комплексы (IX), (X), (XIII)). При прямой фотомодификации 5'-концевым реагентом в дуплексе (XI) реакция идет в основном по остатку  $\text{G}^{15}$ , появление сенсibilизатора в комплексе (XII) снижает модификацию по остатку  $\text{G}^{15}$  и основной точкой модификации становится остаток  $\text{G}^{14}$ .

Помимо расщепления по остаткам  $\text{G}^{14}$  и  $\text{G}^{15}$  наблюдается слабое расщепление (менее 2%) по остаткам  $\text{T}^{13}$  и  $\text{A}^{16}$ . Аналогичное расщепление наблюдалось при фотомодификации Т1 и Т2 мишеней по остаткам  $\text{T}^{10}$  и  $\text{T}^{13}$ , которое становилось особенно заметным при фотомодификации в полностью комплементарных комплексах (III), (IV), (VI) и (VIII) (рис. 3, дор. 8, 9, 12, 13). Исходя из этого, было сделано предположение, что дальнейшего увеличения степени модификации можно добиться в случае, если в этих положениях будут находиться остатки гуанозина.

Это предположение было проверено при фотомодификации одноцепочечной ДНК-мишени Т4 новой бинарной системой олигонуклеотидных реагентов, представленных на схеме 3. В качестве ДНК-мишени Т4 был использован 25-звенный



**Таблица 2.** Позиционная направленность прямой и сенсibilизированной фотомодификаций ДНК-мишени Т4 после 200 мин облучения светом (365–580 нм) и обработки пиперидином

Комплексы		(XIV)	(XV)
Степень модификации после обработки пиперидином, %		76	92
Нерасщепившиеся аддукты, %		25	42
Продукты расщепления пиперидином по основаниям нуклеотидов	G <sup>14</sup>	3	6
	G <sup>15</sup>	10	20
	G <sup>16</sup>	36	20
	G <sup>17</sup>	2	4

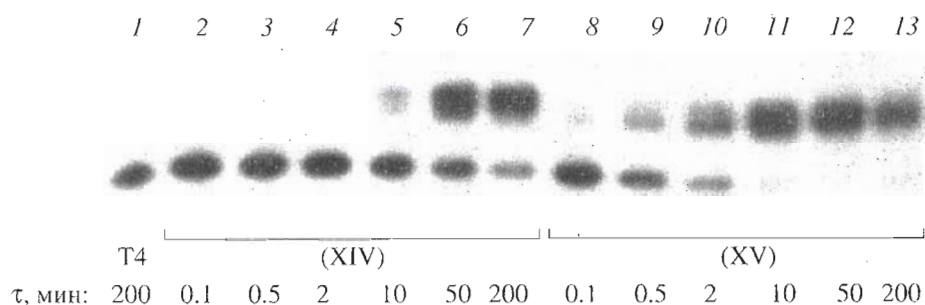
находящийся в одноцепочечной части дуплекса. Наличие конъюгата (8) в комплексе (XV) приводит к тому, что основными продуктами сенсibilизированной фотомодификации становятся пиперидин-стабильные аддукты. Следует отметить, что в обоих комплексах расщепление преимущественно происходит по остаткам G<sup>15</sup> и G<sup>16</sup> и в меньшей степени по остаткам G<sup>14</sup> и G<sup>17</sup>. Наличие дополнительного расщепления мишени Т4 по остаткам G<sup>14</sup> и G<sup>17</sup> позволяет увеличить предельную степень ее модификации по сравнению с мишенями Т2 и Т3.

Из данных, полученных при фотомодификации четырех ДНК-мишеней, следует, что предельные степени прямой фотомодификации мишеней (Т1 – 41%, Т2 – 72%, Т3 – 82% и Т4 – 85%) возрастают при увеличении числа остатков гуанозина в сайте модификации. Предельные степени сенсibilизированной фотомодификации ДНК-мишеней (68, 75, 85 и 99% соответственно) также возрастают при увеличении числа остатков гуанозина в сайте модификации. Во всех случаях степень сенсibilизированной фотомодификации выше, чем прямой.

