

Конструирование реагентов для направленного расщепления рибонуклеиновых кислот

В.Н.Сильников, В.В.Власов

Новосибирский институт биоорганической химии

Сибирского отделения Российской академии наук

630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8, факс (383)233–3677

Систематизированы и обобщены литературные данные по исследованию соединений, способных расщеплять рибонуклеиновые кислоты в физиологических условиях. Рассмотрена возможность конструирования реагентов для направленного расщепления рибонуклеиновых кислот по определенным нуклеотидным последовательностям. Библиография — 245 ссылок.

Оглавление

I. Введение	562
II. Общие вопросы конструирования реагентов для направленного расщепления рибонуклеиновых кислот	563
III. Катализаторы расщепления рибонуклеиновых кислот	563
IV. Реагенты, расщепляющие рибонуклеиновые кислоты по определенным участкам структуры	571

I. Введение

Реагенты, способные эффективно и специфично расщеплять нуклеиновые кислоты (НК), используются в молекулярно-биологических исследованиях, а также в генной инженерии и генотерапии. На их основе могут быть получены биологически активные вещества ген-направленного действия, способные подавлять или модулировать экспрессию определенных генетических программ. Такие вещества позволяют воздействовать на первооснову патологических состояний.^{1–4} Исследования в этом направлении могут совершить переворот в стратегии лечения практически всех заболеваний.

Создание реагентов, расщепляющих НК — весьма непростая задача, поскольку реакции расщепления должны протекать в физиологических или близких к ним условиях. Препараты, используемые в качестве терапевтических средств, должны действовать строго избирательно на выбранные последовательности в составе определенных видов НК, при этом побочные процессы необходимо исключить. Эффективность протекания реакции с целевой НК должна быть высокой для возможно более полного подавления ее функционирования.

В настоящее время в этой области ведутся интенсивные исследования. Для расщепления ДНК используют главным образом следующие типы соединений.

1. Соединения, содержащие в качестве реакционноспособных групп комплексы металлов с переменной валентностью. Последние катализируют окислительные процессы, приводящие к разрушению нуклеозидов.^{5–7}

2. Ендины, способные в определенных условиях генерировать бирадикальные частицы, которые реагируют с обеими цепями ДНК и вызывают разрывы цепей.⁸

3. Алкилирующие реагенты, реакции с которыми ослабляют гликозидную связь в модифицированных нуклеозидах и тем самым разрушают их.^{9,10}

В последние годы широкое распространение получили реагенты, расщепляющие ДНК по механизму фотоокисления,^{11,12} а также реагенты на основе природных и синтетических металлонезависимых антибиотиков (варацин, лизо-клинотоксин и др.), генерирующих гидроксильные радикалы.¹³ Механизмы гидролиза ДНК, происходящего в результате взаимодействия радикальных частиц с различными элементами НК, подробно рассмотрены в обзорах^{5,14,15}.

В отличие от ДНК, РНК проявляют значительно большую устойчивость к окислительному расщеплению¹⁶ (в частности, под действием металлозависимых антибиотиков, таких как блеомицин,^{17,18} и ендиновых антибиотиков, таких как неокардиостатин, эсперамицин и др.¹⁹) вследствие большей стабильности гликозидной связи в рибонуклеотидах по сравнению с дезоксирибонуклеотидами. В то же время РНК гораздо легче подвергаются гидролитическому расщеплению.

К настоящему времени накоплен обширный материал по изучению механизмов расщепления РНК различными соединениями и по разработке катализаторов для направленного расщепления РНК, который требует обобщения и анализа.

Чрезвычайно интересным направлением в области создания реагентов для направленного воздействия на НК является конструирование рибозимов — катализаторов на основе РНК и ДНК. Различные классы рибозимов, методы их конструирования и механизмы расщепления ими РНК под-

В.Н.Сильников. Кандидат химических наук, заведующий лабораторией органического синтеза НИБХ СО РАН.

Телефон: (383)233–3762, e-mail: Silnik@niboch.nsc.ru

В.В.Власов. Академик, директор того же института.

Телефон: (383)233–3328.

Область научных интересов авторов: биоорганическая химия, молекулярная биология.

Дата поступления 11 июля 2000 г.

робно представлены в обзорах^{20–24}, поэтому здесь рассматриваться не будут.

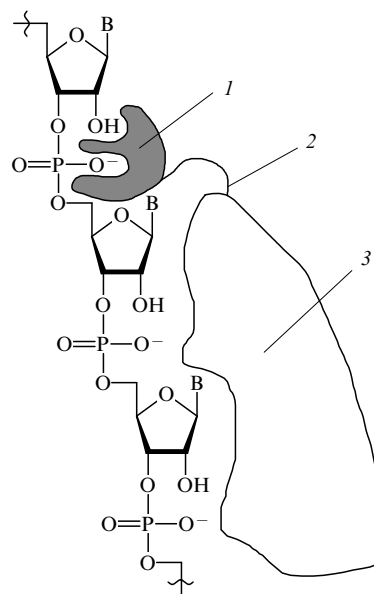
Состояние исследований в области создания искусственных катализаторов, в которых группировки, катализирующие гидролиз фосфодиэфирных связей, входят в состав конъюгатов с олигонуклеотидами, пептидами и интеркалирующими соединениями, систематически не рассматривалось. Настоящий обзор, посвященный основным классам соединений, способных катализировать деполимеризацию РНК в физиологических условиях, и получению на их основе «синтетических рибонуклеаз» для направленного расщепления определенных последовательностей рибонуклеиновых кислот, призван восполнить этот пробел.

II. Общие вопросы конструирования реагентов для направленного расщепления рибонуклеиновых кислот

Соединения, способные избирательно расщеплять РНК по определенным участкам структуры, должны, подобно ферментам, содержать два домена: РНК-связывающий, который может образовывать специфический комплекс с определенными участками РНК (целевыми участками), и РНК-гидролизующий, осуществляющий гидролиз фосфодиэфирных связей вблизи участков связывания или в их пределах (рис. 1). Селективность связывания с РНК могут обеспечивать некоторые пептиды, образующие комплексы с определенными нуклеотидными последовательностями или элементами трехмерной структуры РНК, а также низкомолекулярные органические соединения, такие как интеркаляторы,²⁵ поликатионы²⁶ и аминогликозиды.²⁷ Некоторые аспекты взаимодействия низкомолекулярных лигандов с НК рассмотрены в работах^{28–30}. Наиболее перспективными аффинными структурами для направленного воздействия на НК являются олигонуклеотиды и их аналоги. Комплементарный олигонуклеотид может быть направлен на любую представляющую интерес нуклеотидную последовательность. Дополнительным преимуществом таких реагентов является то, что все они могут быть синтезированы по универсальной технологии. Нуклеотидные последовательности длиной 15–20 звеньев являются уникальными даже в сложноорганизованных геномах. При этом такая длина комплементарных олигонуклеотидов оказывается достаточной для обеспечения узнавания и эффективного связывания в физиологических условиях с РНК-мишенью. В последние годы разработан ряд аналогов олигонуклеотидов, устойчивых к клеточным ферментам и способных образовывать с нуклеиновыми кислотами комплексы более прочные, чем комплексы природных олигонуклеотидов.^{31–36}

В качестве групп, расщепляющих РНК, могут быть использованы природные РНК-гидролизующие соединения — ферменты и антибиотики. Так, на основе олигодезоксирибонуклеотидов и природных ферментов — рибонуклеаз A, S^{37,38} и H^{39,40} — были синтезированы соединения, способные избирательно расщеплять РНК вблизи последовательностей, которые связывают конъюгаты. Однако ферменты, помимо каталитических центров, содержат собственные РНК(ДНК)-связывающие аффинные структуры, что неизбежно сказывается на специфичности таких конъюгатов и вызываемых ими эффектов в биологических системах. Это обстоятельство, а также сложность синтеза таких конъюгатов позволяют считать использование в качестве реакционноспособных групп ферментов и природных антибиотиков малоперспективным.

Предпочтительными являются РНК-гидролизующие фрагменты или реакционноспособные группы, свойства которых в минимальной степени сказываются на узнавании конъюгатом нуклеиновой кислоты.



В — остаток гетероциклического основания.

Рис. 1. Общее строение синтетических рибонуклеаз.

1 — РНК-гидролизующий фрагмент или реакционноспособная группа, 2 — линкер, 3 — РНК-связывающий фрагмент.

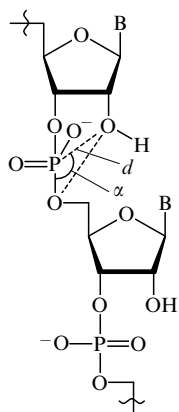
III. Катализаторы расщепления рибонуклеиновых кислот

Наличие в структуре РНК 2'-гидроксильных групп создает возможность гидролитического расщепления этих биополимеров по механизму внутримолекулярной переэтерификации. Расщепление РНК по этому механизму широко распространено в природе, например в реакциях, катализируемых рибонуклеазами и рибозимами. При конструировании химических реагентов для расщепления РНК логично использовать процессы, протекающие в активных центрах рибонуклеаз и рибозимов.

Следует учитывать, что высокая эффективность природных ферментов обеспечивается функционированием сложноорганизованных активных центров, возникших в ходе длительной эволюции, в то время как реакционноспособные группы, формирующие каталитический центр, как правило, сами по себе являются слабыми катализаторами соответствующих процессов. При конструировании искусственных катализаторов для воздействия на биополимеры очень важным фактором является обеспечение необходимого пространственного расположения всех участников каталитического процесса путем использования соответствующих линкерных групп.

1. Механизм гидролитического расщепления рибонуклеиновых кислот

Многие белковые ферменты и рибозимы расщепляют рибонуклеиновые кислоты по реакции внутримолекулярной переэтерификации, протекающей за счет нуклеофильной атаки по атому фосфора кислородом 2'-гидроксильной группы. Возможны два стереохимических механизма протекания этой реакции. Первый механизм реализуется, когда угол α (рис. 2) близок к 180° , а расстояние d между реагирующими группами $< 3 \text{ \AA}$ (линейный механизм), второй — когда угол α близок к 90° (смежный механизм). В первом случае реализуется механизм AE (аналог механизма S_N2); в случае второго механизма требуется дополнительная стадия — перемещение



В — остаток гетероциклического основания

Рис. 2. Основные параметры, определяющие реакционную способность фосфодиэфирных связей в РНК.

d — расстояние 2'-O—P в Å, α — угол 5'-O—P—3'-O.

уходящей группы из экваториального положения в апикальное (псевдовращение).⁴¹ Псевдовращение постулируют для гидролиза ряда модельных соединений.^{42–44} Предполагают также, что с участием псевдовращения протекает 3' → 2'-изомеризация в рибонуклеотидах.⁴⁵ Однако во всех случаях, когда был установлен механизм каталитического расщепления РНК под действием рибозимов или белковых катализаторов, гидролиз протекал по линейному механизму. Возможные механизмы гидролитического расщепления РНК в различных условиях детально рассмотрены в ряде обзоров и оригинальных работ^{45–47}. В работе⁴⁸ проанализированы структурные параметры участков некоторых РНК, в которых спонтанный гидролиз происходит с повышенной вероятностью. В качестве интегральной величины, характеризующей стабильность фосфодиэфирных связей в последовательностях РНК, был введен безразмерный параметр F , изменяющийся в диапазоне от 0 до 1 (обозначения α и d см. рис. 2).

$$F = \frac{\alpha - 45}{180 - 45} \left(\frac{3\text{Å}}{d} \right)^3,$$

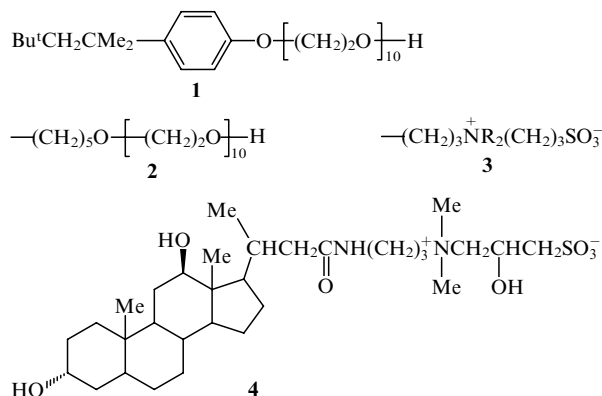
Оказалось, что величина параметра F , характеризующего взаиморасположение в пространстве атома кислорода 2'-гидроксильной группы, атома фосфора и атома кислорода на 5'-конце уходящего нуклеотида, хорошо коррелирует со стабильностью межузловидных связей. Точкам спонтанного гидролиза соответствовали структурные элементы с $F = 0.5–0.8$, а для стабильных участков величина параметра F составляла 0.1–0.15. Редким исключением являлись гидролитически лабильные сайты с низким значением параметра F . Как правило, в таких сайтах гетероциклические основания образуют либо неканонические пары GA, либо последовательности CpA(UrA) в одноцепочечных участках, в которых, по-видимому, могут возникать, но не фиксируются методами ЯМР и РСА, короткоживущие структуры, способные расщепляться по линейному механизму.

Низкое значение параметра F характерно также для двуцепочечных участков РНК, фосфодиэфирные связи в которых отличаются повышенной стабильностью.

Следует отметить, что существуют экспериментальные данные о повышенной гидролитической лабильности некоторых последовательностей в РНК, которые в настоящее время не имеют объяснения. Так, по не вполне ясным причинам наиболее легко расщепляются фосфодиэфирные связи в последовательностях CpA(UrA) в одноцепочечных структу-

рах РНК.⁴⁹ Такие последовательности в коротких одноцепочечных олигорибонуклеотидах подвергаются расщеплению в присутствии разнообразных белков (Т7 РНК полимеразы, Т4 полинуклеотид киназа, лизозим, трипсин) и в присутствии некоторых полимеров, таких как полиэтиленгликоль, декстран и поливинилпирролидон.^{50–52} Эффективность расщепления зависит от длины олигонуклеотида и от природы фланкирующих нуклеотидов. Так, отношение скоростей гидролиза связи в последовательности UA для GUAC, GUAU, CGUA составляет 1:6:16, а в последовательности GUAA, CGUAA, UCGUAA — 1:4:6. Изменение нуклеотидного остатка X на 5'-конце в тетрапептиде XUAA почти не сказывается на скорости гидролиза, в то время как эффективность расщепления GUAX уменьшается в ряду X = G > A > U > C в 3 раза.⁵³

Было также показано, что последовательности UpA и CpA в петлевых участках структуры РНК расщепляются в присутствии неионных (третон X-100 (1), генапол X-100 (2)) или цвиттерионных (цвиттергент 3–10 (3)) или производное амида хлорной кислоты (4)) детергентов в концентрациях, соответствующих критическим концентрациям мицеллообразования.⁵⁴ Эффективность гидролиза не зависит от размера мицелл. Максимальная скорость гидролиза достигается при размере петли в 5 нуклеотидных звеньев.⁵⁰ Анионные детергенты, такие как додецилсульфат натрия или дезоксихолевая кислота, подавляют расщепление.



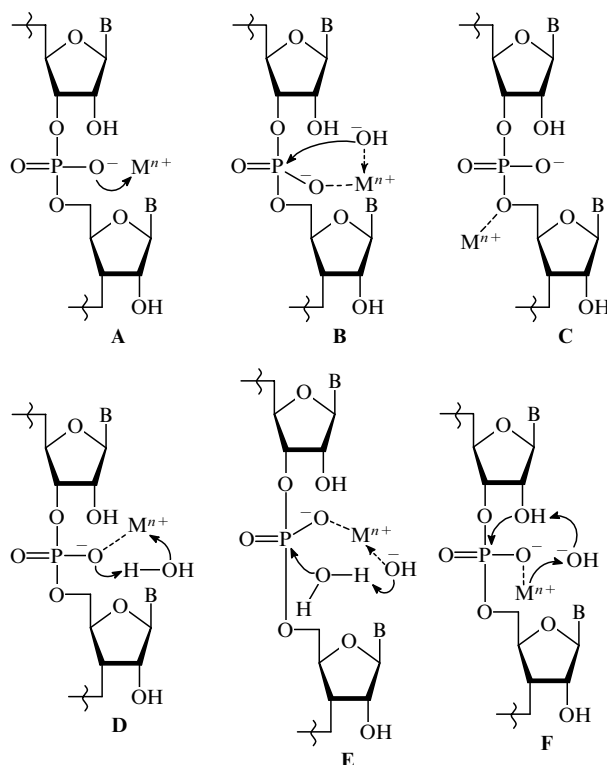
Можно предположить, что соединения 1–4 влияют на структуру РНК таким образом, что в некоторых ее участках, а именно в последовательностях пиримидин–пурин, происходит внутримолекулярное сближение кислорода 2'-гидроксильной группы рибозы с межузловидным фосфатом и увеличение угла α . При этом реализуется наиболее благоприятная геометрия для протекания самопроизвольного расщепления фосфодиэфирных связей. Однако до настоящего момента неясны как механизм этого взаимодействия, так и причины повышенной лабильности CpA- и UpA-мотивов.

