

REVISÃO

OS DNA SINTÉTICOS ANTI-SENTIDO

Alfredo Cravador

UCTA - Universidade do Algarve - Campus de Gambelas - P-8000 - Faro - Portugal

Recebido em 4/6/97; aceito em 7/11/97

**ANTISENSE SYNTHETIC DNA.** One old dream of the chemist in the field of the drug research is to create molecules capable of reaching their target with the precision of a missile. To accomplish it these molecules must have the propriety of distinguishing qualitative differences between healthy and diseased cells. A therapy based on this principle, able of eradicating specifically defective cells, or cells affected by a pathogen has an enormous advantage with the regard to the classical approach in which the cytotoxic drugs merely exploit quantitative biochemical and kinetic differences between abnormal and normal cells. We present in this article a review on the chemical synthesis of analogues of desoxyribonucleotides and on results obtained on the specific and irreversible inhibition of undesired genetic expression using the antisense principle.

**Keywords:** antisense oligonucleotides; synthetic analogues; chemotherapeutical agents.

INTRODUÇÃO

Durante muitos anos as únicas macromoléculas consideradas como exercendo uma atividade reguladora dos genes, ativadoras ou repressoras eram as proteínas. No início da década de oitenta foram descobertos genes regulatórios que dirigem a síntese de RNAs que controlam, direta ou indiretamente, a expressão genética. Tornou-se então evidente que os RNA podem se comportar como moléculas reguladoras. Estes RNAs possuem seqüências complementares do RNA alvo da regulação. Os dois RNAs interagem por emparelhamento de bases complementares. O princípio desta ação está representado no esquema 1. Durante a transcrição, a cadeia de DNA anti-sentido serve de molde para a síntese da cadeia complementar “sentido” de RNA mensageiro ribossômico ou de transferência, que são os produtos de transcrição da maioria dos genes. No entanto, a regulação de certos genes e processos é efetuada por um RNA anti-sentido sintetizado a partir da cadeia sentido do DNA. Um RNA anti-sentido pode hibridar-se, por exemplo, ao RNA mensageiro e bloquear a sua tradução em proteína. A descoberta dos RNAs anti-sentido naturais levou ao desenvolvimento rápido de sistemas destinados a regular artificialmente a expressão de genes com RNA ou DNA anti-sentido.

ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA EXPRESSÃO DE GENES

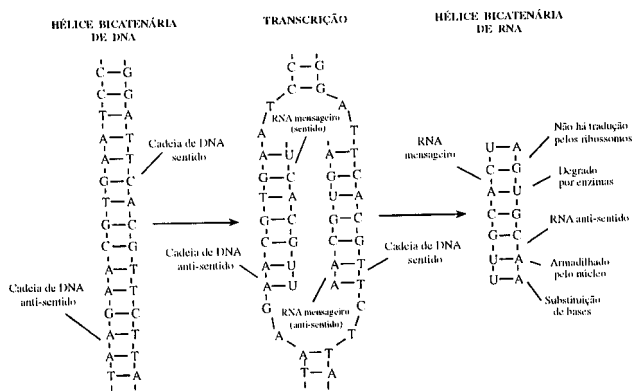
O desenvolvimento destes sistemas artificiais tem recorrido a várias abordagens, de que distinguiremos dois tipos principais: uma das abordagens baseia-se na transcrição de um fragmento de DNA inserido num vetor de expressão na orientação inversa do DNA natural entre um promotor e um terminador de transcrição. O transcrito resultante é complementar do RNA mensageiro alvo, natural e poderá pois interferir com a expressão do mensageiro *in vivo*. Esta estratégia conduz à inibição constitutiva de uma função alvo, porque neste sistema procura-se que a síntese do RNA anti-sentido seja permanente.

A segunda estratégia que desenvolveremos neste artigo, baseia-se na síntese de curtos fragmentos de DNA, ou de análogos ou derivados, complementares de uma porção da região alvo. Nesta abordagem, estas moléculas são exógenas e o seu efeito é transitório.

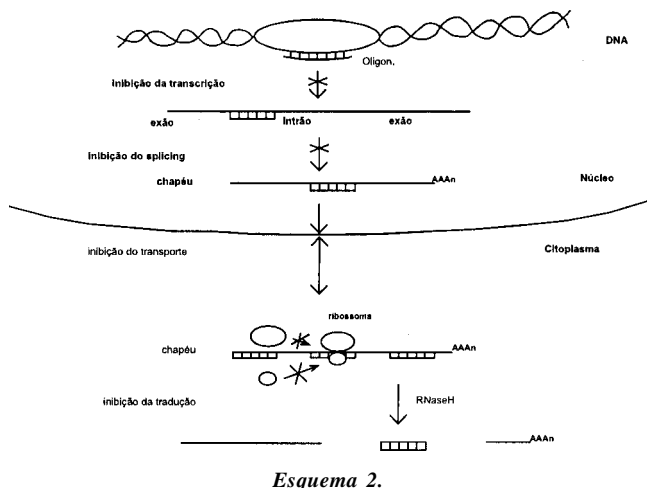
O desenvolvimento desta metodologia tem como finalidade, por um lado caracterizar funções genéticas desconhecidas e por outro, controlar genes estrangeiros que entram na célula por via de agentes patogênicos que se deseja inibir. Esta abordagem recorre à adição ao meio de cultura, ou à injeção de oligonucleotídeos anti-sentido ou de análogos que podem ser preparados por via química.

MODOS DE AÇÃO

Quais são os modos de ação possíveis dos oligonucleotídeos anti-sentido? Estes oligonucleotídeos, uma vez absorvidos pelas células, funcionam no citoplasma bloqueando a tradução do mensageiro, ou no núcleo, interferindo com o processamento nuclear, ou ainda em infecções virais bloqueando a replicação viral. O esquema 2 esquematiza os sítios possíveis de ação de um oligonucleotídeo ao longo das etapas sucessivas de expressão de um gene. Se o oligonucleotídeo se associar à hélice dupla do DNA formando uma hélice tripla, bloqueia a transcrição. Pode ainda fixar-se num fragmento de DNA quando a cadeia bicaténaria é aberta pela RNA polimerase, ou ainda, se for dirigido para a região de origem de replicação pode bloqueá-la formando uma hélice dupla ou tripla com o DNA.



Esquema 1.



Se se fixar sobre o RNA mensageiro no momento da sua formação, pode provocar o término prematuro da transcrição. O oligonucleotídeo pode bloquear o processamento do RNA mensageiro ao fixar-se às junções intron-exon, ou ainda impedir a sua passagem através da membrana nuclear, bloqueando o transporte do núcleo para o citoplasma. O oligonucleotídeo pode também fixar-se em diversos sítios do RNA, impedindo a associação deste RNA com fatores de associação, ou a associação das sub-unidades do ribossoma sobre o codon de iniciação, ou ainda a tradução do RNA mensageiro.

### PROPRIEDADES DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ANTI-SENTIDO

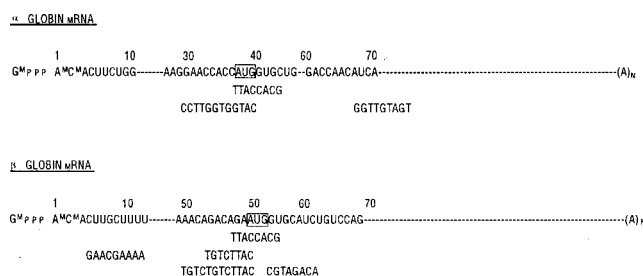
Quais são os requisitos para uma inibição eficaz? A abordagem que recorre aos oligonucleotídeos expõe uma problemática diferente e em parte nova em relação aos RNA anti-sentido, expressos de maneira permanente dentro de uma célula. Os oligonucleotídeos têm a vantagem notável de poderem ser sintetizados rápida e automaticamente e de serem, portanto, hoje em dia, de acesso relativamente fácil. Possuem sobretudo o extraordinário potencial de modulação das suas propriedades, conferida pela síntese química. O efeito inibitório, qualquer que seja a aplicação, pode ser aperfeiçoado através de modificações químicas, a síntese de análogos e derivados, cujas propriedades são criadas e estudadas para a obtenção dos efeitos desejados.

Para obter um efeito inibitório específico máximo é fundamental que o oligonucleotídeo possua 1) uma interação eficaz e específica com as seqüências alvo (em geral o RNA mensageiro, mas pode ser também o DNA); 2) uma captação celular e uma compartimentação eficazes; 3) uma estabilidade no meio de cultura e dentro dos diferentes compartimentos celulares.

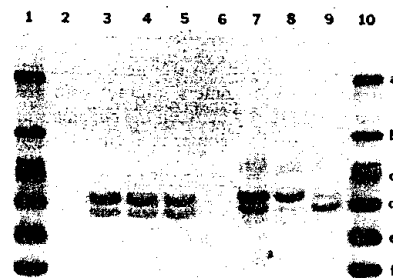
Tomando o RNA mensageiro como alvo, foram efetuadas várias experiências que permitiram concluir que os oligonucleotídeos com maior probabilidade de serem eficazes são os dirigidos i) ou para o sítio do "cap" do mensageiro, ii) ou para a região de iniciação da tradução, no sítio de fixação do ribossoma, ou iii) para o sítio do processamento.