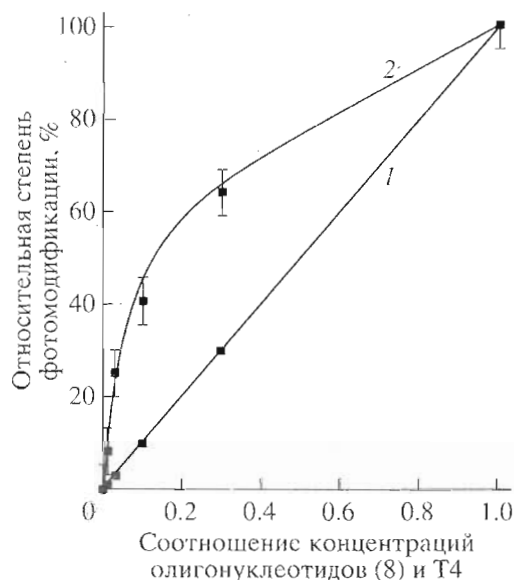
В использованных условиях реакций все мишени целиком связаны в комплексы с 50-кратным избытком конъюгатов, следовательно, более высокая степень сенсibilизированной фотомодификации, вероятнее всего, определяется

способностью сенсibilизатора инициировать реакцию многократно.

Для подтверждения этого были изучены каталитические свойства впервые использованного в бинарных системах антраценового сенсibilизатора. Поскольку в этом случае эффективность прямой фотомодификации достаточно высока, за 100% на рис. 6 принималась разница между выходом модификации в комплексе (XV) и выходом прямой реакции в комплексе (XIV). При отсутствии каталитического эффекта сенсibilизатора должна наблюдаться линейная зависимость (рис. 6, прямая 1) выхода продуктов сенсibilизированной фотомодификации от соотношения концентраций олигонуклеотидов. Экспериментально она наблюдается при низких температурах фотомодификации и коротких экспозициях, когда обмен олигонуклеотидов между комплексами и раствором замедлен, и в фотореакцию успевают вступить только те молекулы, которые изначально находились в составе комплексов (XIV) и (XV). Данные, полученные в условиях, когда за время фотореакции состав комплементарных комплексов успевает многократно обменяться (кр. 2) свидетельствуют, что при 100-кратном недостатке сенсibilизатора по сравнению с мишенью Т4, каждая его молекула позволяет инициировать фотомодификацию до 10 молекул ДНК-мишени. Очевидно, это свойство позволяет в случае мише-



**Рис. 5.** Радиоавтограф геля, полученного после электрофоретического разделения продуктов прямой (2–7) и сенсibilизированной (8–13) фотомодификации 5'-<sup>32</sup>P-меченой мишени Т4 при облучении светом (380–580 нм). Концентрации, мкМ: Т4 – 1 (XIV) и (XV) – 50; *t* = 21°C. Время облучения, мин: 0.1 – 2, 8; 0.5 – 3, 9; 2 – 4, 10; 10 – 5, 11; 50 – 6, 16; 200 – 7 (Т4), 7, 13.



**Рис. 6.** Зависимость относительной степени сенсibilизированной фотомодификации от соотношения концентраций (8)/Т4. 100% соответствует разности выходов продуктов суммарной модификации в комплексе (XV) и прямой модификации в комплексе (XIV) при эквимолярном соотношении (8) и Т4: концентрации, мкМ: Т4 – 10, (9) 50, (8) – 0.1–10. 1 – 10°C,  $\tau_{\text{обл}}$  10 мин (400–580 нм); 2 – 27°C,  $\tau_{\text{обл}}$  200 мин (400–580 нм). На кр. 2 указана ошибка определения степени модификации ( $\Delta$ ).

ни Т4, содержащей четыре остатка гуанозина в сайте модификации, добиться практически количественного выхода фотореакции.