2. Гидролиз рибонуклеиновых кислот с участием ионов металлов и металлокомплексов

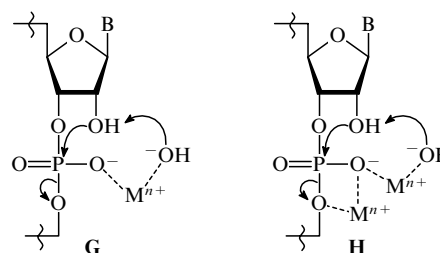
В настоящее время накоплен обширный материал по гидролизу рибонуклеиновых кислот с участием ионов различных металлов. Наиболее изученными в реакции деструкции рибонуклеиновых кислот являются ионы Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Ln^{3+} и других лантанидов. Некоторые из них способны вызывать расщепление РНК в физиологических условиях.

Ионы металлов входят в состав активных центров многих ферментов, гидролизующих фосфодиэфирные связи, таких как фосфомоно-,⁵⁵ фосфоди-^{56,57} и фосфотриэстеразы.⁵⁸ В ряде случаев они являются необходимыми кофак-

торами для функционирования рибозимов, принимая участие в химическом катализе расщепления фосфодиэфирных связей.⁵⁹ Ниже представлены схемы расщепления фосфодиэфирных связей в РНК с участием ионов металлов. Выступая в качестве кислоты Льюиса, ионы металлов могут участвовать в каталитическом процессе, непосредственно взаимодействуя с кислородом фосфатной группы (А),⁶⁰ с нуклеофилом (например, с гидроксид-анионом) (В)⁶¹ или с кислородом уходящей группы (С). Помимо этого, ионы металлов могут принимать участие в катализе опосредованно: либо координировать молекулу воды и выступать в роли внутримолекулярного общего кислотного катализатора (D), либо координировать гидроксид-анион и выступать в роли внутримолекулярного общего основного катализатора (E, F).^{62, 63}



Очевидно, при гидролитическом расщеплении РНК различными ионами металлов может реализоваться тот или иной механизм или их сочетание. Предложены две основные модели участия ионов металлов в гидролизе фосфодиэфирных связей. Согласно модели G, в каталитической реакции принимают участие ион металла и координированный с ним анион гидроксила.^{64–68} Модель H основывается на механизме, принятом для таких природных ферментов, как щелочная фосфатаза и ДНК полимераза I,^{57, 69} и предполагает участие двух ионов металла, один из которых координирует гидроксильную группу, а второй — активирует атом кислорода уходящей группы. Большинство результатов, полученных при изучении катализируемого ионами металлов гидролиза РНК, могут быть интерпретированы на основе как модели G, так и модели H.⁷⁰ Аргументом в пользу механизма реакции с участием одного иона металла следует считать данные РСА для некоторых рибозимов.^{64, 71} Однако сообщения о значительном ускорении гидролиза РНК под действием пар ионов металлов $Mg^{2+} - Pb^{2+}$ (см.⁷²), $Nd^{3+} - Pb^{2+}$ (см.^{73, 74}) и $La^{3+} - Fe^{3+}$, $La^{3+} - Sn^{4+}$ (см.⁷⁵) могут быть интерпретированы только в рамках модели H.



На примере динуклеотида ApA было показано, что фосфодиэфирная связь может гидролизываться как под действием гидроксид-аниона La^{3+} (см.⁷⁶), так и под действием двухядерного гидроксид-аниона $[La_2(OH)]_5^+$ (см.⁷⁷). При этом скорость гидролиза возрастает на четыре порядка при переходе от моно- к двухядерному комплексу.⁷⁸ Можно предположить, что гидролиз в зависимости от условий реакции может протекать с участием как одного, так и двух ионов металла. В рамках всех предложенных механизмов более эффективными катализаторами гидролитического расщепления должны быть ионы металлов, являющиеся более сильными кислотами Льюиса и обладающие большей координационной сферой. В связи с этим повышенное внимание должно быть направлено на изучение расщепления фосфодиэфирных связей ионами Ce^{4+} (см.⁷⁹) и Zr^{4+} (см.^{80, 81}).

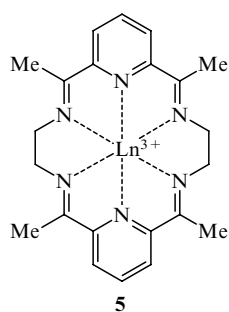
Скорость катализируемого ионами металлов гидролиза фосфодиэфирных связей в РНК зависит от природы фланкирующих нуклеозидов. Так, в растворе соли Tm^{3+} ($0.01 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) гидролиз фосфодиэфирной связи в ApA происходит в 4.8–5.1 раз быстрее, чем в UpU.⁸² При изучении гидролиза шести различных пар нуклеотидов (UpG, CpC, GrA, ApU, UpA, ApA) в растворе соли Lu^{3+} ($0.01 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) было обнаружено, что скорость реакции для наиболее быстро гидролизующегося динуклеотида UpG в 2.2 раза выше скорости реакции для наиболее стабильного в этих условиях ApA.⁸² Наличие 3'-концевой фосфатной группы значительно ускоряет гидролиз межнуклеотидной фосфатной связи в динуклеотидах, возможно, за счет более эффективного связывания катионов. Так, гидролиз фосфодиэфирной связи в ApAr в присутствии ионов Zn^{2+} происходит быстрее, чем в ApA. В то же время наличие 2'-концевой фосфатной или 2',3'-циклофосфатной группы незначительно влияет на скорость гидролиза.⁸³ Аналогичные результаты были получены в других исследованиях.^{84, 85} Показано, что в олигодезоксинуклеотидах, содержащих на 5'-конце рибонуклеотидное звено — $Up(Tr)_nTr$ или $Up(Tr)_nT$ ($n = 0-4, 7$), — 3'-концевая фосфатная группа ускоряет гидролиз, даже если она удалена на семь нуклеотидных звеньев.⁸⁶ Вероятно, наблюдаемое 5–20-кратное ускорение гидролиза поли(U) по сравнению с UpU под действием ионов Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} и Zn^{2+} можно объяснить полиэлектролитным эффектом суммарного отрицательного заряда поли(U).⁸⁷

Способность ионов металлов ускорять гидролиз может меняться в широких пределах в зависимости от природы субстрата. Так, активность ионов металлов в реакции гидролиза ApA убывает в ряду: $Tm = Lu > Y > Nd = Eu = Sm > Ce = Sc = Gd = Tb > Pr = Dy > Ho = Er > Yb > La$.⁷⁶ В то же время при гидролизе 3',5'-циклоаденозинмонофосфата (являющегося одним из промежуточных продуктов гидролиза ApA) в аналогичных условиях активность ионов металлов убывает в ряду: $Ce \gg Pr > Nd = La > Y = Sm = Dy > \text{другие лантаниды}$.⁸⁸

Очевидно, различия в скорости гидролиза в динуклеотидных парах, как и в более сложных объектах, определяются разной комплексообразующей способностью различных фрагментов нуклеиновых кислот. Подробно вопросы комплексообразования ионов металлов с нуклеиновыми кислотами рассмотрены в обзоре.⁸⁹

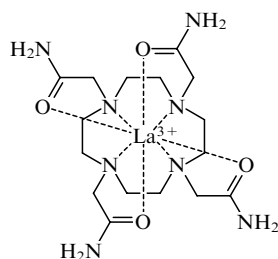
Гидролиз РНК в присутствии ионов различных металлов широко используют для выявления участков связывания катионов в структуре нуклеиновых кислот.^{90–94} Ионы магния, свинца и лантанидов могут катализировать избирательное расщепление фосфодиэфирных связей в области некоторых специфических элементов пространственной структуры РНК.^{95–99} Чувствительность этих реакций к ориентации лигандов использовали для изучения структуры РНК в растворе и сравнения пространственной организации мутантных тРНК и 5SPHK.^{100, 101} Было показано,¹⁰² что в комплексах с олигодезоксинуклеотидами рибонуклеиновые последовательности не гидролизуются в присутствии комплексов Eu^{3+} и La^{3+} . Вероятно, это объясняется тем, что при образовании дуплекса ограничивается конформационная подвижность РНК, которая необходима для эффективного связывания ионов и протекания переэтерификации. В несовершенных комплексах петлевые одноцепочечные участки расщепляются с большой скоростью.¹⁰³ Детально исследовано влияние нуклеотидной последовательности и размера петлевого участка на эффективность гидролиза РНК в присутствии ионов Pb^{2+} , Zn^{2+} и металлокомплексов на их основе.¹⁰⁴ Было показано, что эффективность гидролитического расщепления возрастает с увеличением размера петли и удалением гидролизуемой фосфодиэфирной связи от стеблевого фрагмента. Полученные результаты еще раз подтверждают необходимость конформационной подвижности подвергающегося гидролизу рибозофосфатного фрагмента.

Способность комплексов лантанидов,^{105, 106} меди,¹⁰⁷ цинка и ряда других металлов¹⁰⁸ катализировать гидролиз фосфодиэфирных связей позволяет рассматривать их в качестве потенциальных гидролитически активных групп для синтеза конъюгатов с органическими соединениями и олигонуклеотидами. Наиболее перспективными считаются ионы лантанидов, которые являются сильными кислотами Льюиса¹⁰⁹ и имеют гибкую геометрию координационной сферы.¹¹⁰ Конструирование металлокомплексов, обладающих высокой стабильностью и в то же время высокой кислотностью центрального атома, является противоречивой задачей. Тем не менее был получен ряд металлокомплексов (например, соединения **5–8**), обладающих высокой стабильностью при сохранении высокой активности в реакциях гидролиза.^{85, 106, 111, 112} Была показана возможность каталитического расщепления РНК в присутствии комплексов цинка(II)⁸⁵ и лантана(III).¹⁰⁶ Скорость гидролиза РНК в присутствии различных металлокомплексов зависит от pH. Это позволяет предположить, что, как и в случае свободных ионов металлов, гидролиз фосфодиэфирных связей, вероятно, происходит с участием двух молекул металлокомплекса, причем одна молекула выступает в роли кислоты Льюиса, а вторая координирует гидроксид-анион и выступает в роли основания.^{113, 114}

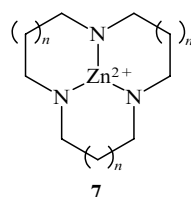


5

$\text{Ln} = \text{La}, \text{Eu}, \text{Tb}, \text{Lu}$.

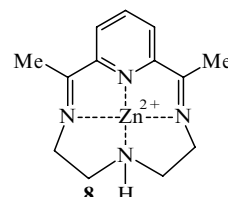


6



7

$n = 2, 3$.



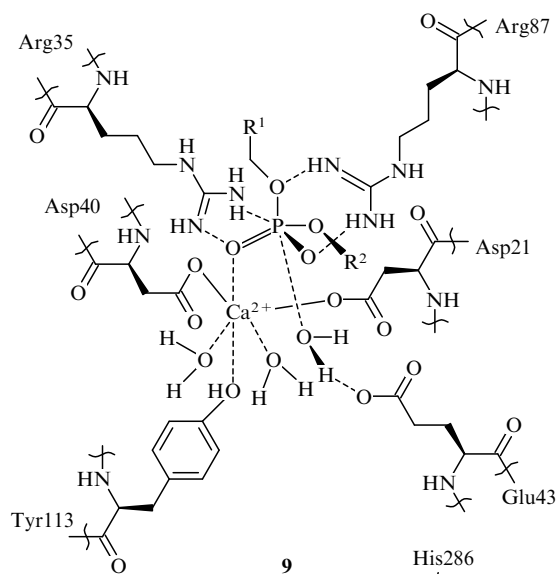
8

3. Реагенты, которые имитируют активные центры металлозависимых ферментов, катализирующих расщепление фосфоэфирных связей

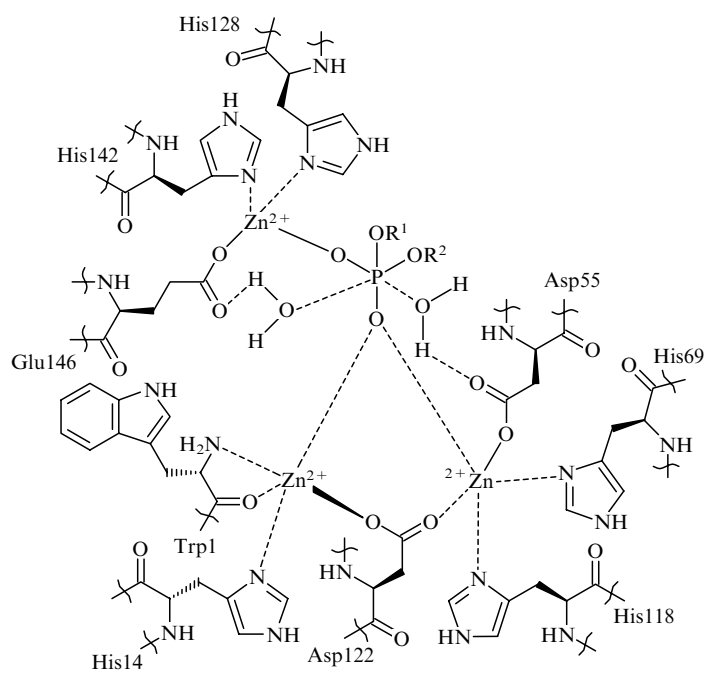
Гидролитические центры металлозависимых ферментов, гидролизующих фосфоэфирные связи в различных субстратах, часто содержат два комплексообразующих домена, сформированных аминокислотными остатками His, Asp(Asn), Glu, Arg, Lys (в различных сочетаниях) и одной из гидроксилсодержащих аминокислот — Ser или Thr. Расстояния между ионами металлов (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) в активных центрах составляют 3–5 Å. Кроме того, гидролитические центры могут содержать одну или несколько таких аминокислот, как Glu, Arg, Lys, His, Ser. Функциональные группы этих аминокислот непосредственно не связаны с ионами металлов и выполняют роль дополнительных основных, кислотных или нуклеофильных катализаторов (см. обзоры^{115–118}). Некоторые ферменты содержат в активном центре один (стафилококковая нуклеаза,¹¹⁹ нуклеаза Sm из *Serratia marcescens*¹²⁰) или более двух ионов металлов (нуклеаза P1).¹²¹ Ниже приведены основные структурные элементы активных центров природных металлозависимых ферментов, гидролизующих фосфоэфирные связи в различных субстратах и содержащих один–три иона металла: **9** — стафилококковая нуклеаза, **10** — фосфорилаза C из *Bacillus cereus* и **11** — пурпурная кислотная фосфатаза.

Успехи, достигнутые в синтезе стабильных металлокомплексов, наряду с успехами в области установления строения активных центров и механизмов функционирования ферментов, гидролизующих фосфоэфирные связи в различных субстратах, привели к появлению в последние годы целого ряда синтетических катализаторов, функционально и структурно моделирующих природные ферменты.^{122–124}

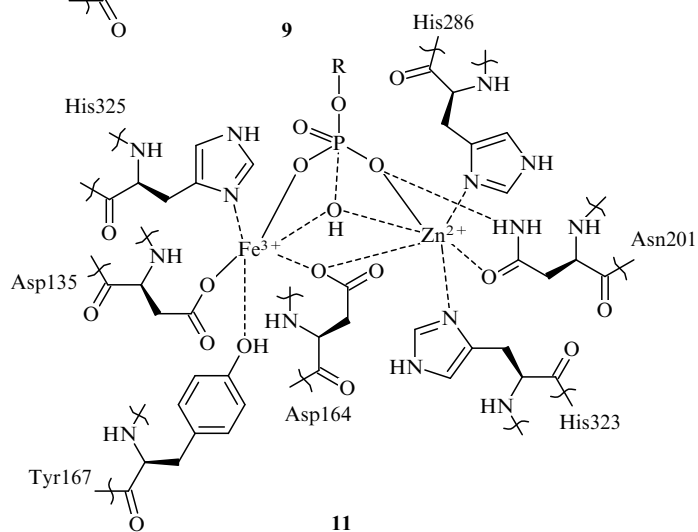
Были синтезированы двудерные металлокомплексы на основе ионов Zn^{2+} (см.^{125–127}), Cu^{2+} (см.^{128–130}), Co^{3+} (см.^{131, 132}), La^{3+} (см.^{133, 134}). Эффективность гидролиза в присутствии двудерных металлокомплексов оказалась значительно выше, нежели в случае их моноядерных аналогов, что особенно существенно для ионов Zn, являющихся слабой кислотой Льюиса и не катализирующих гидролиз в составе моноядерных комплексов.^{129, 135} Наиболее эффективными из полиядерных металлокомплексов, моделирующих активные центры природных ферментов, оказались соединения **12–16**. В частности, в присутствии комплекса **12**, являющегося структурной и функциональной моделью D-фруктоза-1,6-бисфосфат-1 фосфатазы, гидролиз фосфоэфирной связи в модельном субстрате протекает в 10^3 раз быстрее, чем в присутствии сходных комплексов кобальта.¹³² Аналогичные результаты получены для комплекса меди **13**, в присутствии которого скорость гидролиза фосфоэфирных связей в различных соединениях увеличивалась в $(1–2.7) \cdot 10^4$ раза.¹²⁹ Следует отметить, что при гидролизе природных субстратов в присутствии полиядерных металлокомплексов возможно взаимодействие ионов металлов не только с фосфатными остатками, но и с гетероциклическими основаниями, что приводит к появлению определенной субстратной специфичности у таких соединений. Так, при гидролизе рибонуклеозид-2',3'-циклофосфатов аденозина, гуанина, уридина, цитозина в присутствии двудерного комплекса меди **15**