Paul Miller da Universidade de Johns Hopkins de Baltimore foi um dos pioneiros destes estudos<sup>1</sup>. Utilizou como alvos os RNA mensageiros da  $\alpha$ - e da  $\beta$ -globina de coelho e como sistemas de expressão lisados de reticulócito de coelho e extratos de germe de trigo. A figura 1 representa a região dos mensageiros indo do "cap" até aos nucleotídeos 70 e os oligonucleotídeos sintéticos com cerca de doze nucleotídeos de comprimento, utilizados neste estudo, assim como a localização dos seus alvos respectivos. Os produtos da tradução destes genes foram analisados em gel de poliacrilamida e a quantificação foi efetuada por contagem das regiões de gel seco correspondentes às proteínas

$\alpha$ - e  $\beta$ -globina que incorporaram a metionina marcada radioativamente com enxofre <sup>35</sup>S. Na figura 2, nas colunas 2 a 5 está representada a análise das experiências em lisados de reticulócito de coelho, e de 6 a 9 em germe de trigo. A banda que corre mais rapidamente corresponde à  $\alpha$ -globina e a mais lenta à  $\beta$ -globina. Em 2 e em 6, o sistema de tradução na ausência de mensageiro não sintetiza globinas, como se esperava. Em 3 e 7 pode-se observar o resultado da tradução a partir dos mensageiros das globinas  $\alpha$ - e  $\beta$ . Quando se adicionam os oligonucleotídeos anti-sentido ao meio de incubação observa-se claramente inibição da síntese destas proteínas, no lisado de germe de trigo. Assim, em 8 a tradução é efetuada em presença de um oligonucleotídeo anti-sentido dirigido contra o mensageiro da  $\alpha$ -globina e pode-se observar inibição da tradução desta proteína. Em 9 é a tradução da  $\beta$ -globina que é inibida pela presença de um oligonucleotídeo anti-sentido dirigido contra o mensageiro desta proteína. No lisado de reticulócito de coelho a inibição não é tão nítida, provavelmente devido à baixa atividade da RNase H, (vide abaixo mecanismo da inibição) que por vezes ocorre neste sistema de lisados. No sistema de lisados de germe de trigo esta inibição ocorre já a concentrações relativamente baixas, da ordem de 5  $\mu$ M, e oligonucleotídeos com comprimento de 12 nucleotídeos, quando estes são dirigidos para a região a montante do sítio de iniciação da tradução dos mensageiros. Os oligonucleotídeos dirigidos para a região do "cap" na extremidade 5' são também eficazes, mas a uma concentração mais elevada.



**Figura 1.** Seqüências nucleotídicas parciais dos mRNAs  $\alpha$ - e  $\beta$ -globina de coelho. As seqüências dos oligodesoxirribonucleotídeos complementares estão indicadas por baixo de cada seqüência de mRNA.



**Figura 2.** Efeitos dos oligodesoxirribonucleotídeos anti-sentido na tradução fora de célula do mRNA de globina, num lisado de reticulócito de coelho (colunas 2-5) e num extrato de germe de trigo (colunas 6-9). As traduções no lisado de reticulócito foram realizadas a 37°C sem RNA (coluna 2), com mRNA de globina (coluna 3), com mRNA de globina + 25  $\mu$ M de d-CATGGTGGTTC (coluna 4) e com mRNA de globina + 25  $\mu$ M de d-CATTCTGTCTGT. As traduções no extrato de germe de trigo foram efetuadas a 25°C sem mRNA (coluna 6), com mRNA de globina (coluna 7), com mRNA de globina + 25  $\mu$ M d-CATGGTGGTTC (coluna 8) e com mRNA de globina + 25  $\mu$ M d-CATGGTGGTTC. As colunas 1 e 10 têm os marcadores moleculares seguintes: (a) ovalbumina (43 000daltons), (b)  $\alpha$ - quimotripsina (25 700daltons), (c)  $\beta$ -lactoglobulina (18 400daltons), (d) lisozima (14 300daltons) e citocroma c (12 300 daltons), (e) inibidor de tripsina bovina (6200 daltons), (f) insulina (3 000 daltons). A  $\alpha$ -globina (banda mais rápida) e a  $\beta$ -globina (banda mais lenta) nas colunas 2-9 comigraram com as proteínas autênticas.

Outras experiências, e nomeadamente um estudo efetuado sobre a inibição do vírus HIV em células em cultura, mostraram que oligonucleotídeos dirigidos para sítios de junção de certos genes (*tat*, por exemplo), são tão eficazes quanto os dirigidos para a região do "cap".

## O MECANISMO DA INIBIÇÃO

A inibição da tradução pode ser em muitos casos devida à atividade da RNase H, enzima que degrada o RNA quando este está envolvido em hibridação com DNA. Para verificar esta hipótese foi efetuada uma experiência de inibição competitiva da RNase H realizada com o mensageiro de globina de rato e com oligonucleotídeos anti-sentido em lisados de reticulócito de coelho<sup>2</sup>. A figura 3 representa a análise por hibridação em blot com uma sonda oligonucleotídica marcada com <sup>32</sup>P e dirigida para a região 5' dos mensageiros da globina de rato. Estes RNA mensageiros, após terem sido incubados no sistema de reticulócito, nas condições a seguir indicadas, foram extraídos com fenol e submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose e em seguida, transferidos para filtros. Na coluna 1 é unicamente o RNA mensageiro e em 2 em presença de um oligonucleotídeo anti-sentido com 25 nucleotídeos de comprimento. Em 3 é o resultado da digestão do mensageiro pela RNase H em presença do oligonucleotídeo. De 4 a 7 é o mensageiro colocado em presença de um inibidor competitivo, poli(rC)-poli(dG) - em 4 e em 5 - ou poli(rA)-poli(dT) - em 6 e em 7. Em 4 e em 6, além do inibidor competitivo foi adicionado o oligonucleotídeo anti-sentido. O resultado mostra claramente que a RNase H desempenha um papel importante na inibição, degradando o RNA mensageiro hibridado ao oligonucleotídeo anti-sentido.

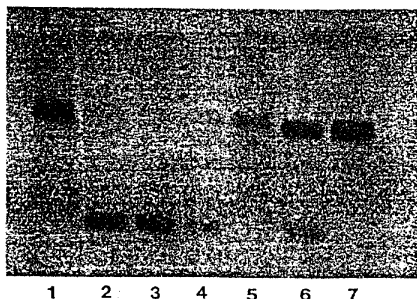


Figura 3. Inibidores competitivos da RNase H e clivagem do mRNA da  $\beta$ -globina de rato em lisados de reticulócito de coelho (vide texto).

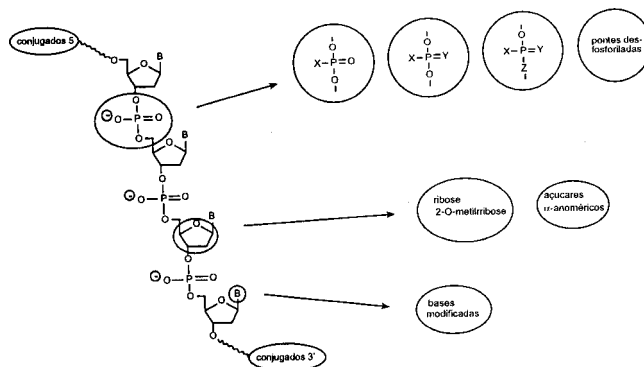
## LIMITAÇÕES DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

Apesar das potencialidades amplamente demonstradas em várias experiências, os oligonucleotídeos anti-sentido possuem todavia limitações importantes: 1) por um lado apresentam uma grande sensibilidade, tanto *in vivo* como *in vitro*, às nucleases celulares e às nucleases presentes nos meios de cultura e nos soros. Com efeito, o grupo fosfodiéster é substrato das DNases e pode ser clivado antes do oligonucleotídeo atingir o alvo; 2) por outro lado, sendo moléculas com uma carga elevada proveniente dos grupos diésteres fosfato, têm poucas probabilidades de penetrarem na célula rapidamente atravessando a membrana; 3) uma terceira limitação é a dificuldade de preparar oligonucleotídeos em quantidades substanciais necessárias para algumas das aplicações de maior interesse prático, como por exemplo as terapêuticas. As técnicas de síntese atualmente praticadas apresentam custos proibitivos para as aplicações em massa.

Estes inconvenientes levaram vários laboratórios a desenvolver oligonucleotídeos modificados afim de melhorarem i) resistência às nucleases, ii) a penetração celular, iii) a eficácia da ação inibitória.

## ANÁLOGOS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

As modificações foram introduzidas ou 1) no esqueleto fosfodiéster-açúcar, ou 2) nas extremidades da cadeia do oligonucleotídeo, ou 3) são anoméricas, *i.e.*, visam o carbono anomérico (esquema 3).



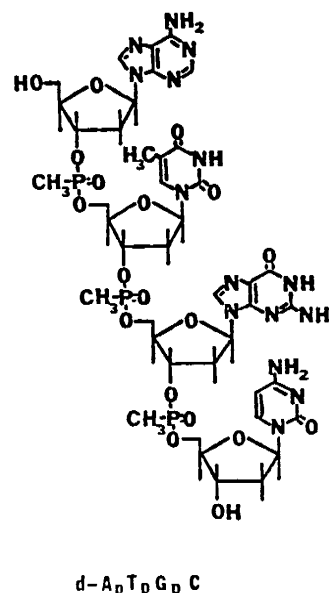
Esquema 3.

Nas modificações de esqueleto mais importantes, um ou os dois átomos de oxigênio que não participa(m) na ponte internucleotídica, foi(ram) substituído(s) por um grupo X ou Y. O grupo fosfato natural corresponde a  $X=Y=O^-$ . Quando um destes substituintes é um grupo metilo obtém-se um metilfosfonato. Quando X ou Y é um átomo de enxofre temos um fosfortioato e quando ambos correspondem a um átomo de enxofre trata-se de um fosforoditioato.

### a. Análogos modificados no grupo fosfato internucleotídico

#### a.1. Metilfosfonatos

Estes derivados foram desenvolvidos pelo grupo de P. Miller. A sua estrutura geral está representada no esquema 4. São derivados não iônicos, que possuem uma série de propriedades notáveis postas em evidência pelo referido grupo. São captados pelas células vivas, são resistentes às nucleases e são estáveis nas condições de cultura celulares.



d-A<sub>n</sub>T<sub>n</sub>G<sub>n</sub>C

Esquema 4. Estrutura de um oligodesoxirribonucleotídeo metilfosfonato.