В итоге, высокая эффективность сенсibilизированной фотомодификации ДНК-мишени Т4 определяется наличием четырех остатков гуанозина в сайте модификации, G-специфичностью фотореагента и каталитическими свойствами сенсibilизатора, каждая молекула которого способна инициировать модификацию до 10 молекул мишени. Предлагаемая конструкция фотореакционноспособного центра может привести к дополнительному увеличению специфичности сенсibilизированной фотомодификации за счет того, что любая замена остатков гуанозина в мишене Т4 будет приводить не только к снижению стабильности неполностью комплементарного комплекса, но и к снижению выхода модификации такой ДНК вследствие более низкой эффективности реакции перфторароматических азидов по другим нуклеотидным остаткам. Дополнительным преимуществом фотореакционноспособного центра в комплексе (XV) является то, что сенсibilизатор и фотореагент присоединены к остаткам цитозина, который модифицируется реагентом в значительно меньшей степени, чем гуанозин. Это должно предотвращать побочные процессы сшивки олигонуклеотидов-адресов

и самомодификации конъюгата (5), аналогичные отмеченным в работе [27].

В работе найдена оптимальная (pG)<sub>4</sub>-последовательность ДНК, позволяющая количественно модифицировать мишень новой бинарной системой олигонуклеотидных конъюгатов, содержащей остатки антрацена и перфторарилазида. В дальнейшем планируется более детальное изучение свойств этой системы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 9-формилантрацен (“Рсахим”, ч. д. а.).

ИК-спектры регистрировали на приборе UR-20 в таблетках KBr. Запись УФ-спектров и измерения оптической плотности растворов проводили на спектрофотометрах UV-2100 (Shimadzu, Япония) и Specord M40 (Carl Zeiss Jena, Германия). Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре MPF-4 (Hitachi, Япония). Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР записаны на приборе Bruker-200A, внутренний стандарт – гексаметилендисилоксан. Температуру плавления определяли в запаянных капиллярах на установке “Кристалл”. Скорость нагрева 0.3°C/мин.

Для выделения полученных олигонуклеотидных производных применяли метод ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа Waters (США) в системе I (колонка 25 × 0.4 см, сорбент Nucleosil RP-18, 5–20 мкм (Merck, Германия), линейный градиент концентрации ацетонитрила в 0.05 M LiClO<sub>4</sub> от 0 до 40% за 40 мин, скорость элюции 3 мл/мин.

Значения коэффициентов молярного поглощения ( $\epsilon_{260}$ ) олигонуклеотидов рассчитывали с помощью компьютерной программы Oligos, использующей динуклеотидный метод [28].

Интенсивность падающего на образцы света определяли с помощью люксметра Ю-117 [29].

**9-Антраценальдоксим** получали из 9-формилантрацена по методу [30]. Выход 82%, т. пл. 158–161°C (т. пл. 161°C [30]). <sup>1</sup>H-ЯМР CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>  $\delta$ , м. д., (J, Гц): 11.02 (с, 1H, =NCH), 9.22 (с, 1H, N=CHAr), 8.59 (с, 1H, H10), 8.50 (дд, 2H, J<sub>1,2</sub> = J<sub>8,7</sub> 9, J<sub>1,3</sub> = J<sub>6,8</sub> 3, H1, H8), 8.08 (дд, 2H, J<sub>3,4</sub> = J<sub>5,6</sub> 9, J<sub>2,4</sub> = J<sub>5,7</sub> 3, H4, H5), 7.57 (м, 4H, H2, H3, H6, H7).

**9-Аминометилантрацен гидрохлорид.** В 15 мл 2 M HCl в метаноле суспендировали 0.5 г (2.25 ммоль) оксима и 0.1 г Pd-черни в атмосфере водорода интенсивно перемешивали в течение 2 ч. Смесь фильтровали от катализатора, который затем промывали метанолом. Растворы объединяли, упаривали до объема 2–3 мл и продукт осаждали прибавлением 30 мл эфира. Осадок растворяли в метаноле и четыре раза повторяли пересаживание эфиром. Выход 0.21 г (38%), т. пл.