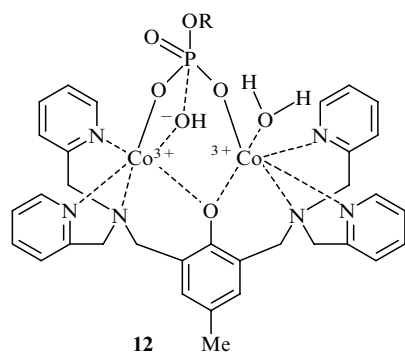
9



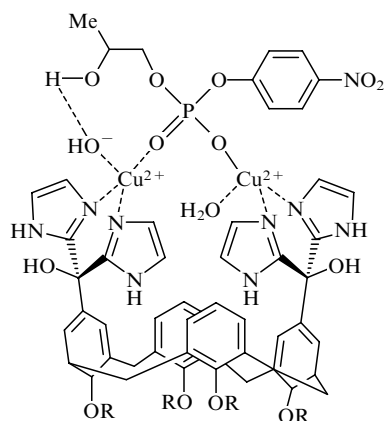
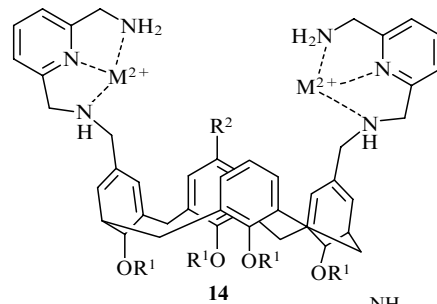
10



11

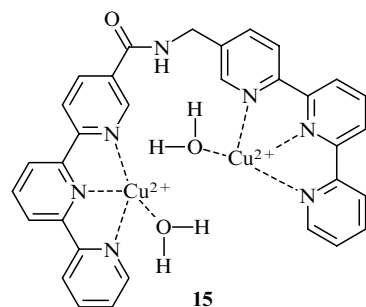


12

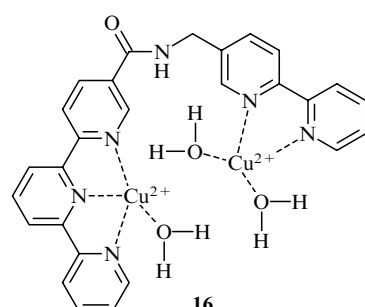
R = 4- $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$.13 (R = $(\text{CH}_2)_2\text{OEt}$)

14

$\text{R}^1 = (\text{CH}_2)_2\text{OEt}$; $\text{R}^2 = \text{H}$,
 $\text{M} = \text{Zn}, \text{Cu}$.



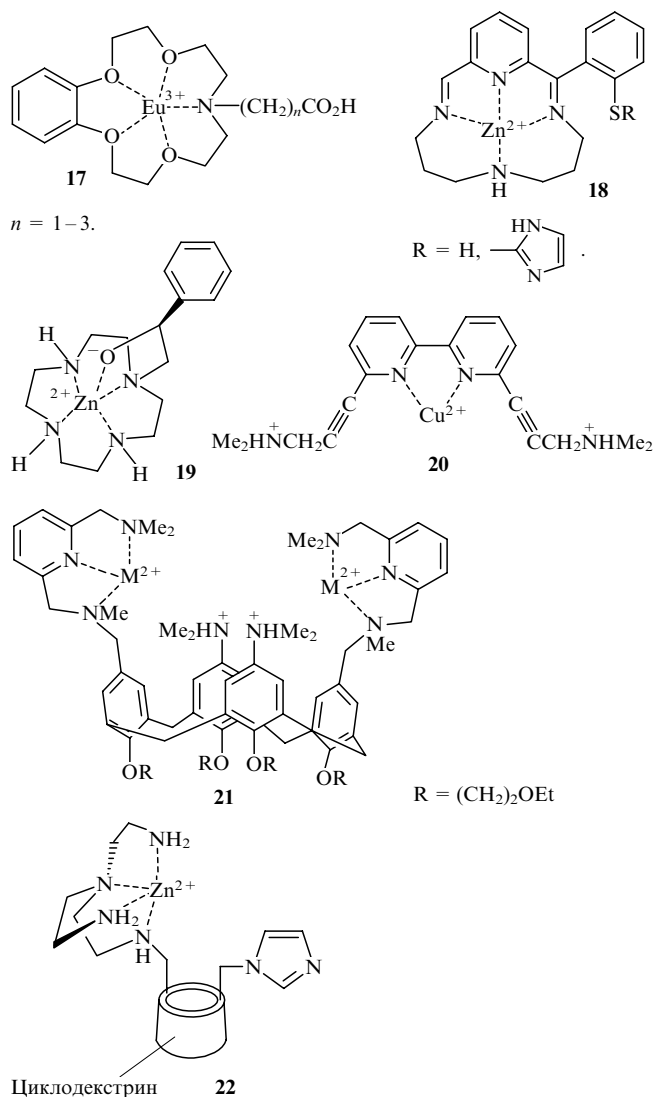
15



16

относительные скорости расщепления в ряду А, G, U, C равны 1.5, 8.5, 4.3, 1, а в присутствии комплекса **16** — 31.1, 1, 2.9, 5.1 соответственно.¹³⁰ При гидролитическом расщеплении рибодинуклеотидов в присутствии трехядерного комплекса цинка **14** соотношение скоростей между наиболее легко гидролизуемым динуклеотидом GrG и наиболее устойчивым — ArA — составило 163:1.¹³⁶

Ниже приведены соединения **17–22**, имитирующие гидролитические центры ферментов, которые содержат в активных центрах не связанные с ионами металлов функциональные группы, играющие роль кислотных (**20–22**), основных (**17, 18, 22**) или нуклеофильных (**19**) катализаторов.^{137–140}

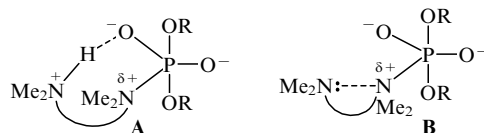


Моделирование центров таких ферментов требует более строгого взаиморасположения реакционноспособных групп в пространстве по сравнению с соединениями, которые содержат только ионы металлов, обладающие гибкими, объемными координационными сферами. В большинстве случаев соединения **17–22** оказались лишь ненамного эффективнее, чем базовые металлокомплексы. Возможно, это объясняется как раз неблагоприятным пространственным расположением реакционных центров. В том случае, когда расположение в пространстве всех участников каталитического процесса оптимально, эффективность расщепления возрастает в 10^3 – 10^4 раз.^{141, 142} Модели активных центров природных ферментов на основе металлокомплексов, содержащих дополнительные функциональные группы, которые

не участвуют в комплексообразовании, подробно обсуждены в обзоре¹⁴³.

4. Гидролиз рибонуклеиновых кислот аминсоединениями и катионными пептидами

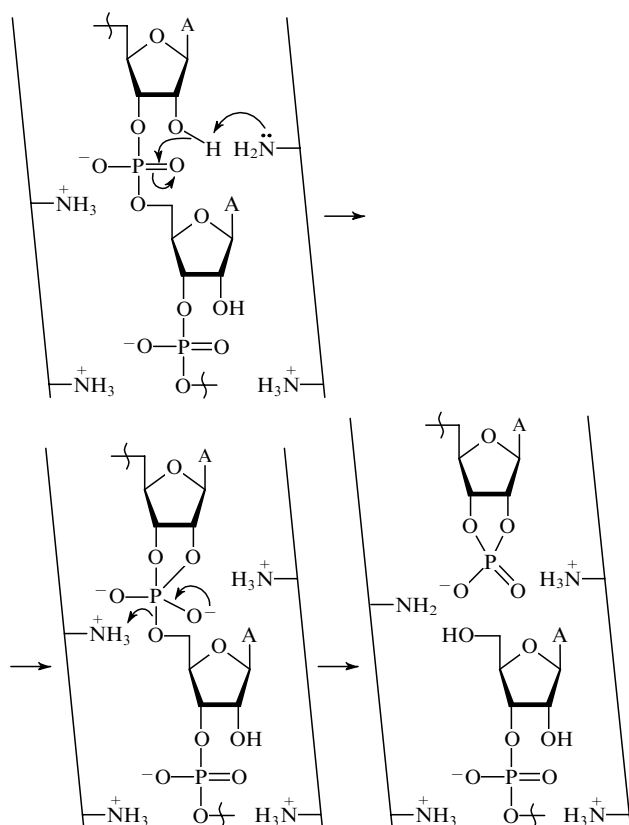
Гидролиз РНК катализируют различные аминсоединения.¹⁴⁴ В результате исследования гидролиза бис(4-нитрофениловых) и бис(2,4-динитрофениловых) эфиров фосфорной кислоты диаминами общей формулы $Me_2N(CH_2)_nNMe_2$ (**23a–c**) ($n = 1$ (**a**), 2 (**b**), 3 (**c**)) были предложены два возможных механизма расщепления фосфодиэфирных связей, один из которых (**A**) реализуется при гидролизе с участием диаминов в виде соответствующих монокатионов, а второй (**B**) — при участии нейтральных диаминов. Так, в присутствии диаминов **23a–c** в виде монокатионов наблюдается ускорение гидролиза по сравнению с гидролизом в присутствии триметиламина в 870, 74 и 190 раз соответственно. Кроме того, проявляется ожидаемый для общего кислотного катализа изотопный эффект при замене H_2O на D_2O ($k_H:k_D = 1.6$ для диамина **23a**). Значительно большей каталитической активностью (в 1400–2040 раз выше по сравнению с триметиламином) обладают диамины **23a–c** в нейтральной форме. Изотопный эффект при этом отсутствует. Вероятно, в этом случае свободная пара электронов второго атома азота электростатически стабилизирует положительный заряд, возникающий в ходе нуклеофильной атаки атома фосфора (переходное состояние **B**).¹⁴⁵



$R = 4-NO_2C_6H_4, 2,4-(NO_2)_2C_6H_3$.

В работе¹⁴⁶ исследован гидролиз поли(А), поли(С) и поли(У) в растворах полиаминов ($1-2$ моль \cdot л $^{-1}$), таких как этилендиамин, триэтилентетрамин и др. Оказалось, что наибольшей каталитической активностью обладает этилендиамин. При этом эффективность гидролиза ($50^\circ C$, 2 сут) в растворе этилендиамина (1 моль \cdot л $^{-1}$) уменьшается в ряду поли(А) > поли(У) > поли(С) (33, 28 и 16% соответственно). Поли(Г) в этих условиях не гидролизуются.¹⁴⁷

Слабая гидролитическая активность, проявляемая блеомицином (металлозависимым антибиотиком) в отсутствие ионов металлов, вероятно, объясняется наличием алифатических аминогрупп.¹⁴⁸ Регулярные пептиды, содержащие аргинин и(или) лизин способны ускорять гидролиз фосфодиэфирных связей в АрАр и поли(А).^{149–151} Наибольшую активность при гидролизе проявляют регулярные пептиды поли(Leu–Lys–Lys–Leu) и поли(Leu–Lys), способные формировать α -спирали и β -складки соответственно. В их комплексах с РНК достигается соотношение $Lys^+:PO_4^{2-} = 2:1$. Нарушение структуры полипептида введением пролина (Pro–Leu–Lys–Leu–Lys) или использованием D,L-изомеров (D,L-Leu–D,L-Lys) резко снижает каталитическую активность пептидов. Следует отметить, что гидролиз не ускоряют поли(His) и поли(Arg–Glu–Glu), а также ряд других регулярных пептидов, содержащих различные функциональные группы. Не была обнаружена активность также для дипептидов (Ac–Leu)–(Lys–NH $_2$). По-видимому, решающую роль в проявлении каталитической активности исследованных пептидов при гидролизе РНК играет совпадение расстояний между фосфатными остатками рибонуклеотида (6.2 Å) и положительными зарядами в поли(Leu–Lys–Lys–Leu) (6 Å) и поли(Leu–Lys) (6.9 Å) (рис. 3).^{152, 153}



A — остаток гетероциклического основания.

Рис. 3. Предполагаемый механизм гидролитического расщепления РНК под действием полизаряженных пептидов.

В целом, как полиамины, так и регулярные пептиды обладают низкой гидролитической активностью. Так, степень деполимеризации АрАр под воздействием наиболее

активного регулярного пептида — поли(Leu–Lys) — составляла 85% за 7 сут при 50°C (рН 8.0).¹⁵⁰ Степень деполимеризации поли(А), поли(У) и поли(С) под действием наиболее активных полиаминов менялась в интервале от 16 до 69% за 2 сут при 50°C (рН 8.0).¹⁴⁷

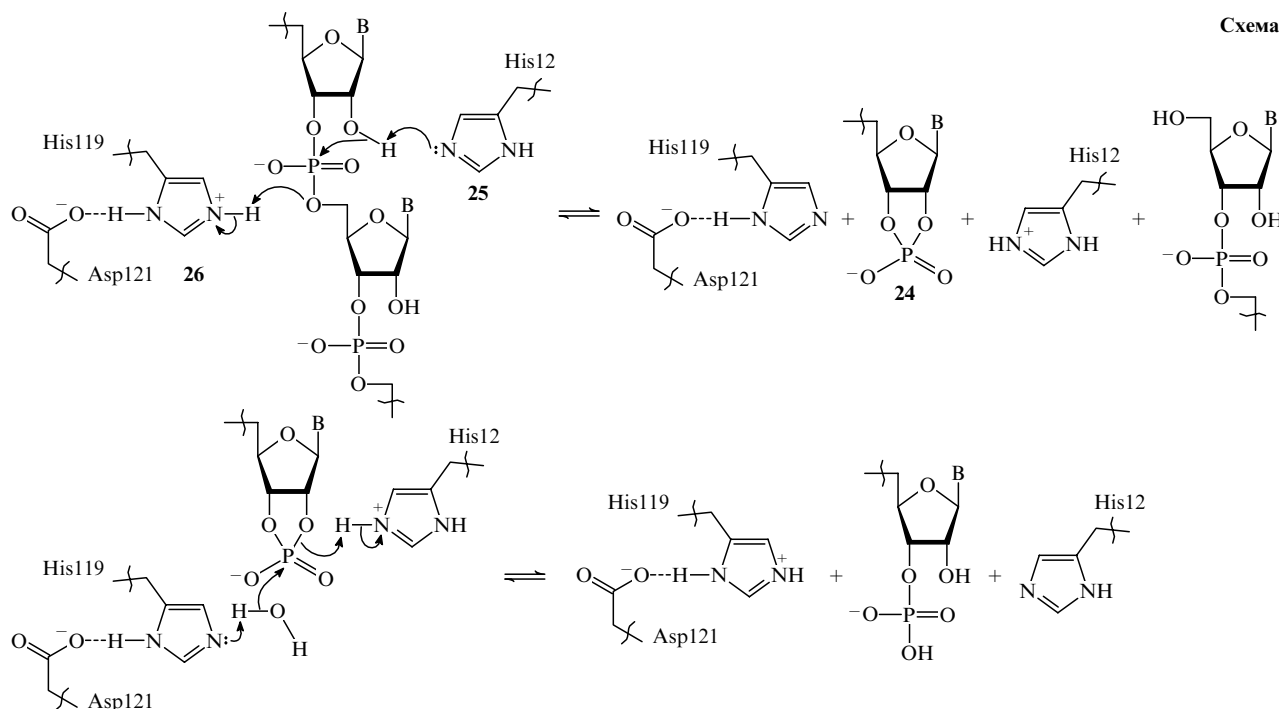
5. Реагенты, имитирующие активные центры металлoneзависимых рибонуклеаз

В настоящее время наиболее детально изученными металлoneзависимыми рибонуклеазами являются рибонуклеаза А и рибонуклеаза Т1. Установлено, что оба фермента расщепляют фосфодиэфирные связи в РНК по механизму внутри-молекулярной перестерификации с использованием кислотно-основного катализа. Схема «классического» двухступенчатого механизма кислотно-основного каталитического гидролиза фосфодиэфирных связей в рибонуклеиновых кислотах РНКазой А включает реакцию перестерификации с образованием циклического фосфодиэфира **24** и последующий его гидролиз. Ключевыми стадиями являются отрыв основанием **25** протона от 2'-гидроксильной группы рибозного остатка и перенос протона от фрагмента **26** на кислород уходящей группы (схема 1).^{154, 155} Детали взаимодействия аминокислотных остатков в активном центре как между собой, так и с субстратом постоянно уточняются.^{156–159}

Принципиальная возможность моделирования активных центров рибонуклеаз малыми молекулами была доказана Бреслоу с соавт.,¹⁶⁰ который обнаружил, что гидролиз РНК катализирует нейтральный концентрированный (1–2 моль·л⁻¹) имидазольный буфер. Он синтезировал конъюгат циклодекстрина с молекулами, содержащими остатки имидазола, который был способен катализировать гидролиз модельного субстрата — *трет*-бутилкatechol-1,2-циклофосфодиэфира.¹⁶¹

Гидролиз РНК имидазольными конъюгатами и имидазольным буфером протекает наиболее эффективно при рН 7, что соответствует, как и в случае рибонуклеазы А, механизму общего кислотно-основного катализа, т.е. в акте гидролиза участвует один протонированный и один непротонированный остаток имидазола. Из трех исследованных Бреслоу возможных изомеров бисимидазольных конъюга-

Схема 1



B — остаток гетероциклического основания.