O exemplo seguinte é uma aplicação destes oligonucleotídeos metilfosfonatos à inibição do vírus da SIDA, o HIV. O modelo utilizado é um sistema de células em cultura artificialmente infectadas com partículas virais<sup>3</sup>. O vírus e os oligonucleotídeos são adicionados simultaneamente às células em cultura e o nível de inibição do HIV é determinado medindo as sincítia (aglomerados característicos de células infectadas) e a expressão do antígeno viral P24, e comparado, em função do tipo de oligonucleotídeo e da concentração. Numa das experiências é utilizado um oligonucleotídeo metilfosfonato inteiramente metilfosfonatado e em outra experiência, um oligonucleotídeo diéster fosfato, ambos com 20 nucleotídeos e de composição idêntica em bases. Os oligonucleotídeos foram dirigidos para a região 5' do "cap" do RNA viral ou para o sítio de junção de processamento do gene *Tat* do HIV. É evidente a maior eficácia inibidora do análogo metilfosfonato, sobretudo a baixas concentrações (fig.4).

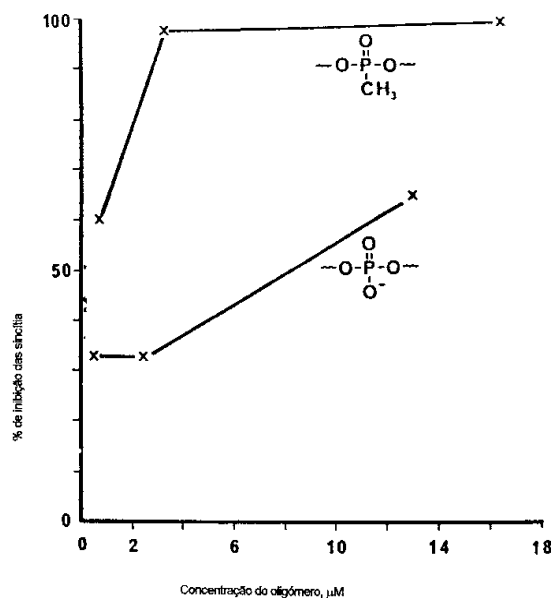


Figura 4. Aumento da atividade antiviral substituindo os grupos fosfatos internucleosídicos por metilfosfonatos.

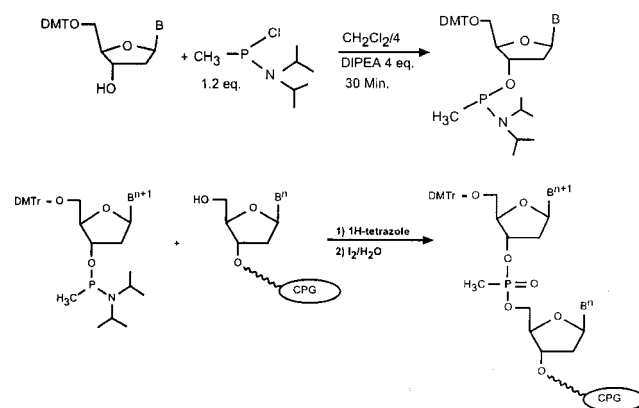
À medida que o número de ligações metilfosfonatos aumenta, a solubilidade destes análogos diminui. Para evitar este problema foram sintetizados e utilizados oligonucleotídeos comportando unicamente dois grupos metilfosfonatos nas extremidades 3' e 5', esperando assim não alterar as propriedades de resistência às nucleases. O comportamento destes derivados é semelhante ao dos oligonucleotídeos não modificados, o que indica que são sensíveis às nucleases.

Os derivados metilfosfonatos possuem a propriedade de conferirem resistência ao híbrido formado com o RNA contra a RNase H. Por consequência, o mecanismo de degradação pela RNase H não é essencial para a atividade dos metilfosfonatos.

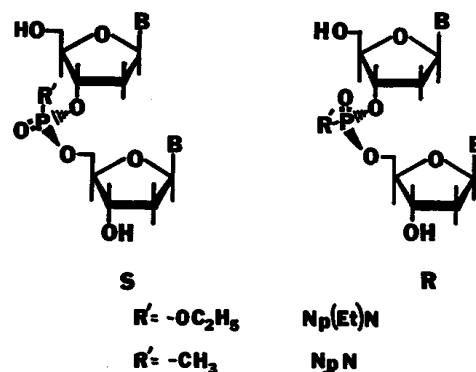
Além do problema da solubilidade já referido, existe o da concentração eficaz. Com efeito, a concentração necessária em oligonucleotídeos metilfosfonatos para obter inibição é relativamente elevada. Neste exemplo, uma concentração de 4 a 5 µM é efetiva. Seria desejável que fosse mais baixa, mas há casos em que é necessário chegar aos 100 µM para obter um efeito. Este fato pode refletir o problema da quiralidade do átomo de fósforo. Com efeito, durante a síntese química, que não é estereoespecífica, formam-se 2<sup>n</sup> diastereoisômeros, em que n é o número de centros quirais, *i.e.*, de átomos de fósforo na forma de metilfosfonato.

Em síntese são utilizados atualmente sintons metilfosfonamídicos que, à semelhança dos fosforamídicos utilizados na síntese

de oligofosfodiésteres, são muito reativos, reduzindo fortemente os tempos de condensação, que são mais elevados em série metilfosfonato que com os oligonucleotídeos não modificados<sup>4</sup>. A síntese do sinton metilfosfonamídico e a reação de condensação estão representadas no esquema 5. O diisopropilamino-cloro-metilfosfito é levado a reagir com o grupo hidroxílico em 3' do nucleosídeo protegido na base e no grupo hidroxílico em 5', fornecendo o sinton. Este é em seguida condensado em presença de tetrazolo com a extremidade 5' livre do oligonucleotídeo em extensão no suporte sólido da síntese (CPG). Após oxidação com iodo em água, da ligação metilfosfonito internucleotídica obtida na reação de condensação, formam-se as duas estruturas correspondentes às configurações R e S do átomo de fósforo, as quais permanecem misturadas no suporte sólido da síntese (esquema 6). Em n etapas de condensação obtém-se uma mistura final de 2<sup>n</sup> diastereoisômeros dos quais só alguns possuem afinidade com a seqüência alvo. Estes inconvenientes dos metilfosfonatos, a quiralidade do átomo de fósforo e a fraca solubilidade estimularam o desenvolvimento de outros análogos, dos quais os fosforotioatos merecem particular relevo.



Esquema 5.

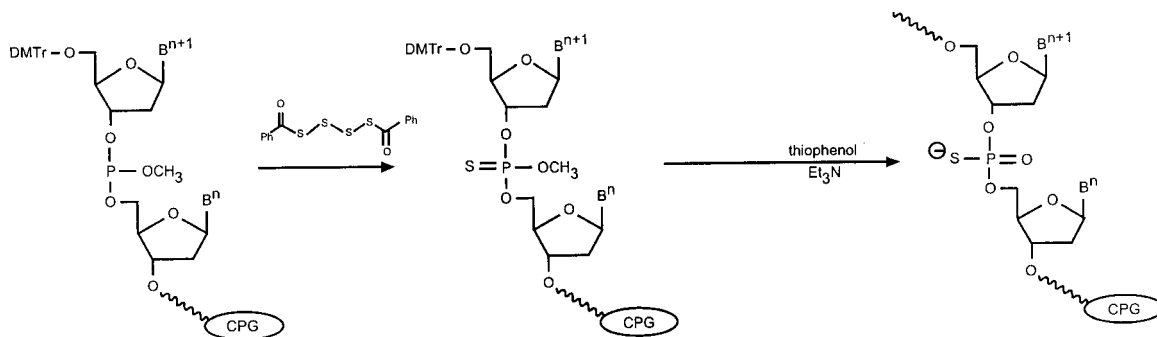


Esquema 6.

## a.2. Fosforotioatos

Estes compostos, em que um dos átomos de oxigênio é substituído por um átomo de enxofre, são, como os metilfosfonatos, resistentes às nucleases, mas contrariamente a estes, são, por um lado bem solúveis em meio aquoso, visto manterem a carga iônica, e por outro lado formam complexos com o RNA alvo que são sensíveis à RNase H. A inibição mediada pelos fosforotioatos pode pois ser estimulada pela atividade desta enzima.

Os fosforotioatos são potentes inibidores da proliferação viral. São nomeadamente ativos contra a infecção por HIV de



Esquema 7.

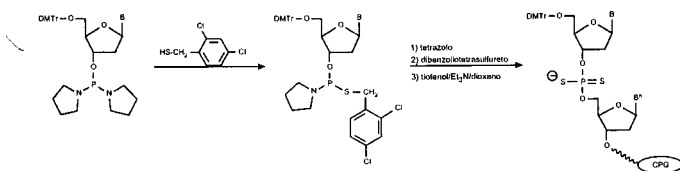
células em cultura<sup>5</sup>. Têm, no entanto, a desvantagem de exercerem por vezes uma inibição não específica, independente da seqüência nucleotídica.

Estes análogos possuem, como os metilfosfonatos duas configurações, R e S, ao nível do átomo de fósforo. A sulfuração realiza-se com reagentes ricos em enxofre, tais como o dibenzotetrassulfureto ou o fenilacetildissulfureto, reação que substitui a oxidação com I<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (esquema 7) na síntese dos diésteres não modificados, em fase sólida, e conduz em cada etapa a misturas complexas de diastereoisômeros<sup>6</sup>.

O problema da diaestereoisomeria pode ser resolvido se o segundo átomo de oxigênio ligado ao fósforo, o que não participa na ponte internucleotídica, for também substituído por um segundo átomo de enxofre.