270–272°C. <sup>1</sup>H-ЯМР CD<sub>3</sub>OD δ, м.д., (J, Гц): 8.64 (с, 1H, H10), 8.37 (д, 2H, J<sub>1,2</sub> = J<sub>8,7</sub>, 9, H1, H8), 8.13 (дд, 2H, J<sub>3,4</sub> = J<sub>5,6</sub>, 9, J<sub>2,4</sub> = J<sub>5,7</sub>, 3, H4, H5), 7.71 (дт, 2H, J<sub>1,2</sub> = J<sub>7,8</sub>, 9, J<sub>2,4</sub> = J<sub>7,5</sub>, 1.5, H2, H7), 7.58 (дт, 2H, J<sub>3,2</sub> = J<sub>6,7</sub>, 9, J<sub>1,3</sub> = J<sub>4,6</sub>, 1.5, H3, H6), 5.17 (с, 2H, AgCH<sub>2</sub>N). УФ-спектр, λ<sub>max</sub>, нм (ε, М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>): 255 (150000), 332 (3000), 348 (6000), 365 (8500), 384 (7700).

**Олигонуклеотиды Т1, Т2, Т3 и Т4** и олигонуклеотиды-адреса были синтезированы *N*-фосфонатным методом [31]. Вычисленные значения коэффициентов молекулярного поглощения олигонуклеотидов (ε<sub>260</sub>, М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>): Т1 (199000), Т2 (196000), Т3 (262800) и Т4 (244400).

**Олигонуклеотидные конъюгаты (2), (3), (5), (6) и (9).** Фотореагент RN присоединяли по концевым фосфатам как описано в [19, 20]. Выход конъюгатов (2), (3), (5), (6) и (9) – 70–80%. УФ-спектр, λ, нм, (ε, М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>): (2) – 258 (110000), 310 (30000); (3) – 257 (108000), 310 (30000); (5) – 258 (100000), 310 (30000); (6) – 256 (100000), 310 (30000); (9) – 258 (66000), 309 (30000) – принимая, что во всех случаях конъюгат соответствует стехиометрическому соотношению олигонуклеотид/фотореагент – 1 : 1.

**Бензантраценовое олигонуклеотидное производное (1).** Этилендиаминовый спейсер присоединяли к 5'-концевому фосфату декануклеотида методом [32]. Олигонуклеотидное производное (1) получено аналогично [19]. Выход (1) – 65%. УФ-спектр, λ, нм, (ε, М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>): 258 (160000), 307 (55000), 367 (15000). Значение ε<sub>367</sub> определено по навеске. Спектр поглощения производного (1) соответствует стехиометрическому соотношению олигонуклеотид/сенсibilизатор – 1 : 1 и равен суперпозиции спектров поглощения олигонуклеотида и 1,2-бенз-3-фтор-9-метилантрацен-10-уксусной кислоты.

**Пиреновые производные декануклеотидов (4), (7) и антраценовое производное гептануклеотида (8)** получали и выделяли как описано в [21]. Продукты выделяли методом ВЭЖХ. Выходы конъюгатов (4), (7) – 60–80%. УФ-спектр, λ, нм, (ε, М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>): (4) – 256 (104000), 347 (26000); (7) – 258 (103000), 347 (26000). Значения ε<sub>347</sub> взяты из работы [21], где они были определены по навеске.

Выход конъюгата (8) – 75–80%. Спектр поглощения, λ, нм, (ε, М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>): 198 (150000), 255 (11000), 334 (25000), 350 (5500), 368 (8000), 388 (7500), если принять, что конъюгат соответствует стехиометрическому соотношению олигонуклеотид/сенсibilизатор – 1 : 1.