тов циклодекстрина, каталитической активностью в гидролизе модельного фосфодиэфира обладал только один, имеющий оптимальное для расщепления фосфодиэфирной связи пространственное расположение имидазольных колец.¹⁶² Некоторые из конъюгатов циклодекстрина, содержащие различные сочетания имидазольных и аминогрупп, циклических и ациклических простых эфиров и металлокомплексов, также обладают фосфоэстеразной активностью по отношению к модельным субстратам.^{163–166} В работе¹⁶⁷ предложена структура, моделирующая рибонуклеазу А, в которой в качестве основания и донора протона выступал один и тот же остаток имидазола. Модель оказалась работоспособной в присутствии ионов цинка, стабилизирующих переходное состояние и увеличивающих электрофильность атома фосфора (структура **27**, схема 2). По мнению авторов,¹⁶⁷ в этом случае гидролитическое расщепление фосфодиэфирной связи в дирибонуклеотиде протекает по смежному механизму переноса (раздел III.1). Полагают, что в структуре **27** уходящая группа расположена достаточно близко к 2'-гидроксильной группе. После переноса протона от 2'-гидроксильной группы субстрата на имидазольный остаток и осуществления стадии псевдовращения происходит расщепление фосфодиэфирной связи с участием протона того же самого имидазольного остатка (интермедиат **28**). Такой механизм требует дополнительной стадии псевдовращения, однако может протекать при участии одного и того же гистаминового фрагмента в качестве акцептора и донора протона.

Впоследствии гидролитическое расщепление РНК имидазолом и его конъюгатами с катионными и интеркалирующими соединениями было исследовано детально.^{168,169} Показано, что эти соединения можно использовать в качестве структурных зондов для изучения вторичной структуры РНК и комплексов РНК–дезоксиполионуклеотид в растворах.^{168,169}

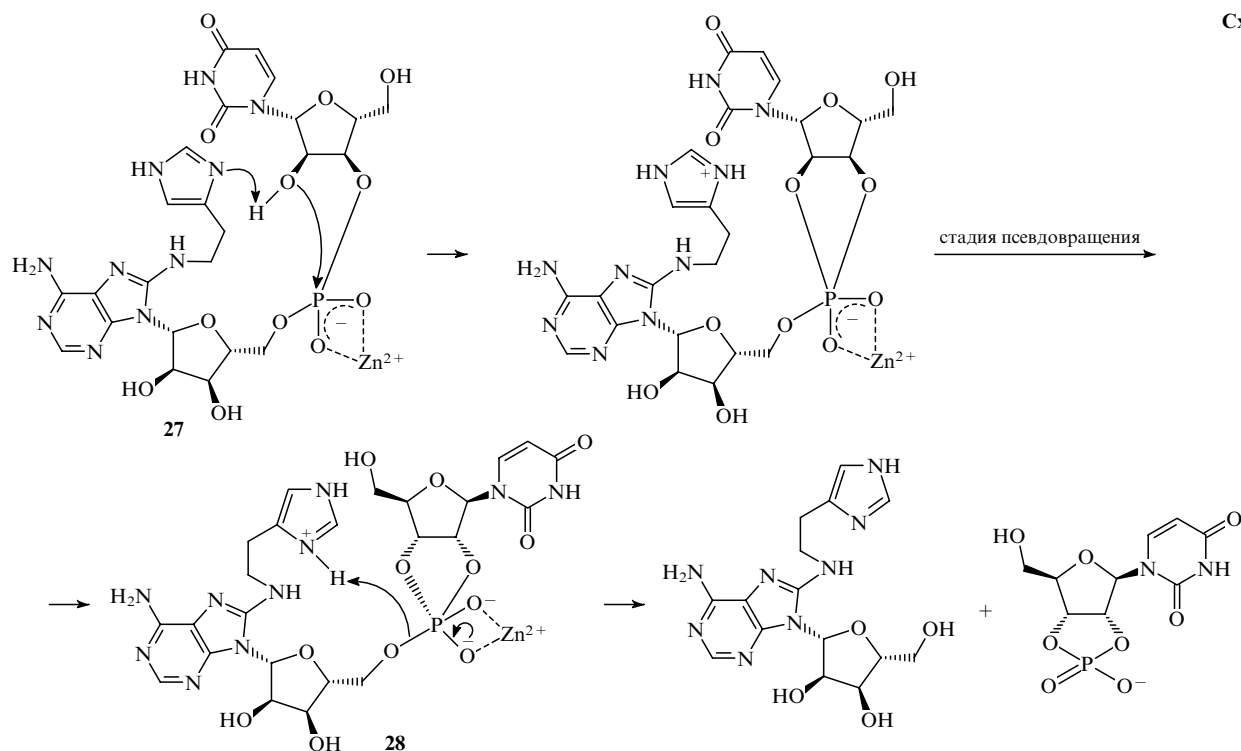
Гидролиз как имидазольным буфером, так и имидазольными конъюгатами протекает преимущественно в одноцепо-

точных участках РНК. Очевидно, это связано с меньшей конформационной подвижностью нуклеотидов в составе двуцепочечных участков и менее благоприятным пространственным расположением 2'-гидроксильной группы по отношению к атому фосфора межнуклеотидного фосфата. Следует отметить, что скорость гидролиза имидазольным буфером не зависит от последовательности нуклеотидов в участке расщепления (рис. 4), в то время как имидазольные конъюгаты имеют ярко выраженную тенденцию к расщеплению по пиримидин-пуриновым участкам.¹⁶⁸

Еще одним интересным объектом для моделирования является активный центр стафилококковой нуклеазы (нуклеазы S). Строение и механизм действия нуклеазы S был установлен на основании данных рентгеноструктурного анализа, кинетических исследований и замен аминокислот в активном центре фермента.^{170–172}

Предполагают, что благодаря координации с гуанидиневыми группами фосфат-ион оказывается в конформации, оптимальной для протекания реакции гидролиза нуклеазой S. Одновременно стабилизируется пятикоординированное промежуточное состояние атома фосфора. Хотя нуклеаза S является металлозависимым ферментом, она, как и другие соединения, содержащие гуанидиневые группы, способна связываться с фосфат-анионами^{173,174} и ускорять гидролиз фосфодиэфирных связей в отсутствие ионов металлов.¹⁷⁵ Гидролиз фосфодиэфирных связей соединениями, содержащими гуанидиневые фрагменты, ускоряется в присутствии внешних или внутренних нуклеофилов.^{176,177} Еще один тип гидролитического центра, объединяющего в себе элементы активного центра РНКазы А (общий основной катализ имидазолом) и нуклеазы S (координация фосфат-аниона и стабилизация пятикоординированного промежуточного состояния атома фосфора), предложен в работе¹⁷⁸. Синтезированные соединения содержали имидазольный остаток и одну или две гуанидиневые группы, присоединенные к стероидному остову через спейсеры различной длины. Большинство полученных соединений проявили невысокую

Схема 2



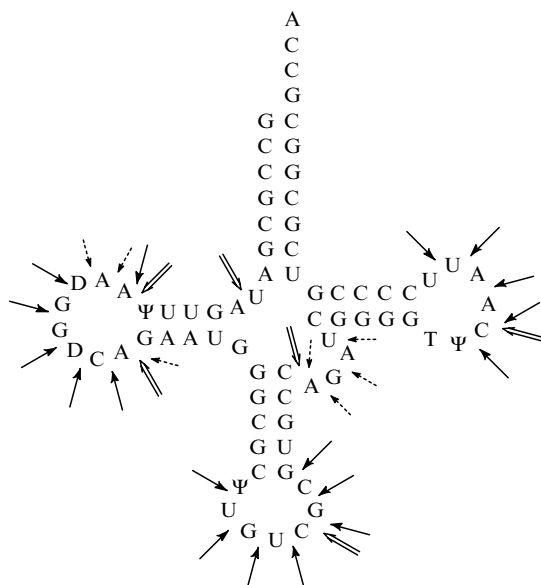
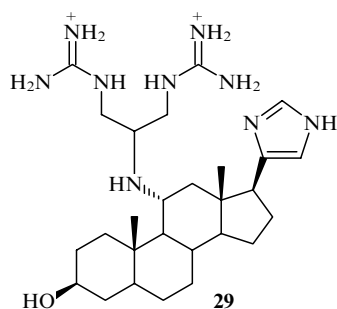


Рис. 4. Структура и основные сайты расщепления $tRNA^{Asp}$. Обычными стрелками показаны наиболее вероятные сайты расщепления под действием имидазольного буфера, пунктирными стрелками — менее вероятные сайты, двойными стрелками — сайты расщепления под действием имидазольных конъюгатов.

гидролитическую активность по отношению к модельному субстрату — 4-нитрофенил-2'-гидроксипропилфосфодиэфиру. Эффективность гидролиза зависела как от числа гуанидиниевых групп (две лучше, чем одна), так и от их положения по отношению к стероидному кольцу, а также от длины линкера. Наиболее эффективная конструкция, **29**, показала также невысокую гидролитическую активность по отношению к UrU ($k = 2.4 \cdot 10^{-4} \text{ ч}^{-1}$, 60°C , $\text{pH } 7.5$). В то же время более простые соединения, содержащие только гуанидиниевые группы (1,3-бис(гуанидиний)пропан) или одновременно гуанидиниевые и имидазольные фрагменты (1,3-бис(гуанидиний)-2[2-(1*H*-имидазол-4-ил)этиламино]пропан), оказались гидролитически неактивными.



Таким образом, функциональные модели активных центров природных рибонуклеаз, по-видимому, могут быть получены путем конструирования молекул, содержащих основные и кислотные каталитические центры, которые ориентированы в пространстве определенным образом.

Синтетические рибонуклеазы в качестве основания чаще всего содержат остатки имидазола (аналог His12 в РНК-азе А) или карбоксилат-анион (аналог Glu58 в РНК-азе Т1), а в качестве донора протона — протонированный имид-

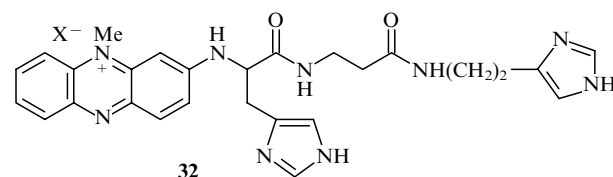
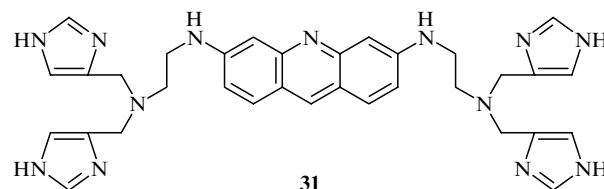
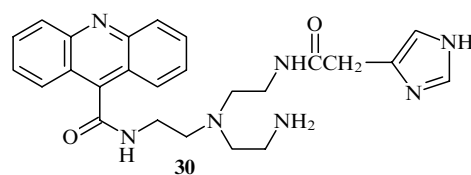
азольный фрагмент (аналогично His119 и His92 соответственно). Эффективность катализа, по-видимому, может быть повышена путем введения в каталитический центр положительно заряженных групп (амино- или гуанидиниевых) для ориентирования иона фосфата относительно каталитических центров и стабилизации пятикоординированного промежуточного состояния атома фосфора. Введение в состав реакционноспособного центра нуклеофильной группы (например, гидроксильной, имитирующей 2'-гидроксильную группу рибозы), вероятно, позволит создать катализаторы, гидролизующие фосфодиэфирные связи в ДНК.¹⁷⁹

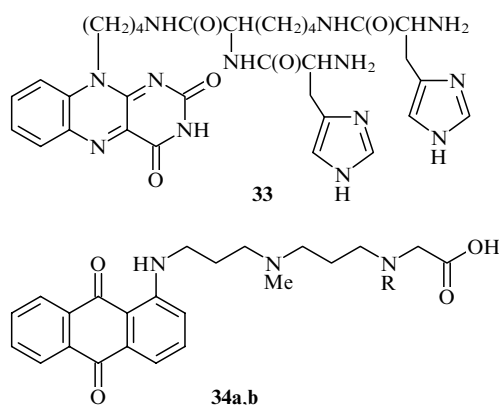
IV. Реагенты, расщепляющие рибонуклеиновые кислоты по определенным участкам структуры

Расщепление РНК по определенным участкам может быть осуществлено с помощью реагентов, в структуру которых введены группы, образующие комплексы с определенными нуклеотидными последовательностями или элементами трехмерной структуры РНК. Наиболее очевидным приемом для решения этой задачи является использование олигонуклеотидов, комплементарных к заранее определенным первичным последовательностям РНК-мишени. Кроме того, существует ряд низкомолекулярных лигандов, обладающих сродством к определенным пространственным структурным элементам РНК.

1. Конъюгаты на основе полициклических соединений

Каталитически активные группы могут быть присоединены гибкими линкерами к полиароматическим соединениям, способным интеркалировать в двуполочечные участки нуклеиновых кислот. Синтетические конструкции, содержащие полициклические интеркалирующие соединения и металлокомплексы, широко используют для расщепления ДНК.^{180, 181} Были предприняты попытки получения соединений, способных гидролизовать РНК, путем присоединения гуанидиниевых, амино- и карбоксильных групп в различных сочетаниях к интеркалирующим соединениям. Некоторые, наиболее активные представители таких конъюгатов синтезированы на основе акридина (**30**, **31**),^{182–184} феназина (**32**),¹⁸⁵ изоаллоксазина (**33**)¹⁸⁶ и антрахинона (**34a, b**).¹⁸⁷





R = H (a), CH₂CO₂H (b).

Использованные субстраты (тРНК, мРНК, синтетические олигонуклеотиды) не позволяют провести корректного сравнения каталитической активности конъюгатов **30–34**. Как правило, ее определяли по исчезновению исходного нуклеотидного материала без анализа образующихся продуктов гидролиза. Такая методика не позволяла установить какие-либо закономерности между строением синтетических рибонуклеаз и их каталитической активностью. Нами был синтезирован ряд конструкций, различающихся как строением линкеров, так и набором реакционноспособных групп в каталитическом центре.¹⁸⁶ Наибольшей эффективностью обладали конъюгаты феназина, которые в центре, гидролизующем РНК, содержали два имидазольных остатка, отделенных от интеркалятора линкером в 8–14 связей С–С или С–N. Несколько меньшей активностью обладали соединения, содержащие имидазольный фрагмент и карбоксильную группу.

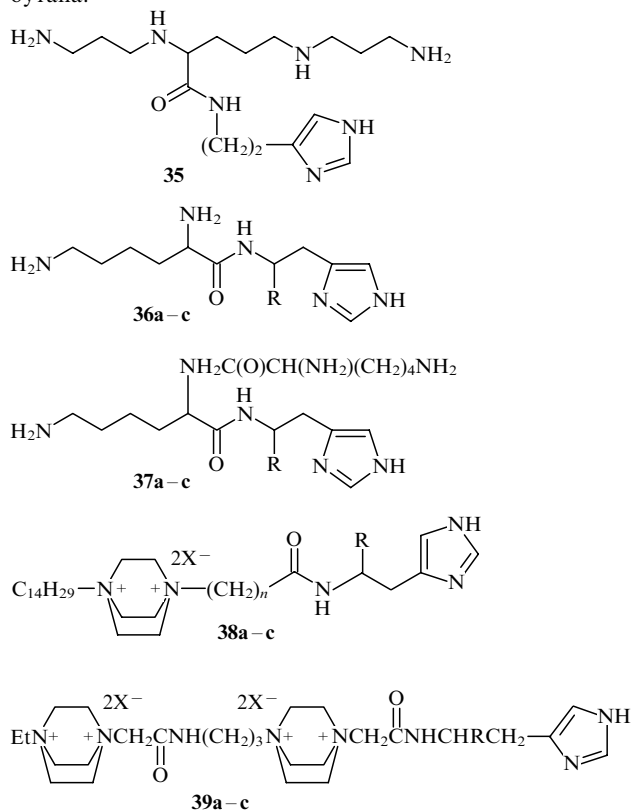
Конъюгаты **30–32** и **34a** проявили четко выраженную специфичность к расщеплению CpA-, UpA-последовательностей в одноцепочечных участках РНК.^{185, 186} Исключением были конъюгат изоаллоксазина **33** (см.¹⁸⁶) и синтезированный в работе¹⁸⁷ конъюгат антрахинона **34b**, содержащий две карбоксильные группы. При гидролизе тРНК^{Phe} в присутствии производного антрахинона **34a**, содержащего одну карбоксильную группу, основными сайтами гидролиза были CpA-участки. Однако при введении в РНК-гидролизующий центр дополнительной карбоксильной группы (соединение **34b**) гидролизу подвергались преимущественно фосфодиэфирные связи в последовательностях GrA, GrG и в меньшей степени в GrC.

Низкая активность большинства исследованных конъюгатов на основе полициклических соединений может быть объяснена тем, что они, встраиваясь между витками РНК, стабилизируют ее двуцепочечную структуру. При этом каталитические группы оказываются в области структуры РНК, наиболее устойчивой к гидролизу. Использование удлиненных линкеров делает возможным локализацию каталитических групп в области более лабильных одноцепочечных фрагментов РНК, что, в свою очередь, позволяет достичь более высокой эффективности гидролиза.¹⁸⁷

2. Конъюгаты на основе поликатионов

В отличие от конъюгатов на основе полициклических соединений, которые имеют тенденцию связываться с двуцепочечными фрагментами НК, конструкции на основе катионных соединений связываются с РНК за счет электростатических взаимодействий, что обеспечивает их равномерное распределение между всеми стерически доступными фосфодиэфирными связями РНК-мишени. В литературе описаны конъюгаты **35–39** на основе синтетических и природных

полиаминов,^{188–192} содержащие в качестве РНК-гидролизующих групп остатки имидазола и фрагменты 1,4-диаминобутана.

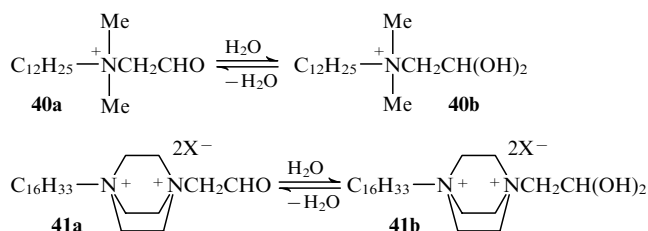


35–39: R = H (a), CO₂H (b), CO₂Me (c).

Как уже отмечалось выше, 1,4-диаминобутан и имидазол в концентрациях 1–2 моль·л^{–1} способствуют гидролизу РНК. Синтетические рибонуклеазы **35–39** на основе конъюгатов имидазола с полиаминами эффективно катализируют гидролиз в значительно более низких концентрациях (10^{–3}–10^{–5} моль·л^{–1}), что свидетельствует о синергическом действии отдельных элементов этих конструкций. Резкое уменьшение эффективности катализа при переходе от имидазольных конъюгатов к *N*-метилимидазольным,¹⁸⁸ а также наличие изотопного эффекта ($k_H/k_D = 2.28$) при проведении гидролиза динуклеозидомонофосфата CpA в воде и в D₂O (см.¹⁶⁹) свидетельствуют о наличии кислотно-основного катализа на лимитирующей стадии реакции. Каталитическую активность соединений **35–39** исследовали в экспериментах с синтетическими олигонуклеотидами, различными тРНК и фрагментами вирусных РНК. Было показано, что конъюгаты **35–39** обеспечивают высокую скорость расщепления фосфодиэфирных связей в составе мотивов 5'-Pu-A в одноцепочечных участках РНК;^{188–190} при этом не предполагается предпочтительного связывания конъюгатов с фосфатами данных мотивов по сравнению с другими межнуклеотидными фосфатами. Исследованные конъюгаты содержат различные РНК-связывающие фрагменты, а РНК-мишени имеют различные структуры. Поэтому повышенная нестабильность пиримидин-пуриновых последовательностей в РНК может быть объяснена только их особыми свойствами. Конъюгаты **35–39**, способные эффективно и специфично деполимеризовать РНК в мягких условиях, можно рассматривать в качестве альтернативы РНКазе А в исследованиях вторичной структуры РНК.^{168, 188}

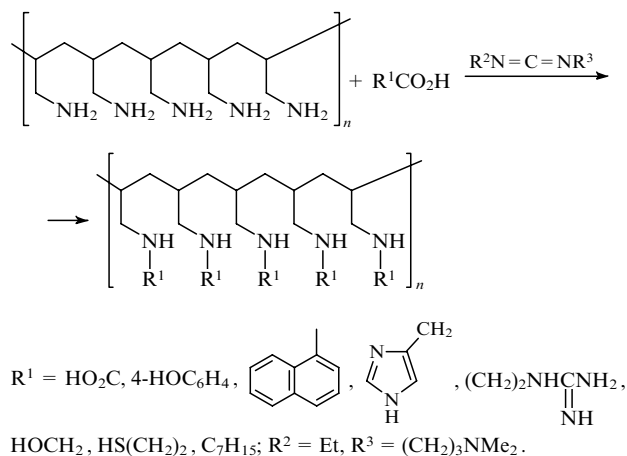
Менгер с соавт.^{193, 194} предложил использовать для гидролитического расщепления фосфодиэфирных связей в РНК соединения **40b** и **41b**, которые в отличие от конъюгатов

35–39 являются нуклеофильными катализаторами. За счет электроотрицательного заместителя в β -положении альдегидные группы в соединениях **40a** и **41a** гидратируются в слабощелочных и нейтральных растворах, давая высоко-нуклеофильные катализаторы **40b** и **41b**. За счет положительного заряда азотсодержащего фрагмента нуклеофильная группа локализуется вблизи от фосфодиэфирной связи. Наличие алкильного заместителя повышает, по мнению авторов, эффективность гидролиза за счет мицеллярного катализа (по аналогии с предложенными ранее мицеллярными аналогами сериновых протеаз¹⁹⁵). Катализаторы **40**, **41** ускоряли гидролиз модельного соединения — бис(4-нитрофенил)фосфата — в 1800 и 750 раз соответственно по сравнению со скоростью гидролиза в отсутствие катализаторов. Следует отметить, что за счет мицеллярного катализа гидролиз ускорялся лишь в 210 раз.^{193, 194} Поскольку в литературе нет примеров расщепления природных РНК-субстратов в присутствии катализаторов данного типа, нельзя сравнить их эффективность с эффективностью соединений, работающих на основе общего кислотно-основного катализа.



В работе¹⁹⁶ для получения катализаторов расщепления фосфодиэфирных связей на основе полиаминов были использованы методы комбинаторной химии. Смесь нескольких карбоновых кислот активировали водорастворимым карбодиимидом в присутствии полиаллиламина с молекулярным весом 30 000–40 000. Соотношение компонентов подбирали таким образом, что суммарная степень ацилирования аминогрупп полимера составляла 5–45%. Изменяя соотношение

карбоновых кислот в исходной реакционной смеси и варьируя степень модификации исходного полиамина, получили обширную библиотеку водорастворимых полимеров со статистически расположенными функциональными группами.



Каталитическую активность полученных соединений определяли по степени гидролиза бис(4-нитрофенил)фосфата в присутствии ионов металлов (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}). Данный подход позволил выявить ряд полимеров, ускоряющих гидролиз в 20 000–30 000 раз. Наиболее активным оказался полиамин, содержащий 7.5% остатков каприловой, 15% остатков имидазилуксусной и 10% остатков 4-гидроксibenзойной кислот в присутствии ионов железа ($k_{\text{cat}}/k = 31\,400$).¹⁹⁷ Недостатком данного подхода является отсутствие информации о структуре каталитически активных сайтов. В то же время методы комбинаторной химии позволяют быстро выявить функциональные группы, необходимые для эффективного протекания тех или иных каталитических процессов.

Особый интерес представляют синтетические конструкции на основе макроциклических полиаминов. В этих соединениях каталитический и аффинный центры объединены

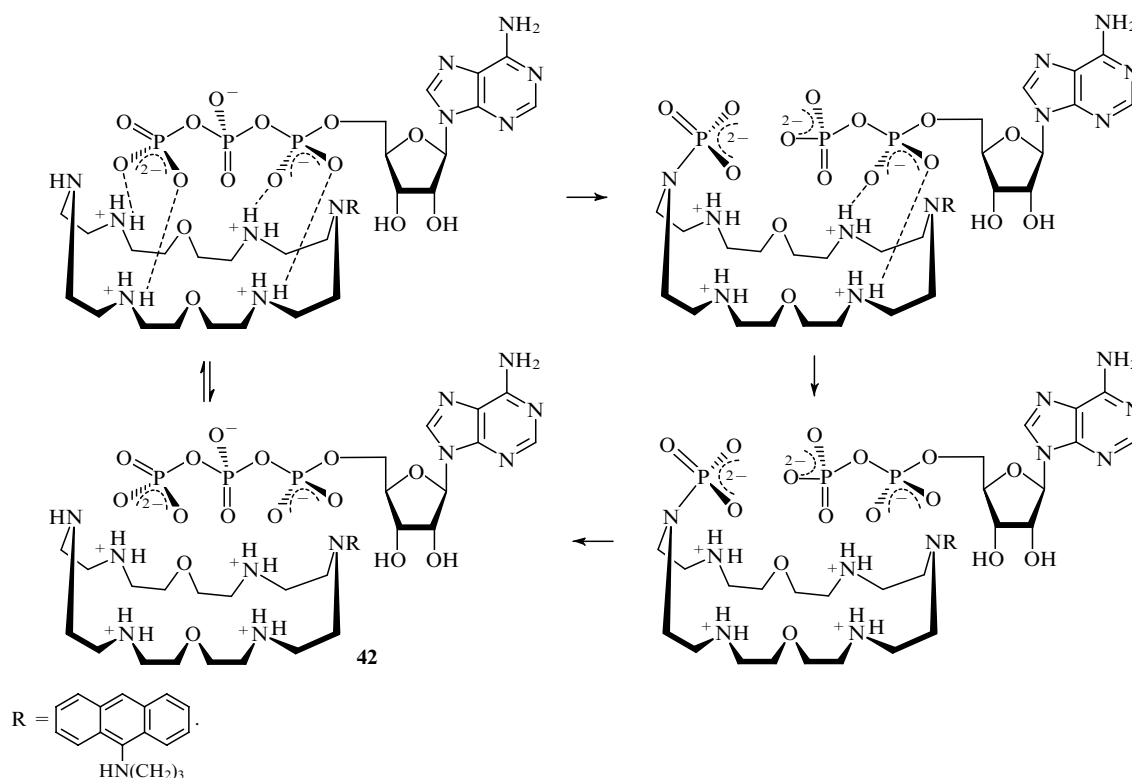


Схема 3

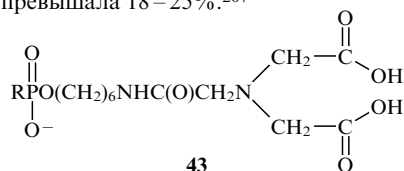
в одно целое. Эффективность связывания макроциклов с РНК может быть дополнительно повышена путем присоединения их к полиароматическим соединениям.¹⁹⁸ Расщепление фосфодиэфирной связи в аденозин-5'-трифосфате, катализируемое макроциклическим полиамином **42**, приведено на схеме 3. Соединения типа **42** не показали гидролитической активности по отношению к НК,¹⁹⁹ однако конструирование искусственных катализаторов на основе молекул, в которых функциональные группы имеют ограниченную степень свободы, представляется весьма перспективным.

3. Конъюгаты на основе олигонуклеотидов

При конструировании олигонуклеотидных конъюгатов использовали практически все типы описанных выше каталитических групп (см. обзоры^{200–204}), которые вводили в середину олигонуклеотидного адреса (рис. 5,а) или присоединяли к концевому фрагменту нуклеотидов (рис. 5,б). Первый вариант построения конъюгатов выглядит привлекательным в связи тем, что при последующем расщеплении ими РНК стабильность комплекса конъюгата с субстратом существенно уменьшается, что должно способствовать осуществлению гидролиза в каталитическом режиме. В то же время каталитическая группа в комплексе РНК с таким конъюгатом оказывается локализованной в области дуплексной структуры, отличающейся повышенной устойчивостью.¹⁰² При размещении каталитической группы на конце олигонуклеотида в образовавшемся затем комплексе она ориентирована в сторону более лабильной одноцепочечной структуры. Однако стабильность комплекса после расщепления РНК практически не снижается. Таким образом, обмен конъюгата между деполимеризованной и интактной РНК затруднен, что должно препятствовать эффективному функционированию катализаторов.

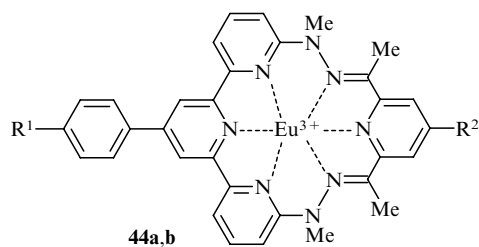
Конъюгаты, которые содержат каталитические группы, присоединенные по 5'-концевому фосфату, сильно различаются по эффективности деполимеризации РНК. Для комплекса Lu^{3+} , полученного *in situ* на основе олиго-ДНК с присоединенным по 5'-концу остатком иминодиуксусной кислоты (**43**), степень деполимеризации составила 17% (37°C, 8 ч). При использовании конъюгатов на основе макроцикличес-

ких комплексов Eu^{3+} **44a,b** она составляет 30 (37°C, 18 ч) и 80–90% (37°C, 16 ч) соответственно.²⁰⁶ Введение тех же металлокомплексов по положению 5 тимидина, находящегося в середине олигонуклеотидного адреса, приводило к получению неактивных²⁰⁵ либо малоактивных²⁰⁶ конъюгатов. Каталитическая активность олигонуклеотидных конъюгатов **45**, содержащих в положении 5 тимидина комплексы меди, также оказалась невысокой: при инкубации РНК с такими конъюгатами при 45°C степень расщепления за 72 ч не превышала 18–25%.²⁰⁷



43

R — остаток олигонуклеотида.

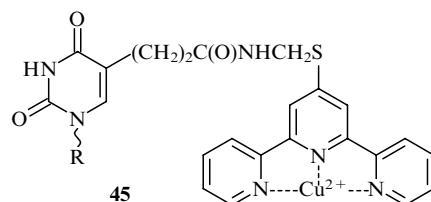


44a,b

$\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{NHCNH}(\text{CH}_2)_6\text{O}-\text{P}(\text{O})\text{OR}^3$ (a);

$\text{R}^1 = \text{NHCNH}(\text{CH}_2)_6\text{O}-\text{P}(\text{O})\text{OR}^3$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (b);

R^3 — остаток олигонуклеотида.



45

R — остаток олигонуклеотида.

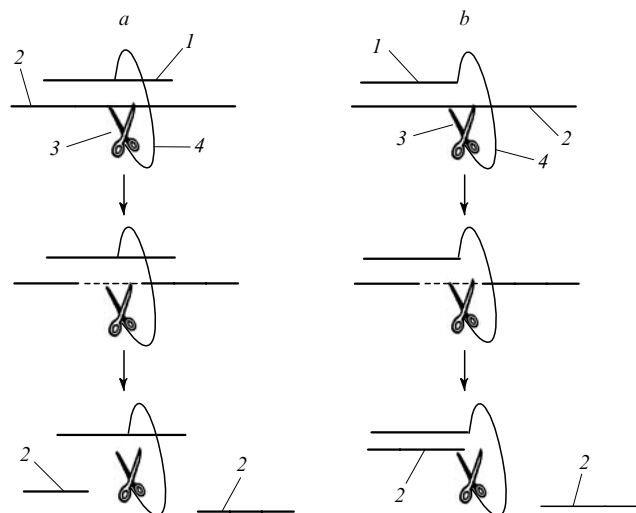


Рис. 5. Основные направления в конструировании сверхспецифичных синтетических рибонуклеаз на основе олигонуклеотидных конъюгатов.

а — введение каталитических групп в середину олигонуклеотидного адреса, б — присоединение к концевому фрагменту; 1 — олигонуклеотид, 2 — РНК-мишень, 3 — каталитическая группа, 4 — линкер.

Высокая эффективность расщепления достигается при локализации гидролитических групп в области петлевых структур РНК-мишени (рис. 6,а). Как уже отмечалось, фосфодиэфирные связи в петлевых структурах нуклеиновых кислот отличаются повышенной чувствительностью к расщеплению реагентами различной природы.^{72, 103, 104, 208, 209} Эффективность расщепления РНК конъюгатами, формирующими с РНК петлевые структуры, достигала 92% в условиях, когда в аналогичных реакциях с участием конъюгатов, формирующих совершенные комплексы, эффективность не превышала 7%.²⁰⁵

В случае присоединения металлокомплекса по 5'-концевому фосфату олигонуклеотидного адреса гидролиз фосфодиэфирных связей происходит в зависимости от типа линкера на расстоянии от одного до семи нуклеотидных звеньев.^{204, 210} При формировании искусственной петли вблизи от 5'-конца происходит почти количественная переориентация расщепления из одноцепочечного участка в петлю, при этом общая степень гидролиза увеличивается.²⁰⁵ Было показано, что синтетические рибонуклеазы на основе 12-звенных 2'-модифицированных олигорибонуклеотидов, сконструированных по такому принципу, способны совершить до 40 актов расщепления РНК за 64 ч инкубации при 37°C и concentra-

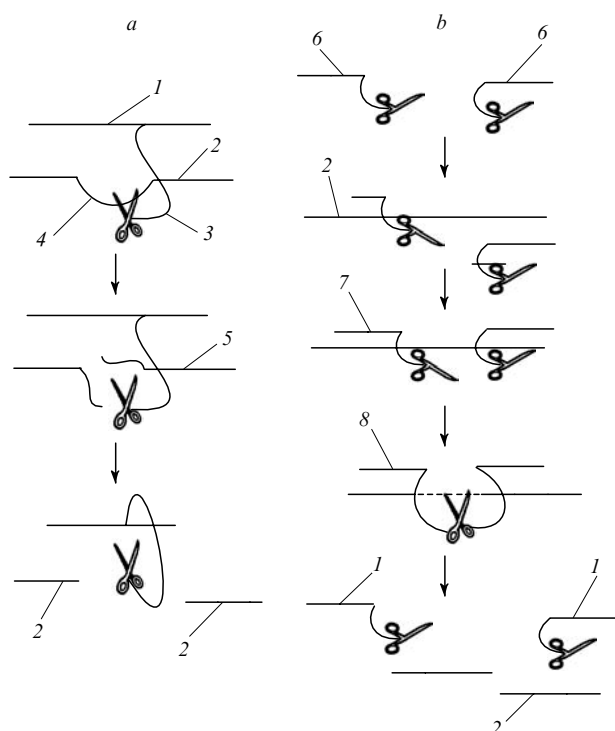
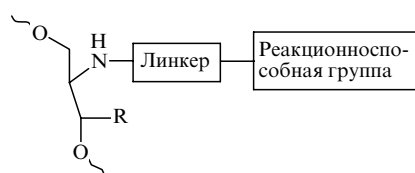


Рис. 6. Принцип построения синтетических рибонуклеаз на основе конъюгатов с некомплементарными участками (а) и на основе модульных конъюгатов (b).

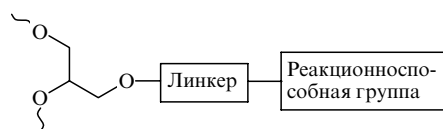
1 — олигонуклеотид, 2 — РНК-мишень, 3 — линкер, 4 — некомплементарный участок, 5 — расщепление РНК, 6 — олигонуклеотиды, содержащие компоненты каталитического центра, 7 — формирование каталитического центра на РНК-мишени, 8 — расщепление РНК.

ции реагента $1 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$ при условии 50-кратного избытка РНК.²¹¹

Еще один подход к повышению подвижности сахарофосфатного остова РНК в целевом участке основан на замене одного нуклеотидного звена в олигонуклеотидном адресе на нуклеотидную вставку.²¹²

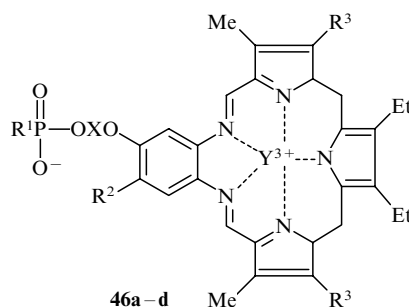


R = H, Me.



Способность таких олигонуклеотидных конъюгатов расщеплять РНК в каталитическом режиме была продемонстрирована на примере конъюгатов **46a**, содержащих макроциклические комплексы Dy^{3+} (см.²¹³).

Перспективным подходом к созданию олигонуклеотидных конъюгатов, расщепляющих РНК, является дизайн модульных (бинарных) реагентов (см. рис. 6, b). Суть подхода заключается в разделении каталитического центра на два фрагмента и синтез конъюгатов этих фрагментов с олигонуклеотидами, комплементарными к соседним участкам РНК-мишени. Образование каталитического центра происходит только в случае формирования правильного тройного



R^1 — остаток олигонуклеотида; R^2 = H, OMe; R^3 = $(CH_2)_3OH$, Et; X = $(CH_2)_3$, $(CH_2)_6$, $(CH_2)_6NHC(=O)CH_2$; Y = Dy (a), La (b), Lu (c), Eu (d).

комплекса, в котором две неактивные структуры рекомбинируют и образуют каталитически активный центр. В качестве реакционноспособных групп, которые могут формировать такой центр, выступают либо отдельные реакционноспособные группы, входящие в состав природных рибонуклеаз (например, два остатка имидазола), либо малоактивные металлокомплексы, формирующие более реакционноспособные двудерные каталитические центры. Данный подход, безусловно, накладывает существенно более жесткие ограничения на структурные параметры как фрагментов реакционноспособного центра, так и на геометрию конъюгатов в целом. Однако он дает ряд важных преимуществ: позволяет повысить специфичность реакции с целевой последовательностью и позволяет исключить возможность побочных реакций конъюгатов с нецелевыми биополимерами.

Наиболее эффективные из конъюгатов **46a–d** содержат в качестве каталитических групп комплексы редкоземельных металлов (La^{3+} , Lu^{3+} , Eu^{3+} , Dy^{3+}). Диссоциация этих ионов из металлокомплексов может приводить к неспецифическому расщеплению других биополимеров, что обуславливает их высокую токсичность в биологических системах. Для решения этой проблемы недавно были предложены двудерные комплексы цинка. Ионы цинка в физиологических условиях сами по себе не способны эффективно катализировать деполимеризацию биополимеров, в то же время в составе двудерных металлокомплексов их эффективность достаточно высока.²¹⁴

Реагенты на основе олигонуклеотидных конъюгатов с каталитическими группами, не содержащими ионов металлов, представляются более перспективными, поскольку позволяют полностью исключить какие-либо кофакторы. В сочетании с высокой специфичностью олигонуклеотидного адреса это может позволить получить соединения, обладающие способностью эффективно расщеплять целевые последовательности РНК, не затрагивая другие биополимеры. Однако некоторые группы (амино- и карбоксильные группы, гетероциклические фрагменты) проявляют гораздо меньшую каталитическую активность, чем ионы металлов и металлокомплексы. Высокая эффективность гидролиза в присутствии органических соединений достигается лишь при оптимальном пространственном расположении всех групп, участвующих в каталитическом процессе. Наиболее простыми конъюгатами, которые расщепляют РНК и не содержат ионов металлов, являются олигонуклеотидные производные, имеющие на 5'-конце этилен-²¹⁵ или пропилендиамин.²¹⁶ В работе²¹⁷ сообщалось о расщеплении тРНК^{Ph} 19-звенным олигонуклеотидным конъюгатом, содержащим остаток диамина: эффективность составила 10% после 4 ч инкубации при 50°C. Такая же эффективность наблюдалась при расщеплении аналогичным конъюгатом 30-звенного модельного олигорибонуклеотида.²¹⁸ Гидролизу в обоих случаях подвергались 5'-СрА-последовательности в области

локализации реагента. При введении олигоаминов через ненуклеотидную вставку в середину конъюгата эффективность гидролиза в аналогичных условиях уменьшалась до 3%.²¹⁹ В то же время при использовании вместо 19-звенного олигодезоксирибонуклеотида 10-звенного олигопептидилнуклеотида с присоединенным по 5'-концу диэтилентриамином гидролиз происходил на 30% за 4 ч при 40°C и количественно за 24 ч в тех же условиях.²²⁰ В работе²²⁰ использовали ту же мишень, что и в работе²¹⁷, с единичной заменой G → C, в результате чего в области локализации гидролитической группы оказался фрагмент CpApCpA. Гидролизу подвергались обе связи CpA, но в разной степени.

Конъюгаты олигонуклеотидов, которые имели на 3'-концевом фосфате фрагменты, содержащие 1,4-диаминобутильный, N-пропилимидазолиевый и гистаминовый остатки, в отсутствие ионов металлов не проявили каталитической активности при гидролизе модельного олигорибонуклеотида. Введение в реакционную смесь ионов цинка приводило к появлению слабой активности у гистаминсодержащего соединения.²²¹ В качестве мишени авторами работы²²¹ была использована полиуридиловая последовательность.

Сообщено^{222, 223} о синтезе олигонуклеотидных конъюгатов, имеющих на 5'-концевом фосфате олигопептиды (Leu-Arg)_nGlyNH₂ (n = 2–4). Инкубация модельного 14-звенного олигорибонуклеотида с комплементарным шестизвенным олигодезоксирибонуклеотидом, в котором олигопептидный фрагмент состоял из чередующихся пар Leu-Arg, приводила к расщеплению РНК-мишени. В условиях длительной инкубации (48 ч, 37°C) в случае конъюгата, содержащего три пары Leu-Arg, наблюдалось незначительное расщепление (~5%) мишени по сайту CpU, расположенному вблизи места локализации олигопептида. В опытах с конъюгатами, несущими две или четыре пары Leu-Arg, эффективность расщепления в этих условиях достигала 30 и 70% соответственно. В последнем случае основными сайтами расщепления были две последовательности GpA и, в меньшей степени, UpU, находящиеся в двуцепочечном участке комплекса. При инкубации тРНК^{Phe} *E. coli* с конъюгатами на основе олигонуклеотида pTCAATC, комплементарного двум последовательностям в антикодонной и ТΨС-петле, наблюдалось расщепление фосфодиэфирных связей в области D-петли, в ТΨС-петле и, в меньшей степени, в антикодонном участке этой тРНК. Расщепление связей в области нецелевого участка D-петли авторы^{222, 223} связывают с возможным пространственным сближением с ТΨС-петлей, имеющей частичный сайт связывания реагента. Направленность воздействия реагента (при n = 3, 4) на тРНК не зависела от длины пептидного остатка, как это наблюдалось для модельного 14-звенного олигорибонуклеотида, хотя степень гидролиза мишени и в этом случае существенно уменьшалась при переходе от n = 4 к n = 3. Максимальная эффективность гидролиза составила 80% (n = 4, 48 ч, 20°C).

Нами были получены олигонуклеотидные конъюгаты, содержащие на 5'-или 3'-концевом фосфате бисимидазолиевые фрагменты.²²⁴ Активность конъюгатов тестировали на дрожевой фенилаланиновой тРНК, а также на пре- и мини-экзоне мРНК *Leishmania amazonensis*. В случае тРНК^{Phe} расщеплению подвергались последовательности C(61)A(62) и C(63)A(64), расположенные в области локализации гидролитически активных групп, причем во всех случаях наибольшая эффективность расщепления наблюдалась по связи CpA, отстоящей на три нуклеотидных звена от места присоединения реагента. Реагент, содержащий каталитическую группу на 3'-концевом фосфате, оказался несколько более активным по сравнению с его 5'-аналогом. Суммарная эффективность расщепления тРНК по трем сайтам после 8 ч инкубации достигала 60% при 37°C.²²⁵ В случае мини-экзона мРНК *Leishmania amazonensis* эффективность гидролиза для 17-звенного олигонуклеотида, имеющего на 3'-конце бисимидазолиевый фрагмент, достигала 100% за 5 ч. Основными сайтами расщепления были последовательности CpA (80%) в месте ожидаемой локализации реакционноспособных групп. Сходные результаты получены для олигонуклеотидных конъюгатов, несущих на 5'-концевом фосфате синтетические конструкции, содержащие остаток имидазола и алифатическую аминогруппу.²²⁶ Увеличение длины спейсера, связывающего бисимидазолиевые фрагменты с олигонуклеотидным адресом, так же как и введение реакционноспособных групп через некомплементарный нуклеотидный остаток, приводило к существенному увеличению эффективности гидролиза. Инкубация тРНК^{Phe} с такими конъюгатами при 37°C в течение 3–5 ч приводит к количественному расщеплению РНК (рис. 7). Введение в реакционную смесь олигонуклеотида, комплементарного области расщепления (показана стрелками, олигонуклеотид A, см. рис. 7), полностью ингибирует гидролиз.²²⁷ В работе²²⁸ были предложены дендримерные олигонуклеотидные конъюгаты, содержащие 2–24 остатка имидазола. Данный подход кажется привлекательным для синтеза библиотеки олигонуклеотидных конъюгатов, содержащих не только остатки имидазола, но и другие функциональные группы, присущие активным центрам природных ферментов.

тида, имеющего на 3'-конце бисимидазолиевый фрагмент, достигала 100% за 5 ч. Основными сайтами расщепления были последовательности CpA (80%) в месте ожидаемой локализации реакционноспособных групп. Сходные результаты получены для олигонуклеотидных конъюгатов, несущих на 5'-концевом фосфате синтетические конструкции, содержащие остаток имидазола и алифатическую аминогруппу.²²⁶ Увеличение длины спейсера, связывающего бисимидазолиевые фрагменты с олигонуклеотидным адресом, так же как и введение реакционноспособных групп через некомплементарный нуклеотидный остаток, приводило к существенному увеличению эффективности гидролиза. Инкубация тРНК^{Phe} с такими конъюгатами при 37°C в течение 3–5 ч приводит к количественному расщеплению РНК (рис. 7). Введение в реакционную смесь олигонуклеотида, комплементарного области расщепления (показана стрелками, олигонуклеотид A, см. рис. 7), полностью ингибирует гидролиз.²²⁷ В работе²²⁸ были предложены дендримерные олигонуклеотидные конъюгаты, содержащие 2–24 остатка имидазола. Данный подход кажется привлекательным для синтеза библиотеки олигонуклеотидных конъюгатов, содержащих не только остатки имидазола, но и другие функциональные группы, присущие активным центрам природных ферментов.

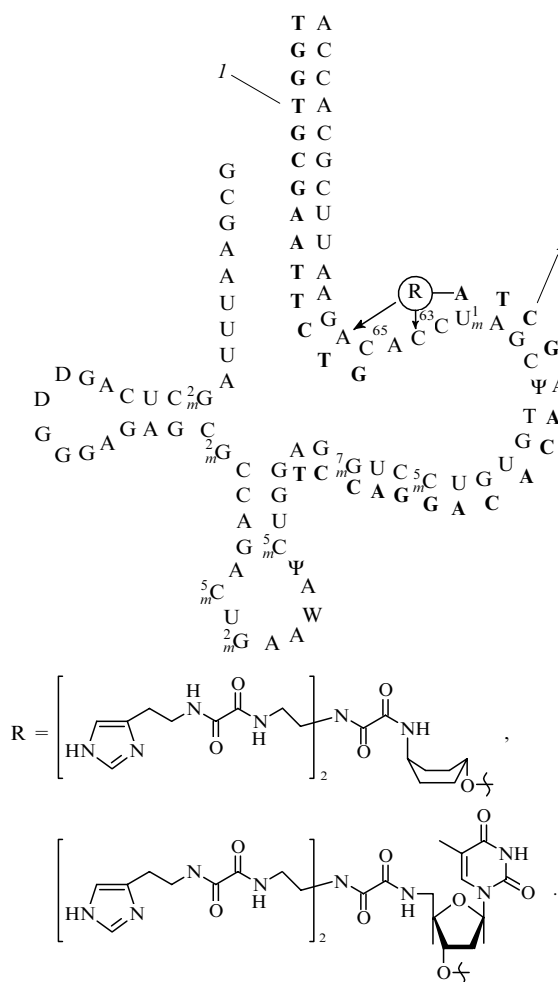
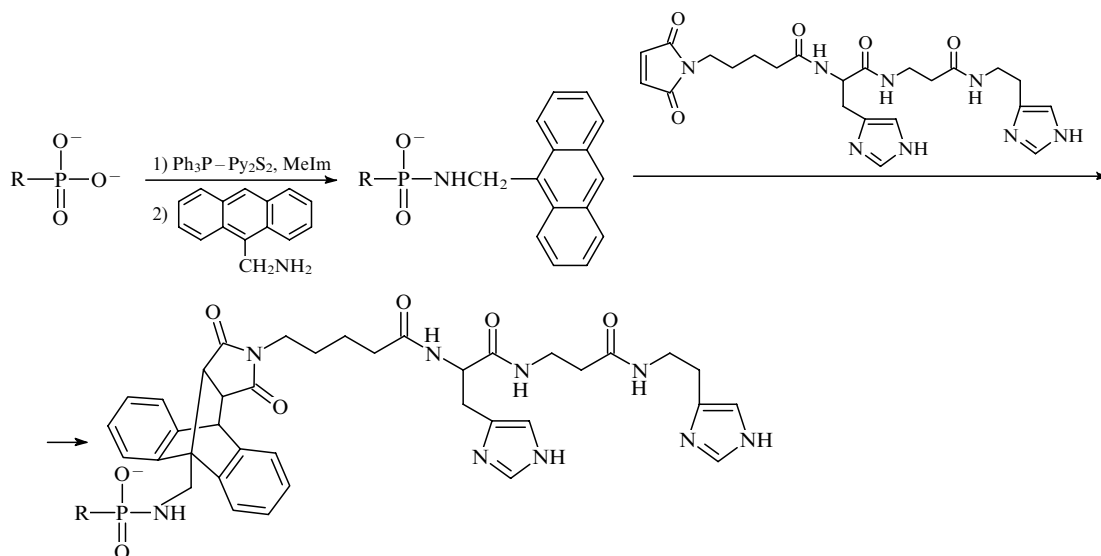


Рис. 7. Металлонеинзависимые каталитические группы R, используемые при конструировании синтетических рибонуклеаз на основе олигонуклеотидных конъюгатов. Сайты расщепления тРНК^{Phe} бисимидазолиевыми олигонуклеотидными конъюгатами показаны стрелками; 1 — олигонуклеотид A, 2 — олигонуклеотид B.