### a.3. Fosforoditioatos

Foi M.H. Caruthers da Universidade de Colorado quem desenvolveu esta química<sup>7</sup>, que faz intervir a condensação de um fosforotioamidito com um segundo nucleotídeo sob catálise do tetrazolo. O intermediário resultante é tratado com um agente de sulfuração e convertido em fosforoditioato. A síntese pode ser efetuada em suporte sólido como ilustrado no esquema 8. A desproteção efetua-se em duas etapas: i) o grupo protetor S-(2,4-diclorobenzilo) é eliminado com tiofenol em trietilamina/dioxano e ii) em seguida as bases são desprotegidas com amoníaco concentrado como habitualmente. Os sintões utilizados são ou N,N-dimetil- ou piperidínifosforamiditos, porque o grupo N,N-diisopropilo, utilizado na série não modificada, revelou-se na série do enxofre demasiado inerte.



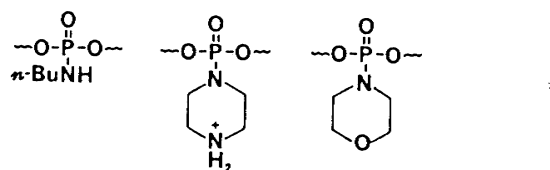
Esquema 8.

Estes oligonucleotídeos fosforoditioatos parecem ser inibidores ainda mais potentes que os fosforotioatos, mas apresentam, no entanto, como os seus homólogos fosforotioatos, alguma falta de especificidade.

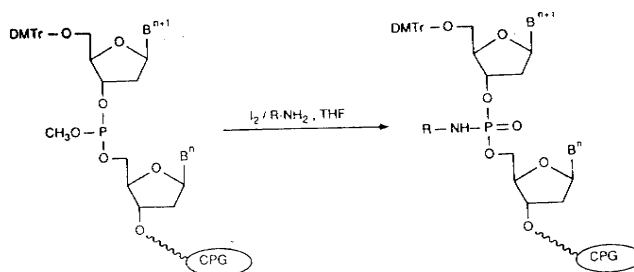
### a.4. Fosforoamidatos

Os fosforamidatos fazem parte dos análogos modificados na ligação internucleotídica, nos quais um oxigênio é substituído por um grupo R<sub>2</sub>N, tais como o butilamidato, o piperazidato ou o morfolidato (esquema 9). Os fosforamidatos podem ser

preparados por oxidação de fosfitos triésteres com I<sub>2</sub>/alquilamina (esquema 10). Estes compostos, menos estudados que os fosforotioatos, apresentam potencialidades semelhantes às daqueles análogos (Fig. 5).



Esquema 9.



Esquema 10.

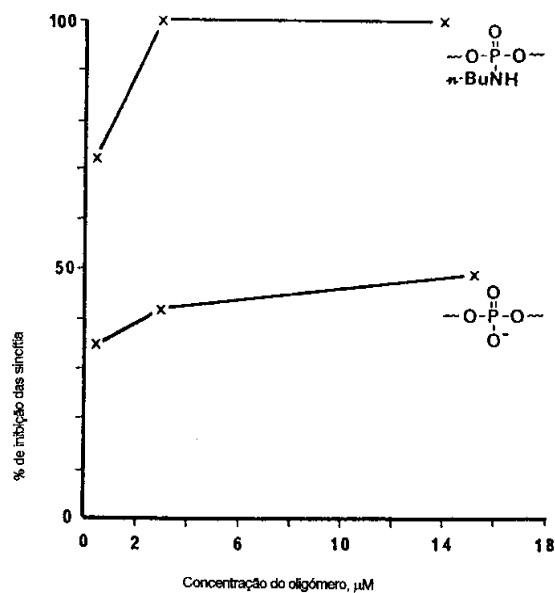


Figura 5. Aumento da atividade antiviral substituindo os grupos fosfatos internucleosídicos por N-butilfosforamidatos.

Os compostos que acabamos de analisar são derivados em que foi modificado um ou dois átomos ligados ao fósforo, *i.e.*, os oxigênios que não participam na ponte internucleotídica. O esquema 3 ilustra as possibilidades de modificação química dos oligonucleotídeos: ao nível da ligação internucleotídica, ao nível da ribose, da base e nas extremidades 5' e 3'. A estas extremidades pode-se ligar uma grande variedade de moléculas.

### b. Análogos modificados nas extremidades

O desenvolvimento de oligômeros derivatizados nas extremidades com reagentes ligados de maneira covalente visa i) por um lado proteger o oligômero das exonucleases, ii) por outro lado estimular a penetração através das membranas celulares, iii) e ainda, aumentar a afinidade para com as seqüências complementares.

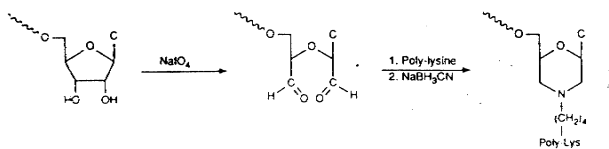
Podemos dividir estes compostos em diferentes classes, de acordo com a finalidade procurada:

- conjugados oligopeptídicos;
- agentes intercalantes;
- agentes alquilantes
- endonucleases artificiais e conjugados enzimáticos;
- transportadores lipofílicos e conjugados peptídicos

As modificações têm sido introduzidas tanto em 5' como em 3'.

Na classe dos conjugados oligopeptídicos é de salientar o trabalho do grupo de B. Lebleu do CNRS, Montpellier, que sintetizou conjugados oligonucleotídeo-polilisina com a finalidade de melhorar as propriedades de transporte dos oligonucleotídeos anti-sentido para dentro da célula<sup>8</sup>.

Examinemos brevemente a abordagem seguida para a síntese (esquema 11). Após síntese em fase sólida e clivagem do suporte, os oligonucleotídeos foram prolongados enzimaticamente de uma unidade ribose 3' terminal, utilizando uma ligase de RNA do fago T4. Esta ribose foi depois oxidada com periodato e o dialdeído resultante condensado com um grupo 6-aminado da polilisina e em seguida a diimina foi reduzida com cianoboridreto em conjugado N-morfolino. Uma alternativa seria a incorporação de citidina no oligonucleotídeo em 3', ligando-a ao suporte sólido nas condições padrão e protegendo o grupo hidroxílico em 2' (ou em 3') por acetilação.



Esquema 11.

Nos estudos realizados pelo grupo de B. Lebleu foram sintetizados pentadecâmeros conjugados à polilisina composta de 66 unidades. Estes derivados foram sintetizados para serem dirigidos para as regiões 5' ou de processamento dos RNAs mensageiros alvos e revelaram-se inibidores da síntese de proteínas virais ou da expressão de oncogenes, a concentrações tão baixas de conjugado como 0,2  $\mu\text{M}$  (200 nM)<sup>9</sup>. Esta eficácia deve-se ao aumento da estabilidade e a uma captura celular superior. A figura 6 exemplifica o efeito inibitório na proliferação de células (L929 em A e HeLa em B) por oligonucleotídeos anti-sentido dirigidos para o codon de iniciação e os 4 codons seguintes dos RNA mensageiros do oncogene *c-myc*.

Nestes exemplos os oligômeros conjugados com a polilisina são adicionados ao meio de cultura celular em presença de heparina. Observa-se uma inibição superior a 50% com uma concentração de 2  $\mu\text{M}$ . A uma concentração de 1  $\mu\text{M}$  atinge-se já uma inibição de 50%.

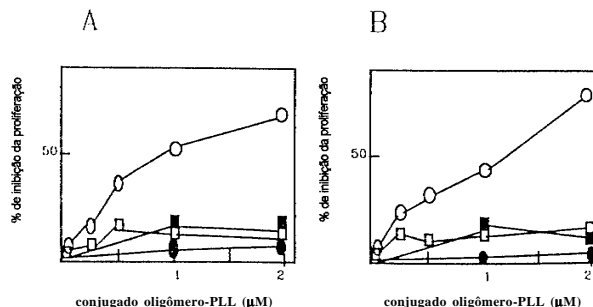


Figura 6. Efeitos antiproliferativos dos oligômeros anti-sentido conjugados com polilisina (PLL). (A) em células L929; (B) Em células HeLa. As células foram incubadas com os conjugados oligômero-PLL dirigidos para *c-myc* (○□) ou para VSV (○■, controle), com (○○) ou sem (□■) heparina.

Igualmente impressionante, é o efeito antiviral observado contra outros vírus como o VSV ("vesicular stomatitis virus") com concentrações em oligonucleotídeo da ordem de 100 nM. Até então só se tinham obtido efeitos com concentrações micromolares de oligonucleotídeos<sup>9</sup>.

A excelente atividade destes derivados só parcialmente pode ser explicada por um aumento da estabilização contra as 3'-exonucleases, assegurada pela ligação covalente com a polilisina. É provavelmente uma combinação da estabilização contra as 3' exonucleases e um aumento da eficácia de penetração nas células, que pode ser estimulada pelo polication, componente estabilizador da hélice.

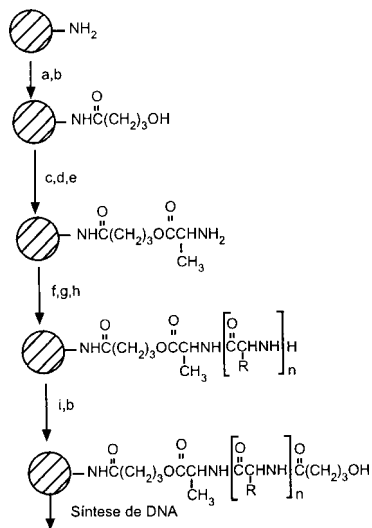
A utilização destes compostos está, no entanto, associada a alguns problemas. Assim a polilisina tem um efeito tóxico em muitas células a concentrações de 2  $\mu\text{M}$  ou superiores. Possui uma grande afinidade com as membranas celulares, devido à permeabilização desta e pode bloquear os receptores. A adição de um polication como a heparina, tem como resultado diminuir os efeitos tóxicos da poli-L-lisina e aumentar ainda a estabilização contra as nucleases. Além disso, os conjugados polilisina oligonucleotídeo têm tendência a formar agregados que são tanto mais insolúveis quanto maior for o oligômero.