**Фотомодификация ДНК-мишеней.** Аликваты по 5 мкл реакционной смеси, содержащей 0.1–1 мкМ раствор ДНК-мишеней и 0.1–50 мкМ растворы олигонуклеотидных производных реагента и сенсibilизатора в 6 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 7.6), 0.2 М NaCl и 0.02 мМ EDTA, помещали в цилиндрические лунки иммунологических планшетов

диаметром 4 мм, закрывали крышками, термостатировали при 21°C и облучали светом ртутной лампы ДРК-120 осветителя КФ-4М (ЛОМО, Санкт-Петербург) через следующие наборы стеклянных светофильтров (λ, нм; W, мВт см<sup>-2</sup>): БС-7, СЗС-23 (365–580; 1.1); ЖС-10, СС-15 (400–440; 0.35) или конденсированным светом осветителя ОИ-18А (ЛОМО, Санкт-Петербург) через наборы стеклянных светофильтров (λ, нм; W, мВт см<sup>-2</sup>): БС-8, СЗС-23 (380–580; 10); ЖС-10, СЗС-23 (400–580; 8.5).

Уменьшение объема раствора образцов, связанное с испарением, не превышало 20%. После облучения образцы (2 мкл) смешивали с 5 мкл раствора 7 М мочевины, содержащего 0.1% бромфенолового синего и 0.1% ксиленианола FF, и анализировали методом 20% ПААГ-электрофореза (0.05 М Трис-борат, рН 7.4).

Экспонирование геля на рентгеновской пленке РМ-В с усиливающим экраном проводили в течение 8–24 ч при –10°C. Радиоавтографы гелей сканировали на лазерном денситометре 2222 Ultroskane-XL (ЛКВ, Швеция). Степень модификации и выход продуктов расщепления по основаниям ДНК-мишеней рассчитывали как отношение площадей пиков аддуктов и продуктов к сумме площадей пиков всех продуктов и пика исходной ДНК. Ошибка определения степени модификации, как правило, не превышала 10%.

Настоящая работа была поддержана Междисциплинарным грантом СО РАН по генной иммунизации и генотерапии и грантом INTAS-RFBR 95-0653.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Гайнутдинов Т.И., Тенетова Е.Д., Шишкин Г.В., Владов В.В. // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 31–39.
2. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. Design and targeted reactions of oligonucleotide derivatives. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994.
3. Vlassov V.V. // The Lock- and Key Principle / Ed. J.-P. Behr. New York: Wiley, 1994. P. 89–147.
4. Giovannangeli C., Thuong N.T., Helene C. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 4275–4281.
5. Grigoriev M., Praseuth D., Guieysse A.L., Robin P., Thuong N.T., Helehe C., Harel-Bellan A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 3501–3505.
6. Gunter E.J., Havre P.A., Gasparro F.P., Glazer P.M. // Photochem. Photobiol. 1996. V. 63. P. 207–212.
7. Li H., Fedorova O.S., Trumble W.R., Fletcher T.R., Czuchajowsky L. // Bioconjugate Chem. 1997. V. 8. P. 49–56.
8. Mastruzzo L., Woisard A., Ma D.D.F., Rizzarelli E., Favre A., LeDoan T. // Photochem. Photobiol. 1994. V. 60. P. 316–322.
9. Boutorine A.S., Brault D., Takasugi M., Delgado O., Helene C. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 9469–9476.