Схема 4



R — дезоксиолигонуклеотид; MeIm — метилимидазол.

Методы комбинаторной химии могут быть использованы не только для конструирования реакционноспособных групп, но и при выборе оптимального для гидролиза участка РНК. В работе²²⁹ сообщалось о синтезе библиотеки 8-звенных 2'-O-модифицированных олигорибонуклеотидов со случайной последовательностью. Каждый из олигонуклеотидов содержал на 5'-конце комплекс Eu^{3+} 44. При инкубировании данной библиотеки с 39-звенной РНК ($1 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ конъюгатов, $50 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ РНК, 37°C) уже в течение первых 2 ч были обнаружены четыре сайта гидролиза. Этот результат является неожиданным, так как концентрация каждого отдельного конъюгата в реакционной смеси не превышала $15 \text{ пмоль} \cdot \text{л}^{-1}$.

В настоящее время для синтеза конъюгатов олигонуклеотидов с различными лигандами наиболее распространены два принципиально разных подхода: введение лигандов на одной из стадий олигонуклеотидного синтеза и постсинтетическая модификация олигонуклеотида.²³⁰ Существует несколько вариантов реализации как первой, так и второй стратегии. Первый путь наиболее часто предполагает автоматический синтез олигонуклеотидов на основе амидофосфитов защищенных нуклеозидов и лигандов. Для получения синтетических рибонуклеаз на основе олигонуклеотидных конъюгатов были предложены мономерные блоки, содержащие остатки различных металлокомплексов^{231–235} и имидазолсодержащие конструкции.^{236–240} Перспективным вариантом данного подхода является последовательный синтез олигонуклеотидного и каталитического фрагментов конъюгата на одном твердофазном носителе.^{221, 241} Однако необходимость синтеза уникальных амидофосфитов в каждом конкретном случае, а также трудности при выборе защитных групп и методов их удаления в случае последовательного синтеза олигонуклеотидных конъюгатов делают этот подход недоступным для большинства потенциальных потребителей таких конъюгатов. Напротив, синтез олигонуклеотидов, содержащих функциональные группы, также как 5'- или 3'-концевые фосфаты, amino-, гидроксид- и карбоксильные группы, хорошо отработан многими биохимическими компаниями, что делает постсинтетическую модификацию олигонуклеотидов весьма перспективной. Различные варианты функционализации перечисленных выше групп представлены в работах^{230, 242}. Данный подход был широко использован при синтезе рибонуклеаз, содержащих металлокомплексы,^{103, 205, 210, 211, 229} полиамины,^{215, 219} производные имидазола.²²⁶ Описанный в работе²⁴³ мягкий метод активации концевого фосфата позволяет получать конъюгаты

олигонуклеотидов с молекулами, содержащими алифатические аминогруппы, без защиты имидазольных^{224, 225, 244} или гуанидиниевых^{222, 223} групп. Оригинальный подход к получению олигонуклеотидных конъюгатов с молекулами, которые содержат практически любые функциональные группы, необходимые для создания высокоэффективных каталитических центров, был продемонстрирован в работе²⁴⁵. Авторы присоединяли каталитический центр к концевому фосфату дезоксиолигонуклеотида по реакции Дильса–Альдера между антраценовым фрагментом и двойной связью малеинимидной группы (схема 4).

* * *

В результате интенсивных работ в области конструирования синтетических катализаторов специфического расщепления рибонуклеиновых кислот уже получены перспективные соединения, представляющие новое семейство структурных зондов для исследования конформации РНК и для конструирования конъюгатов антисмысловых олигонуклеотидов. Низкомолекулярные синтетические катализаторы, способные расщеплять РНК с эффективностью и селективностью, близкими к таковым для природных рибонуклеаз, пока не созданы, однако во многих случаях такая эффективность не требуется. В частности, несмотря на более низкую эффективность, синтетические рибонуклеазы в качестве структурных зондов обладают преимуществом перед природными ферментами. Например, рибонуклеаза А — фермент, гидролизующий преимущественно пиримидин-пуриновые сайты в одноцепочечных участках, — связываясь с РНК, изменяет ее структуру и даже расплетает двуцепочечные участки, что ограничивает возможности ее применения в структурных исследованиях. Малые синтетические молекулы не нарушают структуру НК и расщепляют ее только в пределах одноцепочечных участков, существующих в нативной молекуле, что позволяет получить информацию именно о биологически активной структуре РНК.

Продолжаются исследования, направленные как на изучение процессов, протекающих в активных центрах ферментов, так и на моделирование этих процессов в небольших химических нуклеазах. Можно надеяться, что в результате этих исследований в ближайшее время будут получены синтетические нуклеазы, не уступающие природным биокатализаторам или даже превосходящие их по своей эффективности, и это поможет создать высокоэффективные противовирусные и противораковые препараты нового поколения.

Литература

1. D.G.Knorre, V.V.Vlassov, V.F.Zarytova, A.V.Lebedev, O.S.Fedorova. *Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994
2. D.S.Sigman, A.Mazumder, D.M.Perrin. *Chem. Rev.*, **93**, 2295 (1993)
3. P.D.Cook. In *Antisense Research and Applications*. (Eds S.T.Crooke, B.Lebled). CRC Press, Boca Raton, FL, 1993
4. C.Helene, J.-J.Tulme. In *Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*. (Ed. J.S.Cohen). Macmillan, London, 1989
5. Д.Г.Кнорре, О.С.Федорова, Е.И.Фролова. *Успехи химии*, **62**, 70 (1993)
6. W.K.Pogozelski, T.D.Tullius. *Chem. Rev.*, **98**, 1089 (1998)
7. C.J.Burrows, J.G.Muller. *Chem. Rev.*, **98**, 1109 (1998)
8. J.L.Hue, Y.C.Xue, M.Y.Xie, R.Zhang, T.Otani, Y.Minami, Y.Yamada, M.Casazza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2822 (1993)
9. D.G.Knorre, V.V.Vlassov. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*, **32**, 291 (1985)
10. K.Kido, H.Inoue, E.Ohtsuka. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 1339 (1992)
11. B.Armitage. *Chem. Rev.*, **98**, 1171 (1998)
12. B.Armitage, T.Koch, H.Frydenlund, H.Örum, H.-G.Batz, G.B.Schuster. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 4674 (1997)
13. T.Chatterji, K.S.Gates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 535 (1998)
14. G.Pratviel, J.Bernadou, B.Meunier. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 746 (1995)
15. J.Bernadou, G.Pratviel, B.Meunier. In *DNA and RNA Cleavers and Chemotherapy of Cancer and Viral Diseases*. (Ed. B.Meunier). Kluwer Academic, Dordrecht, 1995. P. 211
16. H.H.Thorp. *Chem. Biol.*, **7**, 33 (2000)
17. J.Stubbe, J.W.Kozarich. *Chem. Rev.*, **87**, 1107 (1987)
18. R.M.Burger. *Chem. Rev.*, **98**, 1153 (1998)
19. J.-M.A.Battigello, M.Cui, S.Roshong, B.J.Carter. *Bioorg. Med. Chem.*, **3**, 839 (1995)
20. T.Tuschl, J.B.Thomson, F.Eckstein. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 296 (1995)
21. L.Jaeger. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 324 (1997)
22. N.G.Walter, J.M.Burke. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 24 (1998)
23. W.G.Scott. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 720 (1998)
24. D.Sen, C.R.Geyer. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 680 (1998)
25. W.D.Wilson, L.Ratmeyer, M.Zhao, L.Strekowski, D.Boykin. *Biochemistry*, **32**, 4098 (1993)
26. L.Frydman, P.C.Rossomando, V.Frydman, C.O.Fernandez, B.Frydman, K.Samejima. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9186 (1992)
27. K.Michael, Y.Tor. *Chem. Eur. J.*, **4**, 2091 (1998)
28. C.S.Chow, F.M.Bogdan. *Chem. Rev.*, **97**, 1489 (1997)
29. M.G.Wallis, R.Schroeder. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **67**, 141 (1997)
30. F.Leclerc, R.Cedergren. *J. Med. Chem.*, **41**, 175 (1998)
31. M.Egli. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 1894 (1996)
32. M.J.Soth, J.S.Nowick. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1**, 120 (1997)
33. C.Apple, C.Leumann. *Chem. Biol.*, **5**, 209 (1998)
34. A.M.Kawasaki, T.P.Prakash, A.S.Fraser, M.Prhave, G.B.Inamati. *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 1737 (1999)
35. T.P.Prakash, A.M.Kawasaki, G.Vasquez, A.S.Fraser, M.D.Casper, P.D.Cook, M.Manoharan. *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 1381 (1999)
36. S.K.Singh, P.Nielsen, A.A.Koshkin, J.Wengel. *Chem. Commun.*, 455 (1998)
37. R.N.Zuckermann, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 6592 (1988)
38. R.N.Zuckermann, D.R.Corey, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1614 (1988)
39. Y.Uchiyama, H.Inoue, E.Ohtsuka, C.Nakai, S.Kanaya, Y.Ueno, M.Ikehara. *Bioconjugate Chem.*, **5**, 327 (1994)
40. C.Nakai, A.Konishi, Y.Komatsu, H.Inoue, E.Ohtsuka, S.Kanaya. *FEBS Lett.*, **339**, 67 (1994)
41. *Общая органическая химия. Т. 4.* (Под ред. Д.Бартона, У.Д.Оллиса). Химия, Москва, 1983
42. F.H.Westheimer. *Acc. Chem. Res.*, **1**, 70 (1968)
43. D.-M.Zhou, K.Taira. *Chem. Rev.*, **98**, 991 (1998)
44. T.Uchamaru, S.Kawahara, S.Tsuzuki, K.Matsumura, K.Taira. *J. Mol. Struct.*, **469**, 215 (1999)
45. M.Oivanen, S.Kuusela, H.Lönnberg. *Chem. Rev.*, **98**, 961 (1998)
46. S.Mikkola, E.Stenman, K.Nurmi, E.Yousefi-Salakdeh, R.Strömberg, H.Lönnberg. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1619 (1999)
47. E.Mäki, M.Oivanen, P.Pojärvi, H.Lönnberg. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2493 (1999)
48. G.A.Soukup, R.R.Breaker. *RNA*, **5**, 1308 (1999)
49. A.Bibillo, K.Ziomek, M.Figlerowicz, R.Kierzek. *Acta Biochim. Pol.*, **46**, 145 (1999)
50. H.Hosaka, I.Sakabe, K.Sakamoto, S.Yokoyama, H.Takaku. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20090 (1994)
51. R.Kierzek. *Collect. Czech. Chem. Commun. (Spec. Issue)*, **61**, 161 (1996)
52. R.Kierzek. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 5079 (1992)
53. R.Kierzek. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 5073 (1992)
54. A.Riepe, H.Beier, H.J.Gross. *FEBS Lett.*, **457**, 193 (1999)
55. D.Gani, J.Wilkie. *Chem. Soc. Rev.*, **24**, 55 (1995)
56. A.Lahm, S.Volbeda, D.J.Suck. *J. Mol. Biol.*, **215**, 207 (1990)
57. L.S.Beese, T.A.Steitz. *EMBO J.*, **10**, 25 (1991)
58. M.M.Benning, J.M.Kuo, F.M.Raushel, H.M.Holden. *Biochemistry*, **34**, 7973 (1995)
59. W.G.Scott. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 705 (1999)
60. D.R.Jones, L.F.Lindoy, A.M.Sargeson. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 7327 (1983)
61. P.Hendry, A.M.Sargeson. *Prog. Inorg. Chem.*, **38**, 201 (1990)
62. T.C.Bruice, A.Tsubouchi, R.O.Dempcy, L.P.Olson. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9867 (1996)
63. J.K.Bashkin, L.A.Jenkins. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3631 (1994)
64. W.G.Scott, J.T.Finch, A.Klug. *Cell*, **81**, 991 (1995)
65. S.C.Dahm, W.B.Derrick, O.C.Uhlenbeck. *Biochemistry*, **32**, 13040 (1993)
66. S.Kuusela, H.Lönnberg. *J. Phys. Org. Chem.*, **5**, 803 (1992)
67. S.Kuusela, H.Lönnberg. *J. Phys. Org. Chem.*, **6**, 347 (1993)
68. R.S.Brown, J.C.Dewan, A.Klug. *Biochemistry*, **30**, 4785 (1991)
69. P.S.Freemont, J.M.Friedman, L.S.Beese, M.R.Sanderson, T.A.Steitz. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8924 (1988)
70. B.W.Pontius, W.B.Lott, P.H.von Hippel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2290 (1997)
71. W.G.Scott, A.Klug. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 220 (1996)
72. T.Pan, O.C.Uhlenbeck. *Nature (London)*, **358**, 560 (1992)
73. N.Sugimoto, T.Ohmichi. *FEBS Lett.*, **393**, 97 (1996)
74. T.Ohmichi, N.Sugimoto. *Biochemistry*, **36**, 3514 (1997)
75. M.Irisawa, M.Komiyama. *J. Biochem.*, **117**, 465 (1995)
76. M.Komiyama, K.Matsumura, Y.Matsumoto. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 640 (1992)
77. K.Matsumura, M.Komiyama. *J. Biochem.*, **122**, 387 (1997)
78. P.Hurst, B.K.Takasaki, J.Chin. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 9982 (1996)
79. S.J.Frandkin. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 201 (2001)
80. J.Visscher, A.W.Schwartz. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 5749 (1992)
81. R.Ott, R.Krämer. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **37**, 1957 (1998)
82. K.Matsumura, Y.Matsumoto, M.Komiyama. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **27**, 11 (1992)
83. J.J.Butzow, G.L.Eichhorn. *Biochemistry*, **10**, 2019 (1971)
84. A.George, P.Draganac, W.R.Farkas. *Inorg. Chem.*, **24**, 3627 (1985)
85. V.M.Shelton, J.R.Morrow. *Inorg. Chem.*, **30**, 4295 (1991)
86. S.Kuusela, M.Rantanen, H.Lönnberg. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2269 (1995)
87. S.Kuusela, H.Lönnberg. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2301 (1994)
88. J.Sumaoka, M.Yashiro, M.Komiyama. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **27**, 37 (1992)
89. S.A.Kazakov. In *Bioorganic Chemistry*. (Ed. S.M.Hecht). Oxford University Press, New York, 1996. P. 224
90. L.S.Behlen, J.R.Sampson, A.B.DiRenzo, O.C.Uhlenbeck. *Biochemistry*, **29**, 2515 (1990)
91. J.Wrzesinski, D.Michalowski, J.Ciesiolka, W.J.Krzyzosiak. *FEBS Lett.*, **374**, 62 (1995)
92. N.A.Kolchanov, I.I.Titov, I.E.Vlassova, V.V.Vlassov. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*, **53**, 131 (1996)
93. J.Ciesiolka, M.Yarus. *RNA*, **2**, 785 (1996)
94. I.Majerfeld, M.Yarus. *RNA*, **4**, 471 (1998)