Em relação ao mecanismo de ação supõe-se que o efeito inibitório se exerce por interferência com a tradução, porque os níveis de RNA endógeno não são afetados, pelo menos em alguns casos estudados.

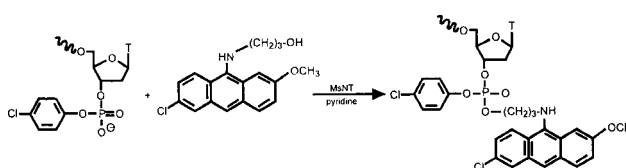
De uma maneira geral, um conjugado oligonucleotídeo-peptídeo pode ser sintetizado em fase sólida, como descrito por J. Haralambidis *et al.*<sup>10</sup>. A cadeia peptídica é primeiro sintetizada no suporte sólido pelo método do Fmoc, e em seguida é condensado na extremidade NH<sub>2</sub> da cadeia peptídica um linker em C<sub>4</sub>. A síntese do oligonucleotídeo é então iniciada na extremidade hidroxílica livre deste linker. O conjugado é inteiramente desprotegido no fim da síntese em fase sólida e clivado do suporte (esquema 12).

### c. Oligonucleotídeos conjugados com agentes intercalantes

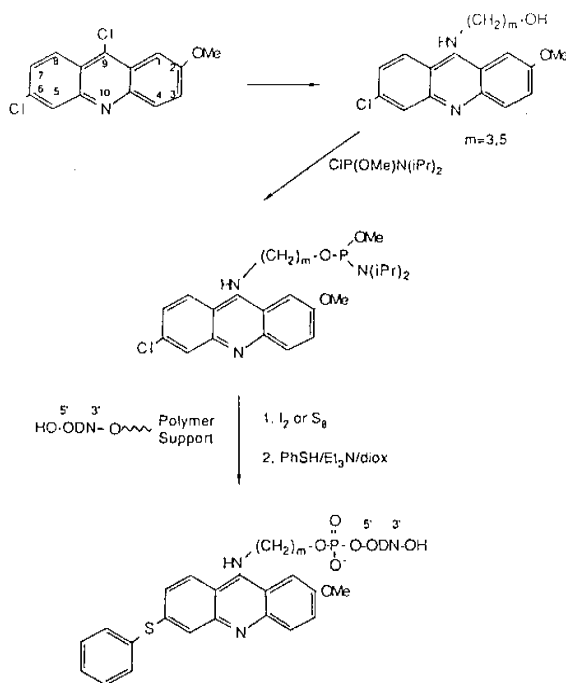
O agente intercalante mais utilizado e estudado é um derivado da acridina, mais precisamente o 2-metoxi-6-cloroacridina, desenvolvido por Claude Hélène *et al.*<sup>11</sup> do Laboratório de Biofísica do Museu Nacional de História Natural de Paris e por Nguyen Thuong do Centro de Biofísica Molecular de Orléans. Este grupo derivado da acridina foi ligado, tanto na extremidade 3' pela química do fosfato triéster (esquema 13), como na extremidade 5' de um oligonucleotídeo, pelo método do fosforamidito (esquema 14). Os análogos metilfosfonatos e fosforotioatos foram também derivatizados em 3' por este agente intercalante derivado da acridina.



Esquema 12.



Esquema 13.



Esquema 14.

A finalidade de utilizar um agente intercalante ligado a um oligonucleotídeo é de fornecer uma energia suplementar de interação que estabilize o complexo formado entre o oligonucleotídeo e o alvo. O grupo de Hélène mostrou que, efetivamente, o resíduo acridina ligado covalentemente na extremidade 3' do octadecâmero timidínico ( $T_8$ ) aumenta a temperatura  $T_m$  (temperatura à qual 50% da cadeia dupla se dissocia em cadeias monocatenárias) do híbrido formado com um poli A de 33 para 47°C, em relação a um dodecâmero  $T_{12}$ <sup>12</sup> (Fig. 7).

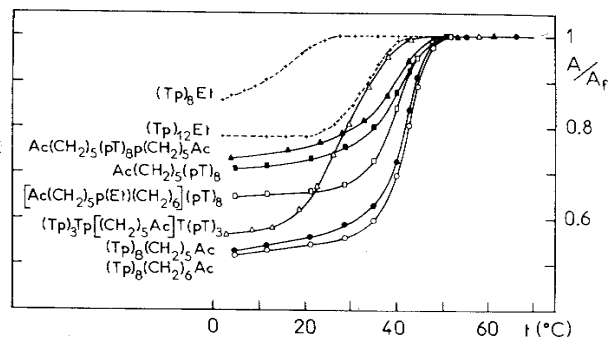


Figura 7. Curvas de fusão de complexos poli(rA) com diversos oligotimidilatos. Ac = Acridina; Et = etilo. A absorvância foi medida a 425 nm para os compostos comportando o grupo acridina e a 260 nm para os compostos (Tp)nEt.

O comprimento da cadeia alquila que liga a acridina ao oligonucleotídeo anti-sentido tem um efeito crucial na estabilidade do híbrido. As cadeias em C5 e C6 asseguram uma estabilidade bem superior às cadeias menores (por exemplo 10°C de diferença entre um linker com 5 átomos de carbono e um linker com 3 carbonos, para um oligômero tetraimidínico, como é aparente na figura 8).

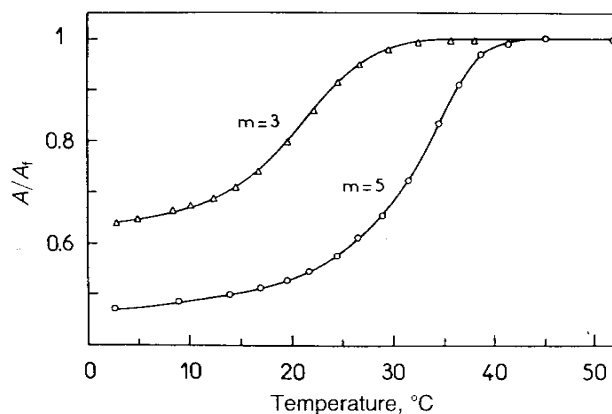
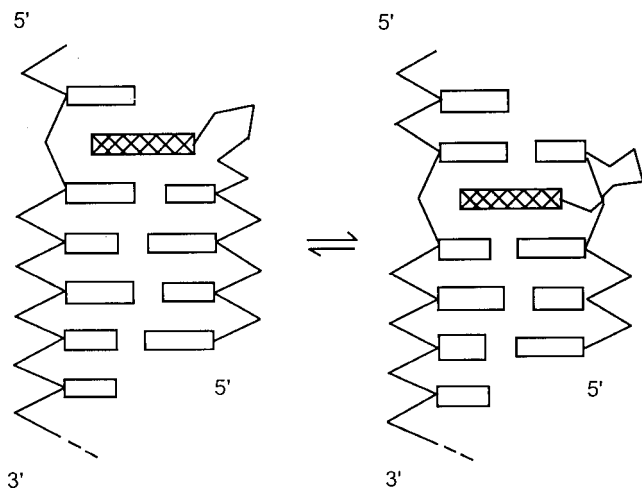


Figura 8. Curvas de fusão medidas a 425 nm para os complexos formados entre  $(Tp)_4(CH_2)_3Acr$  ( $\Delta$ ) ou  $(Tp)_4(CH_2)_5Acr$  (O) e poli(rA).

O esquema 15 é uma representação esquemática das estruturas dos complexos formados com o agente intercalante. A estrutura da acridina representada pelo retângulo ligado por uma ponte metilênica ao fosfato 3' do oligonucleotídeo pode empilhar-se no topo da última base do híbrido ou intercalar-se entre dois pares de bases. As vantagens destes compostos podem resumir-se da seguinte maneira: 1) a energia de estabilização suplementar permite formar complexos fortemente hibridados com oligonucleotídeos curtos; 2) a penetração celular é facilitada porque oligonucleotídeos curtos possuem menos cargas negativas. Além disso, o agente intercalante arrasta o oligonucleotídeo para dentro das células pela sua natureza lipofílica; 3) o agente intercalante em 3' protege o oligonucleotídeo das 3' exonucleases.

Algumas experiências significativas mostraram que é possível inibir eficazmente o efeito de certos patógenos em células em cultura pela ação destes derivados<sup>13</sup>. Exercem, por exemplo, um efeito letal no *Trypanosoma brucei*, parasita unicelular. Estes parasitas ludibriam a resposta imunitária do hospedeiro fazendo variar periodicamente a glicoproteína VSG de superfície que cobre a célula. Estes organismos possuem uma sequência comum de 35 nucleotídeos na extremidade 5' dos seus RNA mensageiros, chamada minixon. Um oligonucleotídeo anti-sentido ligado a um derivado acridina dirigido para a região do

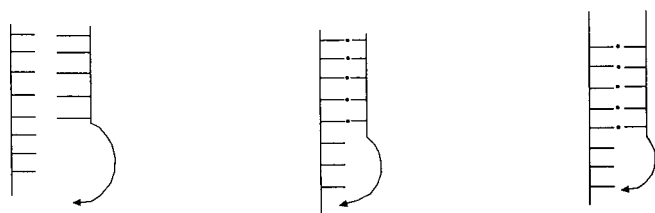


Esquema 15.

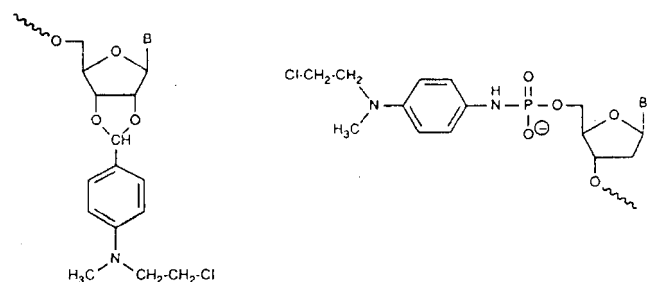
minixon, não só inibe especificamente a síntese proteica a partir do mRNA de *T. brucei* num lisado de reticulócito de coelho, mas também tem um efeito letal sobre o parasita. Após 45 h de incubação a 26°C nenhum parasita sobrevive a uma concentração de 130 µM.