10. Magda D., Wright M., Miller R.A., Sessler J.L., Samson P.I. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 3629–3630.
11. Magda D., Miller R.A., Wright M., Rao J., Sessler J.L., Iverson B.L., Samson P.I. // *DNA and RNA Cleavers and Chemotherapy of Cancer and Viral Diseases* / Ed. B. Meunier: NATO ASI Series; Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1996. V. 479. P. 337–354.
12. Koshkin A.A., Kropachev K.Yu., Mamaev S.V., Bulychev N.V., Lohov S.G., Vlassov V.V., Lebedev A.V. // *J. Mol. Recogn.* 1994. V. 7. P. 177–188.
13. Chatterjee M., Rokita S.E. // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. V. 116. P. 1690–1699.
14. Breslin D.T., Coury J.E., Anderson J.R., McFail-Isom L., Kan Y., Williams L.D., Bottomly L.A., Shuster G.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. V. 119. P. 5043–5044.
15. Armitage B., Koch T., Frydenlund H., Orum H., Batz H.G., Schuster G.B. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4674–4674.
16. Fisher W.G., Partridge W.P., Dees C., Wachter E.A. // *Photochem. Photobiol.* 1997. V. 66. P. 141–155.
17. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Гайнутдинов Т.И., Лукъянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // *Биоорган. химия.* 1997. Т. 23. С. 557–563.
18. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Лукъянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // *Докл. РАН.* 1995. Т. 344. С. 122–125.
19. Vlassov V.V., Dobrikov M.I., Gaidamakov S.A., Gaidamakova E.K., Gainutdinov T.I., Koshkin A.A. // *DNA and RNA Cleavers and Chemotherapy of Cancer and Viral Diseases* / Ed. B. Meunier: NATO ASI Series; Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1996. V. 479. P. 195–210.
20. Dobrikov M.I., Gaidamakov S.A., Gaidamakova E.K., Gainutdinov T.I., Koshkin A.A., Vlassov V.V. // *Antisense Nucl. Acid Drug Develop.* 1997. V. 7. P. 309–317.
21. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Гайнутдинов Т.И., Лукъянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // *Биоорган. химия.* 1997. Т. 23. С. 191–199.
22. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Гайнутдинов Т.И., Тенетова Е.Д., Шишкин Г.В., Власов В.В. // *Докл. РАН.* 1998. Т. 358. С. 403–407.
23. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Шишкин Г.В., Власов В.В. // *Биоорган. химия.* 1998. Т. 24. С. 831–838.
24. Levina A.S., Tabatadze D.R., Dobrikov M.I., Shishkin G.V., Khalimskaya L.M., Zarytova V.F. // *Antisense Nucl. Acid Drug Develop.* 1996. V. 6. P. 119–126.
25. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Левина А.С., Халимская Л.М., Шишкин Г.В. // *Биоорган. химия.* 1996. Т. 22. С. 200–207.
26. Leyshon L.J., Reiser A. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2.* 1972. P. 1918–1927.
27. Казанцев А., Максакова Г.А., Федорова А.С. // *Биоорган. химия.* 1995. Т. 21. С. 767–773.
28. Cantor C.R., Tinoko J. // *J. Mol. Biol.* 1965. V. 13. P. 65–77.
29. Соколов М.В. *Прикладная биофотометрия.* М.: Наука, 1982. С. 79–116.
30. Kenneth W.B., Tuttle R.L., Knick V.C., Cory M., McKee D.D. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. P. 2385–2393.
31. Веньямина А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н. // *Биоорган. химия.* 1990. Т. 16. С. 941–950.
32. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Халимская Л.М. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. С. 475–481.

## Sensitized DNA Photomodification by Binary Systems of Oligonucleotide Conjugates. V. The Target DNA Sequence Effect and the Quantitative Photomodification

M. I. Dobrikov<sup>#</sup>, S. A. Gaidamakov, T. I. Gainutdinov, T. M. Ivanova, and V. V. Vlassov

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

A sensitized photomodification of several single-stranded target DNAs by binary systems of oligonucleotide conjugates complementary to the adjacent regions of DNA was performed. One of the conjugates contained a sensitizer (pyrene, anthracene, or 1,2-benzanthracene), and another conjugate contained a photoreagent 4-azidotetrafluorobenzalhydrazone. The sensitized photomodification is initiated by irradiation at 365–580 nm due to effective energy transfer from the excited sensitizer to the photoreagent in a complementary complex of the binary system with the target DNA where the sensitizer and photoreagent are brought sterically together. Conditions for the quantitative photomodification of a single-stranded DNA by the binary system of oligonucleotide conjugates were found. The maximum degree of photomodification depends on the number of guanine residues in the (pG)<sub>n</sub> sequence of the target DNA at the modification site: at  $n = 1$  the yield of covalent adducts was 62–68%, at  $n = 2$ , 75–82%, and at  $n = 4$ , 98–99%.

*Key words:* antisense oligonucleotides, DNA photomodification, energy transfer, sensitization

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed.