

# Синтез флуоресцентно міченого кон'югата олігонуклеотиду з транспортним пептидом на модифікованому носії «Силохром-2»

І. Я. Дубей

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

dubey@imbg.org.ua

---

*Описано синтез потрійного кон'югата олігонуклеотиду з транспортним пептидом та флуорофором. Твердофазним методом на флуоресцеїн-модифікованому полімерному носії «Силохром-2» отримано мічений 5'-аміноалкіл-3'-флуоресцеїном 18-членний олігонуклеотид, комплементарний ділянці гена -галактозидази *Escherichia coli*. Внаслідок його обробки йодоцтовим ангідридом одержано 5'-йодацетамідну похідну, яка, в свою чергу, специфічно реагувала з 10-членним цистеїн-вмісним пептидом – фрагментом транспортного домену великого Т-антигену вірусу SV40 – з утворенням цільового гібриду з високим виходом.*

*Ключові слова: олігонуклеотидні кон'югати, транспортні пептиди, флуоресцеїн.*

---

**Вступ.** Ускладнений транспорт олігонуклеотидів через біологічні мембрани суттєво обмежує їхнє терапевтичне застосування. Один із шляхів значного покращення клітинного транспорту олігонуклеотидів полягає у їхній кон'югації з транспортними пептидами. Відомо, що деякі пептиди завдяки специфічним механізмам транспорту здатні ефективно проникати через мембрану. До них належать високоосновні пептидні послідовності, які входять у транспортні домени низки білків (Тат вірусу HIV-1, пенетратин та ін.), гідрофобні сигнальні пептиди, а також послідовності ядерної локалізації (nuclear localization sequences, NLS) [1, 2].

Існує декілька методів синтезу гібридів пептид–олігонуклеотид, серед яких постсинтетична кон'югація фрагментів, тотальний твердофазний синтез та нативне лігування [2]. Приєднання звичайно проводять через кінцеві положення олігонук-

леотидів та пептидів, хоча можлива і кон'югація по внутрішніх положеннях біополімерів. Незважаючи на складність структур і лабільність цих біополімерів, методи синтезу їхніх кон'югатів на сьогодні вже досить розвинуті. Проте вимоги щодо структури гібридів, які б забезпечували їхнє ефективне проникнення у клітину, та кореляція структури з біологічною активністю поки що вивчені недостатньо.

Для дослідження транспорту кон'югатів олігонуклеотид–пептид та розподілу їх у клітині дуже важливою є легкість їхньої детекції. Флуоресцентно мічені кон'югати зручно вивчати за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Ми синтезували олігонуклеотид, до 3'-кінця якого приєднано флуоресцентну групу, а до 5'-кінця – транспортний пептид. Для кон'югації обрано фрагмент транспортного домену великого Т-антигену вірусу SV40 [2] та олігонуклеотид, комплементарний ділянці гена -галактозидази *Escherichia coli* [3]. Пептид вводили в

мічений флуоресцеїном олігонуклеотид постсинте-тично.

**Матеріали і методи.** В роботі використано 1,6-гексаметилендіамін, йодоцтовий ангідрид, 1,1'-карбонілдіімідазол («Aldrich», США), 4-(2-гідроксиетил)піперазин-1-етансульфокислоту (HEPES) та реагенти для електрофорезу фірми «Sigma» (США). Олігонуклеотиди синтезували фосфітамідним методом на синтезаторі Applied Biosystems 381A, використовуючи реагенти цієї ж фірми. Електроспрей-мас-спектри (ES-MS) отримували на приладі Waters/Micromass ZQ HPLC-MS system. Високоєфективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) проводили на хроматографі Hewlett-Packard 1090 на колонці Hypersil BDS C18 (3 мкм, 4,6 × 50 мм) у градієнті концентрації ацетонітрилу (0–40 %) в 0,1 М триетиламоніацетатному буфері (рН 7,5).

*Аміноалкіл-модифікований олігонуклеотид 1, мічений флуоресцеїном.* Послідовність 5'-GTTGTA-AAACGACGGGAT-3', мічену флуоресцеїном на 3'-кінці, синтезували на модифікованому барвником полімері «Силохром-2» та вводили аміногексильну групу в 5'-положення, як описано в роботі [4]. Частина продукту не амінували, отримавши олігомер із вільною 5'-ОН-групою для контролю. Полімер витримували в конц. водному аміаку протягом 2 діб при кімнатній температурі. Після гель-фільтрації на колонці PD-10 («Pharmacia», Швеція) олігонуклеотид **1** виділяли електрофорезом у 20 %-му поліакриламідному гелі. UV-Vis (рН 7,5):  $A_{494}/A_{260} = 0,36$ .

*Йодацетамідна похідна міченого олігонуклеотиду 2.* До 4,2  $A_{260}$  (20 нмоль) аміноалкілолігонуклеотиду **1** в 100 мкл 0,1 М буфера HEPES (рН 8) додавали розчин 0,7 мг (2 мкмоль, 100 екв.) йодоцтового ангідриду в 25 мкл диметилформаміду. Через 2 год до реакційної суміші додавали 10 мкл 3 М ацетату натрію (рН 5,3) та 400 мкл метанолу і витримували суміш упродовж 2 год при  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , осад центрифугували та промивали метанолом (2 × 200 мкл). Вихід йодацетильної похідної **2** (чистота, за даними ВЕРХ, становить близько 90 %) складає 3,6  $A_{260}$ .