#### d. Oligonucleotídeos conjugados com agentes alquilantes

O objetivo destes análogos consiste em obter uma modificação irreversível e específica do DNA ou do RNA alvo através de um "cross-linking" provocado pela ação alquilante do grupo ligado ao oligonucleotídeo anti-sentido (esquema 16). Esta idéia foi posta em prática há cerca de 30 anos pelo grupo de Grineva *et al*<sup>14</sup>. Estes investigadores russos utilizaram um dirribonucleotídeo funcionalizado em 3' através de uma ligação acetal, com um grupo 2-(cloroetil)amino aromático (esquema 17). Devido à participação do azoto enquanto grupo vizinho, o grupo cloroetilamino é particularmente apto para a alquilação e portanto para um "cross-linking". Esta abordagem foi posteriormente desenvolvida com oligonucleotídeos. O grupo alquilante é introduzido em 5' por via de uma ligação fosforoamídica (esquema 17).



Esquema 16.



Esquema 17.

Os derivados que têm sido mais investigados são as [N-(2-cloroetil)-N-metilamino]benzilaminas<sup>15</sup>.

Qualquer das quatro bases do ácido nucleico alvo é alquilada pelas 2-cloroetilaminas com uma ordem de reatividade: G>A~C>T.

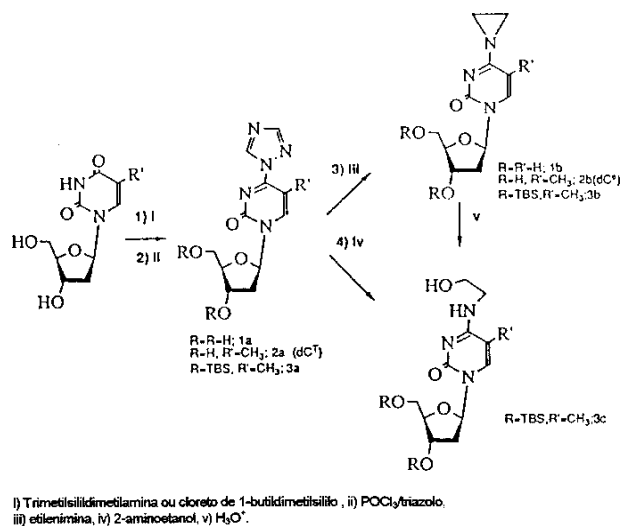
A reação ocorre em duas etapas: forma-se inicialmente um cátion etilamônio por ciclização intramolecular e, em seguida, este é atacado por nucleófilos de acesso fácil.

A alquilação parece ser estimulada pela hibridação, visto não se observar "self"-alquilação.

No que diz respeito às aplicações, foram testados nomeadamente sistemas baseados, por um lado em células de mieloma de rato, em que foi suprimida a expressão dos mRNAs codificando para as cadeias leve (L) e pesada (H) pela ação de um oligonucleotídeo alquilante, complementar da região do mRNA que codifica para a parte variável da cadeia leveira da imunoglobulina<sup>16</sup>, e por outro lado em fibroblastos de frango infectados com o vírus da influenza.

Os vírus da influenza têm um genoma constituído por oito cadeias de RNA monocatenário. Todos estes fragmentos possuem seqüências terminais 5' e 3' conservadas entre os segmentos e entre os diferentes subtipos virais. São, em alvo ideal para a modificação dirigida por oligonucleotídeos com seqüências complementares. Oligonucleotídeos alquilantes dirigidos para as regiões conservadas foram adicionados aos fibroblastos imediatamente após a infecção e uma segunda vez mais tarde, e os efeitos foram comparados com os dos controles. Em concentrações da ordem dos 100 µM estes oligonucleotídeos inibem efetivamente a multiplicação do vírus<sup>17</sup>.

Outros agentes alquilantes foram sintetizados e utilizados tais como o 5-metil-N<sup>4</sup>,N<sup>4</sup>-etanocitosina, cuja síntese está representada no esquema 18<sup>18</sup>. Este derivado poderia apresentar vantagens, pois dispensa a ciclização obrigatória dos derivados cloroetilaminados, que é a etapa determinante da velocidade da reação. Contudo, a velocidade de alquilação com estes derivados é demasiado baixa para ser útil. Mais recentemente foi introduzido um terceiro agente alquilante na forma de 2-(N-iodoacetilaminoetil)tioadenina<sup>19</sup>. A eficácia de alquilação foi determinada por clivagem de um oligonucleotídeo complementar pontado com o oligonucleotídeo anti-sentido, seguido de tratamento com piperidina e verificou-se ser, no entanto, muito reduzida.



Esquema 18.

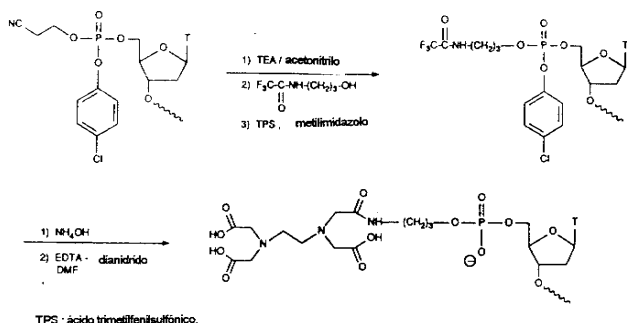
#### e. Endonucleases artificiais e conjugados enzimáticos

Esta classe de análogos compreende as endonucleases artificiais e os conjugados enzimáticos. As endonucleases artificiais



são os conjugados em que o componente não nucleotídico é capaz de clivar os ácidos nucleicos, mas não especificamente e só adquire uma especificidade de clivagem num sítio preciso do alvo, ao ser ligado covalentemente ao oligonucleotídeo. Esta classe de compostos inclui nomeadamente complexos de metais tais como EDTA-Fe (II), o-fenantrolina-Cu (I), ou a porfirina-Fe(II).

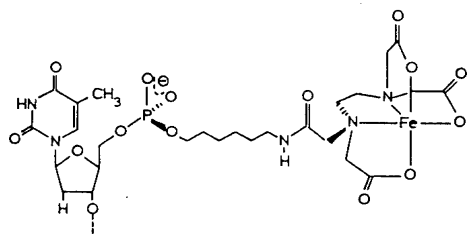
O grupo EDTA pode ser ligado a um oligonucleotídeo introduzindo primeiro um derivado alquilaminado por condensação do fosfodiéster com o aminopropanol protegido e, em seguida, após desproteção da amina, efetuando a acilação com o anidrido do EDTA (esquema 19)<sup>20</sup>.



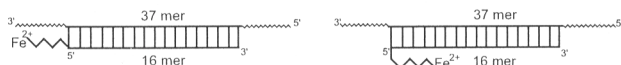
Esquema 19.

Orgel *et al* do Salk Institut, San Diego<sup>21</sup> adotaram um esquema semelhante, com a diferença de terem utilizado uma ponte etilendiamina.

A atividade nucleásica obtem-se incubando o híbrido formado entre o oligonucleotídeo anti-sentido conjugado com o EDTA, e o DNA alvo, em presença de Fe<sup>++</sup> (esquema 20). A clivagem do DNA foi exemplificada com um DNA alvo de 37 nucleotídeos ao qual se hibrida um hexadecâmero complementar conjugado (esquema 21). A experiência mostra que as clivagens mais eficientes ocorrem cerca de 4 nucleotídeos de cada lado do fosfato 5' terminal do hexadecâmero.



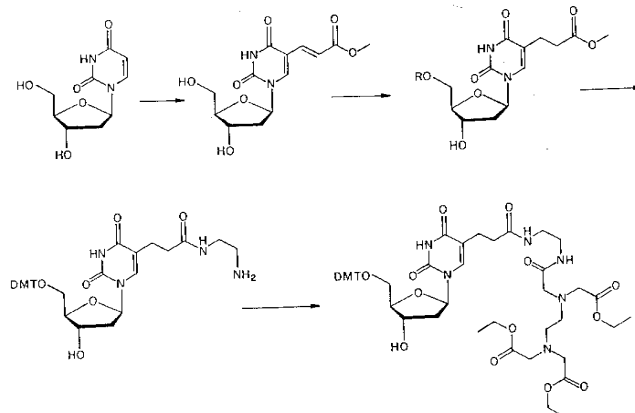
Esquema 20.



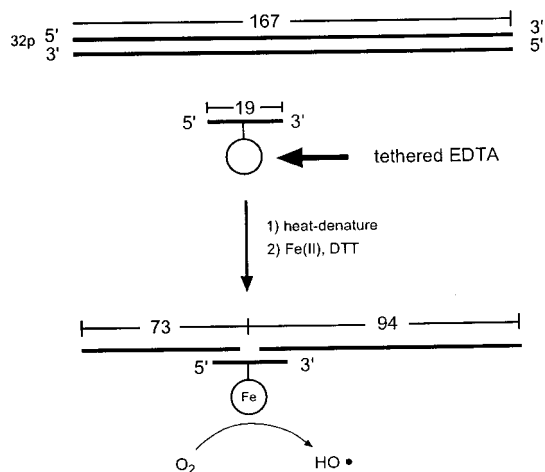
Esquema 21.