95. R.S.Brown, B.E.Hingerty, J.C.Dewan, A.Klug. *Nature (London)*, **303**, 543 (1983)
96. R.S.Brown, J.C.Dewan, A.Klug. *Biochemistry*, **24**, 4785 (1985)
97. D.Michalowski, J.Wrzesinski, W.Krzyzosiak. *Biochemistry*, **35**, 10727 (1996)
98. J.Ciesiolka, J.Gorski, M.Yarus. *RNA*, **1**, 7538 (1995)
99. M.Weich, I.Majerfeld, M.Yarus. *Biochemistry*, **36**, 6614 (1997)
100. B.Dichtl, T.Pan, A.B.DiRenzo, O.C.Uhlenbeck. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 351 (1993)
101. J.Ciesiolka, S.Lorenz, V.A.Erdmann. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 575 (1992)
102. K.A.Kolasa, J.R.Morrow, A.P.Sharma. *Inorg. Chem.*, **32**, 3983 (1997)
103. D.Huesken, G.Goodall, M.J.J.Blommers, W.Jahnke, J.Hall, R.Haener, H.E.Moser. *Biochemistry*, **35**, 16591 (1996)
104. I.Zagorowska, S.Kuusela, H.Lönnberg. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 3392 (1998)
105. M.Yashiro, A.Ishikubo, M.Komiyama. *J. Biochem.*, **120**, 1067 (1996)
106. J.R.Morrow, L.A.Buttrey, V.M.Shelton, K.A.Berback. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1903 (1992)
107. L.A.Jenkins, J.K.Bashkin, M.E.Autry. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6822 (1996)
108. D.P.Weiner, T.Wiemann, M.M.Wolfe, P.Wentworth Jr., K.D.Janda. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 4088 (1997)
109. S.J.Oh, K.H.Song, J.W.Park. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 575 (1995)
110. J.Sumaoka, S.Miyama, M.Komiyama. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1755 (1994)
111. U.Baykal, E.U.Akkaya. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 5861 (1998)
112. R.Breslow, D.Berger, D.-L.Huang. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3686 (1990)
113. P.R.Norman, R.D.Cornelius. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2356 (1982)
114. M.K.Stern, J.K.Bashkin, E.D.Sall. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 5357 (1990)
115. N.Sträter, W.N.Lipscomb, T.Klabunde, B.Krebs. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 2024 (1996)
116. D.E.Wilcox. *Chem. Rev.*, **96**, 2435 (1996)
117. J.A.Cowan. *Chem. Rev.*, **98**, 1067 (1998)
118. R.A.Kovall, B.W.Matthews. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 578 (1999)
119. D.J.Weber, A.K.Meeker, A.S.Mildvan. *Biochemistry*, **30**, 6103 (1991)
120. С.В.Шляпников, Е.В.Благанов, В.М.Левдигов, В.Ю.Лунин, В.В.Лунин, А.М.Михайлов, Х.Бегзель, К.Р.Райяшанкар, М.Пербандт. *Мол. биология*, **33**, 454 (1999)
121. A.Volbeda, A.Lahm, F.Sakiyama, D.Suck. *EMBO J.*, **10**, 1607 (1991)
122. J.K.Bashkin. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 752 (1999)
123. E.K.van den Beuken, B.L.Feringa. *Tetrahedron*, **54**, 12985 (1998)
124. E.Rizzarelli, G.Vecchio. *Coord. Chem. Rev.*, **188**, 343 (1999)
125. R.Breslow, S.Singh. *Bioorg. Chem.*, **16**, 408 (1998)
126. W.H.Chapman Jr., R.Breslow. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5462 (1995)
127. S.Matsuda, A.Ishikubo, A.Kuzuya, M.Yashiro, M.Komiyama. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **37**, 3284 (1998)
128. M.Wall, R.C.Hynes, J.Chin. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **32**, 1633 (1993)
129. P.Molenveld, J.F.J.Engbersen, H.Kooijman, A.L.Spek, D.N.Reinhoudt. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 6726 (1998)
130. S.Liu, Z.Luo, A.D.Hamilton. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **36**, 2678 (1997)
131. Y.Chung, E.U.Akkaya, T.K.Venkatachalam, A.W.Czarnik. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 5413 (1990)
132. J.S.Seo, N.-D.Sung, R.C.Hynes, J.Chin. *Inorg. Chem.*, **35**, 7472 (1996)
133. A.Tsubouchi, T.C.Bruice. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 11614 (1994)
134. K.G.Rogunathan, H.-J.Schneider. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 1219 (1996)
135. M.Yashiro, A.Ishikubo, M.Komiyama. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1793 (1995)
136. P.Molenveld, J.F.J.Engbersen, D.N.Reinhoudt. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **38**, 3189 (1999)
137. A.Roigk, O.V.Yescheulova, Yu.V.Fedorov, O.A.Fedorova, S.P.Gromov, H.-J.Schneider. *Org. Lett.*, **1**, 833 (1999)
138. S.D.Dong, R.Breslow. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 9343 (1998)
139. E.Kövári, R.Krämer. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 12704 (1996)
140. P.Molenveld, J.F.J.Engbersen, D.N.Reinhoudt. *Eur. J. Org. Chem.*, 3269 (1999)
141. E.Kimura, Y.Kodama, T.Koike, M.Shiro. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 8304 (1995)
142. R.Krämer. *Coord. Chem. Rev.*, **182**, 243 (1999)
143. J.Costamagna, G.Ferraudi, B.Matsuhira, M.Campos-Vallette, J.Canales, M.Villagrán, J.Vargas, M.J.Aguirre. *Coord. Chem. Rev.*, **196**, 125 (2000)
144. M.Komiyama, K.Yoshinari. *J. Org. Chem.*, **62**, 2155 (1997)
145. M.Komiyama, K.Yoshinari. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1880 (1989)
146. K.Yoshinari, M.Komiyama. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **26**, 23 (1991)
147. K.Yoshinari, K.Yamazaki, M.Komiyama. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5899 (1991)
148. M.V.Keck, S.M.Hecht. *Biochemistry*, **34**, 12029 (1995)
149. B.Barbier, A.Brack. *Orig. Life Evol. Biosph.*, **17**, 381 (1987)
150. B.Barbier, A.Brack. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 6880 (1988)
151. B.Barbier, A.Brack. *Orig. Life Evol. Biosph.*, **20**, 139 (1990)
152. M.Perello, B.Barbier, A.Brack. *Int. J. Protein Res.*, **38**, 154 (1991)
153. B.Barbier, A.Brack. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3511 (1992)
154. H.Shindo, M.B.Hayes, J.S.Cohen. *J. Biol. Chem.*, **251**, 2644 (1976)
155. C.N.Pace, U.Heinemann, U.Hahn, W.Saenger. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **30**, 343 (1991)
156. G.A.Sowa, A.C.Hengge, W.W.Cleland. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 2319 (1997)
157. B.D.Wladkowski, L.A.Svensson, L.Sjolin, J.E.Landner, G.L.Gilliland. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 5488 (1998)
158. L.W.Schultz, D.J.Quirk, R.T.Raines. *Biochemistry*, **37**, 8886 (1998)
159. D.M.Perreault, E.V.Anslyn. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **36**, 432 (1997)
160. R.Breslow, M.Labelle. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2655 (1986)
161. R.Breslow, J.B.Doherty, G.Guillot, C.Lipsey. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3227 (1978)
162. E.Anslyn, R.Breslow. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 5972 (1989)
163. C.G.Ferguson, G.R.J.Thatcher. *Org. Lett.*, **1**, 829 (1999)
164. J.Yu, Y.Zhao, M.J.Holterman, D.L.Venton. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2705 (1999)
165. M.J.Han, K.S.Yoo, J.Y.Chang, T.-K.Ha. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **39**, 347 (2000)
166. J.Yan, R.Breslow. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 2059 (2000)
167. T.P.Prakash, S.S.Kunta, K.N.Ganesh. *Tetrahedron*, **50**, 11699 (1994)
168. R.Giege, B.Felden, V.N.Silnikov, M.A.Zenkova, V.V.Vlassov. *Methods Enzymol.*, **318**, 147 (2000)
169. М.А.Зенкова, Н.Л.Чумакова, А.В.Власов, Н.И.Комарова, А.Г.Веняминова, В.В.Власов, В.Н.Сильников. *Мол. биология*, **34**, 456 (2000)
170. D.W.Hibler, N.J.Stolowich, M.A.Reynolds, J.A.Gerlt, J.A.Wilde, P.H.Bolton. *Biochemistry*, **26**, 6278 (1987)
171. E.H.Serpseru, J.McCracken, J.Peisach, A.S.Mildvan. *Biochemistry*, **25**, 68 (1986)
172. E.H.Serpseru, J.McCracken, J.Peisach, A.S.Mildvan. *Biochemistry*, **27**, 8034 (1988)
173. R.P.Dixon, S.J.Geib, A.D.Hamilton. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 365 (1992)
174. F.Chu, L.S.Flatt, E.V.Anslyn. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4194 (1994)
175. D.M.Perreault, L.A.Cabell, E.V.Anslyn. *Bioorg. Med. Chem.*, **5**, 1209 (1997)
176. M.W.Göbel, J.W.Bats, G.Dürner. *Angew. Chem.*, **104**, 217 (1992)
177. V.Jubian, A.Veronese, R.P.Dixon, A.D.Hamilton. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 1237 (1995)
178. T.Oost, M.Kalesse. *Tetrahedron*, **53**, 8421 (1997)
179. M.-S.Muche, M.W.Göbel. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 2126 (1996)
180. S.A.Ross, M.Pitié, B.Meunier. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 557 (1999)
181. V.Steullet, D.W.Dixon. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2935 (1999)
182. J.Smith, K.Ariga, E.V.Anslyn. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 362 (1993)
183. A.Lorente, J.F.Espinosa, M.Fernández-Saiz, J.- M.Lehn, W.D.Wilson, Y.Z.Yi. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 4417 (1996)

184. C.-H.Tung, Z.Wei, M.J.Leibowitz, S.Stein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7114 (1992)
185. M.A.Podyminogin, V.V.Vlassov, R.Giege. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 5950 (1993)
186. В.Н.Сильников, Н.П.Лукьянчук, Г.В.Шишкин, Р.Жиже, В.В.Власов. *Докл. АН*, **364**, 690 (1999)
187. M.Endo, K.Hirata, T.Ihara, S.Sueda, M.Takagi, M.Komiyama. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 5478 (1996)
188. V.V.Vlassov, G.Zuber, B.Felden, J.-P.Behr, R.Giege. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 3161 (1995)
189. Д.А.Коневец, М.А.Зенкова, В.Н.Сильников, В.В.Власов. *Докл. АН*, **360**, 554 (1998)
190. D.A.Konevets, I.E.Beck, N.G.Beloglazova, I.V.Sulomenko, V.N.Sil'nikov, M.A.Zenkova, G.V.Shishkin, V.V.Vlassov. *Tetrahedron*, **55**, 503 (1999)
191. X.H.Li, R.Wan, Q.Zhang, Y.F.Zhao. *Chin. Chem. Lett.*, **9**, 333 (1998)
192. Н.С.Ждан, И.Л.Кузнецова, А.В.Власов, В.Н.Сильников, М.А.Зенкова, В.В.Власов. *Биоорг. химия*, **25**, 723 (1999)
193. F.M.Menger, L.G.Whitesell. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 707 (1985)
194. F.M.Menger, R.A.Persichetti. *J. Org. Chem.*, **52**, 3451 (1987)
195. M.L.Bender, M.Komiyama. In *Bioorganic Chemistry*. (Ed. E.E.van Tamelen). Academic Press, New York, 1977. P. 19
196. F.M.Menger, Z.X.Fei. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **33**, 346 (1994)
197. F.M.Menger, A.V.Eliseev, V.A.Migulin. *J. Org. Chem.*, **60**, 6666 (1995)
198. M.P.Mertes, K.B.Mertes. *Acc. Chem. Res.*, **23**, 413 (1990)
199. M.W.Hosseini, A.J.Blackler, J.-M.Lehn. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3896 (1990)
200. M.Komiyama. *J. Biochem.*, **118**, 665 (1995)
201. R.Häner, J.Hall. *Antisense Nucl. Acids Drug Dev.*, **7**, 423 (1997)
202. B.N.Trawick, A.T.Daniher, J.K.Bashkin. *Chem. Rev.*, **98**, 939 (1998)
203. В.В.Власов, В.Н.Сильников, М.А.Зенкова. *Мол. биология*, **32**, 62 (1998)
204. M.Komiyama, J.Sumaoaka. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 751 (1998)
205. D.Magda, R.A.Miller, J.L.Sessler, B.L.Iverson. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 7439 (1994)
206. J.Hall, D.Husken, R.Häner. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3522 (1996)
207. J.K.Bashkin, E.I.Frolova, U.Sampath. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 5981 (1994)
208. T.Pan, B.Dichtl, O.C.Uhlenbeck. *Biochemistry*, **33**, 9561 (1994)
209. I.J.Brittain, X.Huang, E.C.Long. *Biochemistry*, **37**, 12113 (1998)
210. J.Hall, D.Husken, U.Pieles, H.E.Moser, R.Häner. *Chem. Biol.*, **1**, 185 (1994)
211. R.Häner, J.Hall, A.Pfützer, D.Hüsken. *Pure Appl. Chem.*, **70**, 111 (1998)
212. M.A.Reynolds, T.A.Beck, P.B.Say, D.A.Schwartz, B.P.Dwyer, W.J.Daily, M.M.Vaghefi, M.D.Metzler, R.E.Klem, L.J.Arnold. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 760 (1996)
213. D.Magda, M.Wright, S.Crofts, A.Lin, J.L.Sessler. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6947 (1997)
214. S.Matsuda, A.Ishikubo, A.Kuzuya, M.Yashiro, M.Komiyama. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **37**, 3284 (1998)
215. M.Komiyama, T.Inokawa, T.Shiiiba, N.Takeda, K.Yoshinari, M.Yashiro. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **29**, 197 (1993)
216. A.Kuzuya, Y.Azuma, T.Inokawa, K.Yoshinari, M.Komiyama. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **37**, 209 (1997)
217. M.Komiyama, T.Inokawa. *J. Biochem.*, **116**, 719 (1994)
218. M.Komiyama, T.Inokawa, K.Yoshinari. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 77 (1995)
219. M.Endo, Y.Azuma, Y.Saga, A.Kuzuya, G.Kawai, M.Komiyama. *J. Org. Chem.*, **62**, 846 (1997)
220. J.C.Verheijen, B.A.L.M.Deiman, E.Yeheskiely, G.A.van der Marel, J.H.van Boom. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **39**, 369 (2000)
221. J.Hovinen, A.Guzaev, E.Azhayeva, A.Azhayev, H.Lönnberg. *J. Org. Chem.*, **60**, 2205 (1995)
222. Д.В.Пышный, М.Н.Репкова, С.Г.Лохов, Е.М.Иванова, А.Г.Венямина, В.Ф.Зарытова. *Биоорг. химия*, **23**, 497 (1997)
223. D.Pyshnyi, M.Repkova, S.Lokhov, E.Ivanova, A.Veniaminova, V.Zarytova. *Nucleosides Nucleotides*, **16**, 1571 (1997)
224. V.Silnikov, G.Zuber, J.-P.Behr, R.Giege, V.Vlassov. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **109–110**, 277 (1996)
225. V.Vlassov, T.Abramova, T.Godovikova, R.Giege, V.Silnikov. *Antisense Res. Dev.*, **7**, 39 (1997)
226. K.Ushijima, H.Gouzu, K.Hosono, M.Shirakawa, K.Kogosima, K.Takai, H.Takaku. *Biochem. Biophys. Acta*, **1379**, 217 (1998)
227. Н.Г.Белоглазова, Н.Н.Полушин, В.Н.Сильников, М.А.Зенкова, В.В.Власов. *Докл. АН*, **369**, 827 (1999)
228. N.N.Polushin. *Collect. Czech. Chem. Commun., Coll. Symp. Ser.*, **2**, 145 (1999)
229. D.Hüsken, A.Deichert, J.Hall, R.Häner. *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 1507 (1999)
230. А.С.Буторин, Г.Н.Гримм, К.Элен. *Мол. биология*, **34**, 946 (2000)
231. A.S.Modak, J.K.Gard, M.C.Merriman, K.A.Winkler, J.K.Bashkin, M.K.Stern. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 283 (1991)
232. J.K.Bashkin, J.Xie, A.T.Daniher, U.Sampath, J.L.-F.Kao. *J. Org. Chem.*, **61**, 2314 (1996)
233. G.Wang, D.E.Bergstrom. *Tetrahedron Lett.*, **34**, 6721 (1993)
234. J.Hovinen. *Bioconjugate Chem.*, **9**, 132 (1998)
235. H.Inoue, M.Shimizu, T.Furukawa, T.Tamura, M.Matsui, E.Ohtsuka. *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 1503 (1999)
236. J.K.Bashkin, J.K.Gard, A.S.Modak. *J. Org. Chem.*, **55**, 5125 (1990)
237. J.K.Bashkin, S.M.Sondhi, U.Sampath, A.d'Avignon. *New J. Chem.*, **18**, 4604 (1994)
238. N.N.Polushin, B.-ch.Chen, L.W.Anderson, J.S.Cohen. *J. Org. Chem.*, **58**, 4606 (1993)
239. G.Wang, D.E.Bergstrom. *Tetrahedron Lett.*, **34**, 6725 (1993)
240. T.H.Smith, J.V.LaTour, D.Bochkariov, G.Chaga, P.S.Nelson. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 647 (1999)
241. А.Ю.Карягин, Т.В.Абрамова, В.Н.Сильников, Г.В.Шишкин. *Изв. АН. Сер. хим.*, 536 (2000)
242. G.N.Grimm, A.S.Boutorine, C.Helene. *Nucleosides Nucleotides*, **19**, 1943 (2000)
243. D.G.Knorre, P.V.Alekseev, Y.V.Gerassimova, V.N.Silnikov, G.A.Maksakova, T.S.Godovikova. *Nucleosides Nucleotides*, **17**, 397 (1998)
244. L.Yurchenko, V.Silnikov, T.Godovikova, G.Shishkin, J.-J.Toulme, V.Vlassov. *Nucleosides Nucleotides*, **16**, 1721 (1997)
245. N.G.Beloglazova, V.N.Sil'nikov, M.A.Zenkova, V.V.Vlassov. *FEBS Lett.*, **481**, 277 (2000)

DESIGN OF SEQUENCE-SPECIFIC RIBONUCLEIC ACIDS CLEAVING REAGENTS

V.N.Silnikov, V.V.Vlassov

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
8, Prosp. Akad. Lavrent'eva, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383)233–3677*

Published data concerning chemical compounds capable of cleaving ribonucleic acids under physiological conditions are summarised. Approaches to the design of sequence-specific ribonucleic acids cleaving catalytic reagents are considered.

Bibliography — 245 references.

Received 11th July 2000