O grupo EDTA pode também ser introduzido na posição 5 da timina. Dervan *et al* utilizaram esta abordagem, sintetizando primeiro um sinton timidínico derivatizado no carbono 5 com o grupo 3-propanil(2-aminoetil)amida, o qual foi em seguida acilado com um derivado N-hidroxissuccinimídico do EDTA (esquema 22)<sup>22</sup>. A vantagem deste sinton reside na possibilidade de poder ser incorporado em qualquer posição que se pretenda do oligonucleotídeo. A ação e as condições de clivagem estão esquematizadas no esquema 23. Em presença do íon Fe<sup>++</sup>, de oxigênio e de ditiotreitól (DTT), o conjugado oligonucleotídeo-

EDTA, que é complementar de um fragmento de 167 nucleotídeos, proveniente da desnaturação de DNA bicatenário, provoca a clivagem do fragmento de DNA. As espécies ativas são os radicais hidroxílicos gerados pelo quelato Fe<sup>++</sup>-EDTA, em presença de O<sub>2</sub> e de ditiotreitól. Estes radicais atacam o átomo de carbono 4', originando a ruptura do esqueleto de DNA. O padrão de clivagem está representada no esquema 24. O comprimento das flechas representa a percentagem relativa de clivagem nos sítios indicados. A clivagem preferencial ocorre em dois sítios situados 4 nucleotídeos distantes de cada lado do nucleotídeo (Timidina neste exemplo) portador do grupo EDTA. Sítios secundários de clivagem estão representados por flechas menores. Estes resultados indicam que deve haver espécies difusíveis responsáveis pela clivagem múltipla.



Esquema 22.



Esquema 23.

Os oligonucleotídeos metilfosfonatos foram também derivatizados com grupos queladores ligados por uma ponte etilendiamina.

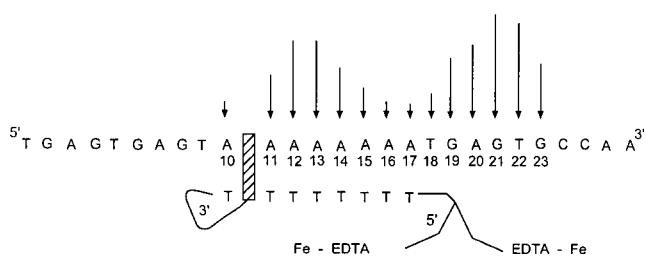
Estes análogos têm a vantagem em relação às endonucleases de restrição de poderem ser programados para clivarem em qualquer ponto escolhido antecipadamente. No entanto, como vimos, a clivagem observada não é única e antes múltipla, mesmo se existe uma certa seletividade. Por esta razão se procuraram outras soluções.

C. Hélène *et al*, por exemplo, desenvolveram compostos oligonucleotídicos ligados em 3' a um grupo intercalante derivado da acridina e em 5' ao grupo quelador EDTA. O objetivo é tornar irreversível a interação do oligonucleotídeo anti-sentido com a seqüência alvo graças à ação do intercalante<sup>23</sup>. O grupo



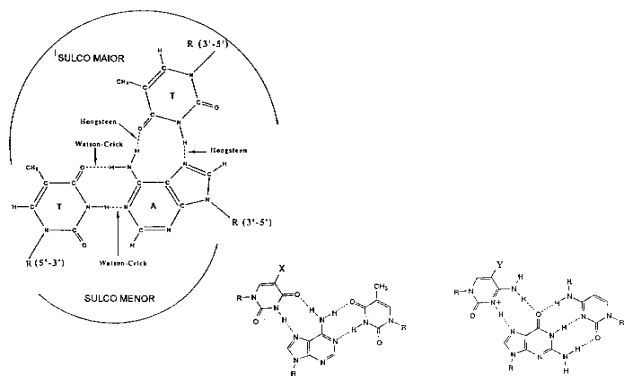
Esquema 24.

quelador foi nesta abordagem introduzido no fosfato em 5' por um linker hexametileno, ligado a um dos 4 grupos carboxílicos do EDTA por uma ligação amida. O complexo com o Fe (II) foi formado preliminarmente e em seguida adicionado ao DNA alvo. O agente redutor é adicionado em último lugar. No entanto, a clivagem observada continua a ser múltipla, como está ilustrado no esquema 25, em que a distribuição estatística de clivagem está representada pelo comprimento relativo das flechas. Em 3' está representado esquematicamente o agente intercalante.



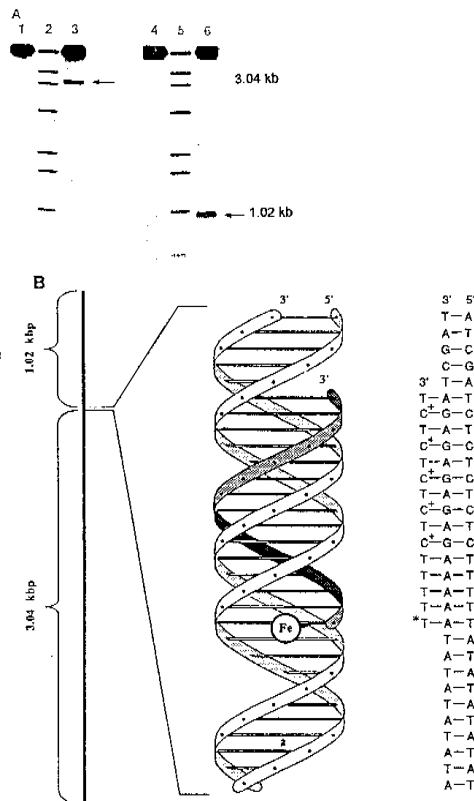
Esquema 25.

Estes agentes de clivagem podem também clivar a hélice dupla do DNA. Esta ação passa pela formação preliminar de uma hélice tripla. A formação de hélice tripla é conhecida há mais de 30 anos. Por exemplo poli(U) e poli(A) formam um complexo estável poli(U)-poli(A) em proporção de 2:1 e poli(C) forma uma tripla com poli(G). As ligações hidrogênio que asseguram a formação destes complexos são chamadas de Hoogsteen e estão representadas pelos tripletos TAT e C<sup>+</sup>GC (esquema 26).



Esquema 26.

As duas cadeias polipirimidínicas estão orientadas em antiparalelo (esquema 27)<sup>24</sup>. A posição e a assimetria do padrão de clivagem revela que os oligonucleotídeos homopiridínicos derivatizados com EDTA se hibridam no sulco maior da cadeia homopurínica do DNA de Watson e Crick em orientação paralela. As setas indicam a posição dos fragmentos de clivagem do DNA de um plasmídeo marcado numa extremidade, ou na extremidade oposta, gerando fragmentos de comprimento de 3.04 e 1.02 Kpb, como é visível nas colunas 3 e 6. As colunas 2 e 5



Esquema 27.

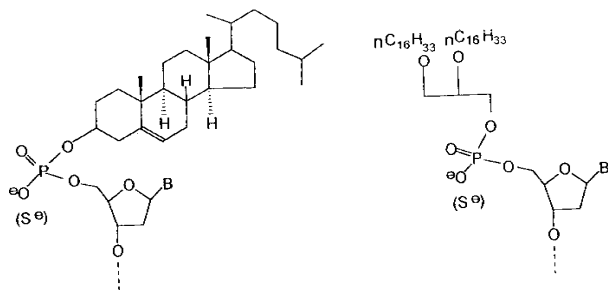
representam marcadores de comprimento e 1 e 4 o plasmídeo na ausência de agente de clivagem.

Estes oligonucleotídeos homopirimidínicos e os seus análogos derivatizados com grupos de clivagem podem vir a ser instrumentos de grande utilidade em análise cromossômica, mapeamento de genes, ou ainda como repressores artificiais para uma quimioterapia baseada na formação de triplex com DNA.

### f. Transportadores lipofílicos e conjugados peptídicos

É importante ainda referir as tentativas efetuadas para melhorar o transporte dos oligonucleotídeos para dentro das células. A abordagem utilizada recorre à ligação covalente de transportadores lipofílicos<sup>25</sup> e de peptídeos. A incorporação e a utilização da polissina conjugada a oligonucleotídeos, que já referimos, é um exemplo desta abordagem. A síntese de nucleopeptídeos através dos ésteres fosfatos das cadeias laterais da tirosina e da serina foram também descritos por Van Boom *et al* da Universidade de Leiden<sup>26</sup>.

Além destes derivados peptídicos convém citar a síntese de conjugados oligonucleotídicos com alcoóis de longa cadeia lipídica<sup>27</sup> e com o colesterol (esquema 28)<sup>28</sup>. Estes derivados, que são freqüentemente preparados na forma de fosforotioatos, apresentam um aumento considerável da atividade inibidora, que pode ser explicada por um aumento de estabilidade e pela interação com as camadas lipídicas das membranas celulares.

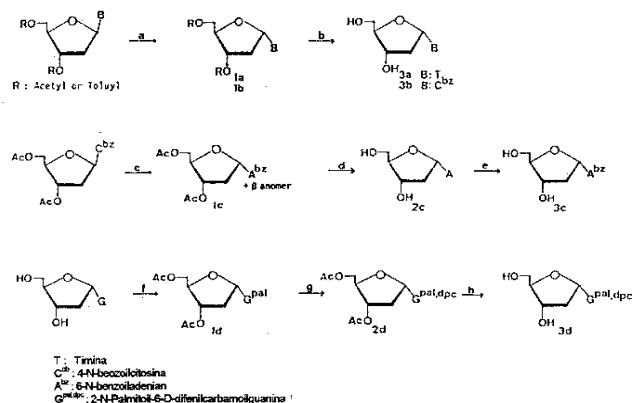


Esquema 28.

Um outro meio de melhorar a penetração dos oligonucleotídeos anti-sentido através das membranas recorre à sua incorporação em lipossomas<sup>29</sup>. Esta abordagem está muito pouco documentada devido, sem dúvida, à baixa estabilidade dos lipossomas. Trabalhos estão atualmente em curso, com vista ao desenvolvimento de lipossomas mais estáveis.

### g. Oligonucleotídeos $\alpha$ -anoméricos

Dentro dos análogos modificados nas unidades nucleosídicas, um grupo muito particular é aquele em que a ligação glicosídica está na configuração  $\alpha$ -anomérica (esquema 29). Oligonucleotídeos  $\alpha$ -anoméricos foram sintetizados por Imbach *et al* da Universidade das Ciências e Técnicas do Languedoc, Montpellier<sup>30</sup>. Imbach mostrou que estes oligonucleotídeos formam uma hélice com a cadeia complementar de configuração  $\beta$ , e que as duas cadeias se orientam com polaridades paralelas<sup>31</sup>.



Síntese de  $\alpha$ -desoxi-2'-nucleosídeos protegidos

- Trimetilil trifluorometanosulfonato, N,O-bis(trimetilil)acetamida/acetnitrilo
- Mistura de ácido metálico ou NaOH, H<sub>2</sub>O, 2,6-dicloro-1,4-dioxano
- Trimetilil trifluorometanosulfonato, N,O-bis(trimetilil)acetamida, 6-N-benzoziladenina/acetnitrilo
- MeOH/NH<sub>3</sub>
- 1) Cloro de trimetilil(piridina, 2) cloro de benzal, 3) NH<sub>3</sub> aq.
- 1) Anidrido acético/N,N-dimetilformamida-piridina, 2) cloro de palmitil
- Cloro de difenilcarbamolpiridina
- NaOH aq./etanol

Esquema 29.

Estes derivados  $\alpha$ -anoméricos revelaram-se muito estáveis às nucleases. Os híbridos formados em orientação paralela com os  $\beta$ -anoméricos são muito mais estáveis que os híbridos naturais que se hibridam em anti paralelo<sup>32</sup>. Estas propriedades levaram aqueles investigadores a utilizar estes compostos como reagentes anti-sentido. Eles revelaram-se, contudo, muito menos eficazes, enquanto inibidores de tradução que os seus homólogos  $\beta$ .

Uma explicação simples para esta observação seria o fato de os híbridos formados com o RNA não serem substratos da RNase H, enquanto que os formados com os homólogos  $\beta$  são substratos que são rapidamente degradados por esta enzima. Esta interpretação não é, contudo, inteiramente satisfatória, pois como já vimos, os análogos metilfosfonatos possuem propriedades semelhantes e manifestam uma atividade anti-sentido eficaz.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Várias companhias farmacêuticas estudam os efeitos da estrutura dos oligonucleotídeos anti-sentido na estabilidade, afinidade, permeabilidade e compartimentação celulares e tentam melhorar o seu perfil farmacocinético. Uma complicação que tem sido freqüentemente encontrada resulta de um efeito biológico nem sempre específico, isto é, baseado num puro efeito anti-sentido. No entanto, a especificidade e a aplicação dos oligonucleotídeos anti-sentido, nomeadamente dos análogos fosforotioatos, têm sido validadas em vários modelos animais, visando controlar doenças provocadas por genes endógenos ou exógenos. Ensaio clínico humano estão atualmente em curso, com a finalidade de estabelecer a sua eficácia e o seu caráter inócuo.

Os sucessos descritos em numerosos trabalhos e nomeadamente *in vivo*, abrem na realidade perspectivas encorajadoras e estimuladoras de novos desenvolvimentos. Os progressos a realizar situam-se nos domínios da síntese, visando diminuir os custos irrealistas para uma aplicação em massa, no aumento da eficácia dos oligonucleotídeos anti-sentido a atravessarem as membranas e a serem pilotados especificamente no interior das células e compartimentos onde se aloja o alvo. Se estas condições forem realizadas, estaremos provavelmente perto de dominar um novo tipo de agentes terapêuticos com potencialidades praticamente ilimitadas.

## REFERÊNCIAS

- Blake, K. R.; Murakami, A.; Miller, P. S; *Biochemistry*. **1985**, *24*, 6132.
- Walder, R. Y.; Walder, J. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 5011.
- Sarin, P. S.; Agrawal, S.; Civeira, M. P.; Goodchild, J.; Ikeuchi, T.; Zamecnik, P. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 7448.
- Löschner, T.; Engels, J. W.; *Nucleosides Nucleotides*. **1988**, *7*, 729.
- Agrawal, S.; Ikeuchi T.; Sun, D.; Sarin, P. S.; Konopka, A.; Maizel, J., Zamecnik, P. C; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 7790.
- (a) Rao, M. V.; Reese, C. B.; Zhengyun, Z.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4839. (b) Kamer, P. C. J.; Roelen, H. C. P. F.; van den Elst, H.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6757.
- (a) Nielson, J.; Brill, W. K.-D.; Caruthers, M. H.; *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2911. (b) Brill, W. K. -D.; Nielson J.; Caruthers, M. H.; *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5517. (c) Brill, W. K. -D.; Tang, J. -Y.; Ma, Y.-X.; Caruthers, M. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2321.
- Lemaitre, M.; Bayard, B; Lebleu, B; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 648.
- Degols, G.; Leonetti, J.-P.; Mechti, N.; Lebleu, B.; *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 945.
- Haralambidis, J.; Ducan, L.; Tregear, G. W.; *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5199.
- (a) Asseline, U.; Thuong, N. T.; Hélène C.; *C. R. Acad. Sc. Paris*. **1983** t. 297, Série III, 369. (b) Asseline, U.; Delaure, M., Lancelot, G.; Toulmé, F.; Thuong, N. T.; Montenay-Garestier, T; Hélène, C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 3297. (c) Boidot-Forget, M.; Chassignol, M.; Takasugi, M.; Thuong, N. T.; Hélène, C.; *Gene*. **1988**, *72*, 361.
- Asseline, U.; Toulmé, F., Thuong, N.T.; Delarue, M.; Montenay-Garestier, T.; Hélène, C.; *The EMBO Journal* **1984**, *3*, 795.
- Verspieren, P.; Cornelissen, A. W. C. A.; Thuong, N. T.; Hélène, C.; Toulmé, J. J.; *Gene* **1987**, *61*, 307.
- Belikova, A. M.; Zarytova, V. F.; Grineva, N. I.; *Tetrahedron Lett.* **1967**, *37*, 3557.

15. (a) Knorre, D. G.; Vlassov, V. V.; Zarytova, V. F.; Karpova, G.G.; *Adv. Enzyme Regul.* **1985**, *24*, 277. (b) Abramova, T. V.; Vlassov, V. V.; Lebedev, A. V.; Ryte, A. S.; *FEBS Lett.* **1988**, *236*, 243. (c) Vlassov, V. V., Gaidamakov, S. A.; Zarytova, V. F.; Knorre, D. G.; Levina, A. S.; Nikonova, A. A.; Podust, L. M.; Federova, O. S.; *Gene* **1988**, *72*, 313. (d) Vlassov, V. V.; Zarytova, V. F.; Kutiavin, I. V.; Mamaev, S. V.; Podyminogin, M. A.; *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 4065.
16. Vlassov, V. V.; Godovikov, A. A.; Kobetz, N. D.; Ryte, A. S.; Yurchenko, L. V.; Bukrinskaya, A. G.; *Adv Enzym. Regul.* **1985**, *24*, 301.
17. (a) Knorre, D. G.; Vlassov, V. V.; Zarytova, V. F.; *Biochimie* **1985**, *67*, 785. (b) Vlassov, V. V.; Gorn, V. V.; I. V.; Kutyavin, Yurchenko, L.V.; Sharova, N. K.; Bukrinskaya, A. G.; *Mol, genetika, mikrobiologiya and virusologiya* **1984**, *11*, 36.
18. (a) Webb, T. R.; Matteuci, M. D.; *J. Am.Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2764. (b) Webb, T.R.; Matteuci, M. D.; *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 7661.
19. Kido, K.; Inoue, H.; Ohtsuka. E.; *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 1339.
20. Boutorin, A. S.; Vlassov, V. V.; Kazakov, S. A.; Kutiavin, I. V.; Podyminoin, M. A.; *FEBS Lett.* **1984**, *172*, 43.
21. Chu, B. C. F.; Orgel, L. E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 963.
22. Dreyer, G. B.; Dervan, P. B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 968.
23. Boidot-Forget, M.; Chassignol, M.; Takasugi, M.; Thuong, N. T.; Hélène, C.; *Gene* **1988**, *72*, 361.
24. Povsic, T. J.; Dervan, P. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3059.
25. Shea, R. G.; Marsters, J. C.; Bischofberger, N.; *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3777.
26. Kuyl-Yeheshiely, E. M; Dreef-Tromp, C.; Geluk, A.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 2897.
27. Goodchild, J.; Letsinger, R. L.; Sarin, P. S.; Zamecnick, M.; Zamecnick, P. C.; In *Human Retroviruses, Cancer and AIDS, Approaches to Prevention and Therapy*; Alan, R. L., Ed.; New York, 1988; p 423.
28. (a) Letsinger, R. L.; Zhang, G.; Sun, D. K.; Ikeuchi, T.; Sarin, P. S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 6553. (b) Stein, C. A.; Pal, R.; DeVico, A. L.; Hoke, G.; Mumbauer, S.; Kinstler, O.; Sarngadharan, M. G.; Letsinger, R. L.; *Biochemistry* **1991**, *30*, 2439.
29. Meeting on "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression: Therapeutic Implications". June, 18-21, 1989, Rockville, MD.
30. (a) Morvan, F.; Rayner, B.; Imbach, J-L.; Chang, D-K; Lown, J. W.; *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 5019. (b) Morvan, F.; Rayner, B.; Leonetti, J-P.; Imbach, J-L.; *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 833.
31. Morvan, F.; Rayner, B.; Imbach, J-L.; Chang, D-K.; Lown, J. W.; *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 4241.
32. Gagnor, C.; Bertrand, J-R.; Thenet, S.; Lemaître, M.; Morvan, F.; Rayner, B.; Malvy, C.; Lebleu, B.; Imbach, J-L.; Paoletti, C.; *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 10419.