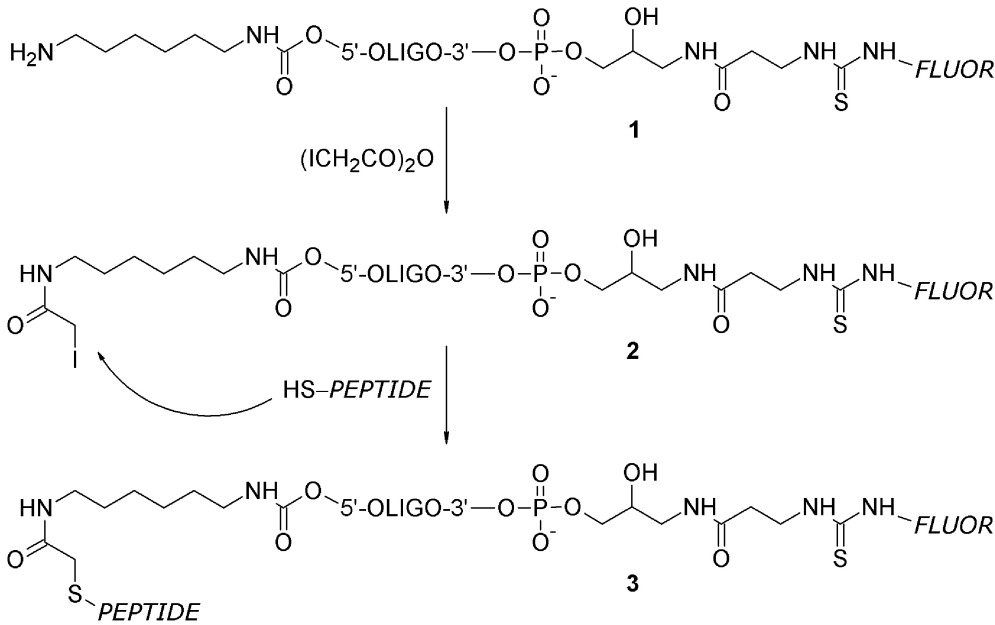
*Реакція кон'югації модифікованого олігонуклеотиду з пептидом.* Пептид Cys-Thr-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-CONH<sub>2</sub> люб'язно надано д-ром О. Мазаргілем (Франція): C<sub>52</sub>H<sub>98</sub>N<sub>18</sub>O<sub>11</sub>S, M =

= 1183,53. ES-MS:  $m/z$  1184,0 [M + H<sup>+</sup>], 592,5 [(M + 2H<sup>+</sup>)/2], 395,4 [(M + 3H<sup>+</sup>)/3].

До 3,2  $A_{260}$  функціоналізованого олігомеру **2** (15 нмоль) в 100 мкл води додавали 10 екв. (0,15 мкмоль, 0,18 мг) пептиду в 90 мкл 0,2 М HEPES (рН 8). Через 2 год за допомогою ВЕРХ показано практично повне перетворення вихідного йодацетаміду **2** в продукт із меншим часом утримання. Кон'югат **3** виділяли обернено-фазовою хроматографією. Відповідні фракції ліофілізували на концентраторі Speed-Vac. Вихід 1,2  $A_{260}$  (38 %). UV-Vis (рН 7,5):  $A_{494}/A_{260} = 0,39$ . Формула C<sub>266</sub>H<sub>357</sub>N<sub>97</sub>O<sub>127</sub>P<sub>18</sub>S<sub>2</sub>, M = 7566,98 (всі фосфати протоновані). ES-MS:  $m/z$  1890,4 [(M – 4H<sup>+</sup>)/4], 1512,0 [(M – 5H<sup>+</sup>)/5], 1259,9 [(M – 6H<sup>+</sup>)/6], 1079,8 [(M – 7H<sup>+</sup>)/7]. Знайдено: M = 7565,5.

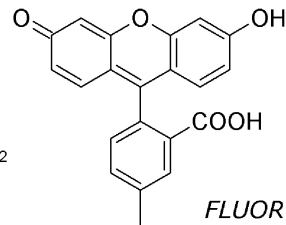
**Результати і обговорення.** Приєднання транспортного пептиду до олігонуклеотиду дозволяє підвищити рівень проникнення останнього в клітину та його антисенсову ефективність. Флуоресцентне мічення таких кон'югатів дало б змогу вивчати процеси їхнього транспорту за допомогою флуоресцентної мікроскопії. В даній роботі отримано потрійний гібрид пептид–олігонуклеотид–флуорофор. Відомості щодо синтезу таких складних біокон'югатів у літературі дуже обмежені. Як правило, флуорофор вводять у кон'югат олігонуклеотид–пептид [5, 6]. У цьому повідомленні проведено приєднання пептиду до кон'югата олігонуклеотид–флуорофор.

В експериментах використано послідовність 5'-GTTGTA-AAACGACGGGAT-3', комплементарну кодуючій ділянці 394–411 гена -галактозидази *E. coli* [3]. Антисенсову активність такого олігонуклеотиду можна контролювати за рівнем інгібування ферменту. Як транспортний використали 10-членний пептид Cys-Thr-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-CONH<sub>2</sub> [7]. Це фрагмент транспортного домену великого Т-антигену вірусу SV40, в N-кінець якого введено три додаткові амінокислоти, в тому числі цистеїн, через який зручно приєднувати олігонуклеотиди. Модифікації цього пептиду часто застосовують для кон'югації з іншими біомолекулами для покращення їхнього транспорту в клітину [1, 2, 8, 9]. На С-кінці пептид містить замість вільної карбоксильної групи амідну, що дозволяє зберегти



OLIGO: 5' GTTGTA AACGACGGGAT 3'

PEPTIDE: Cys-Thr-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-CONH<sub>2</sub>



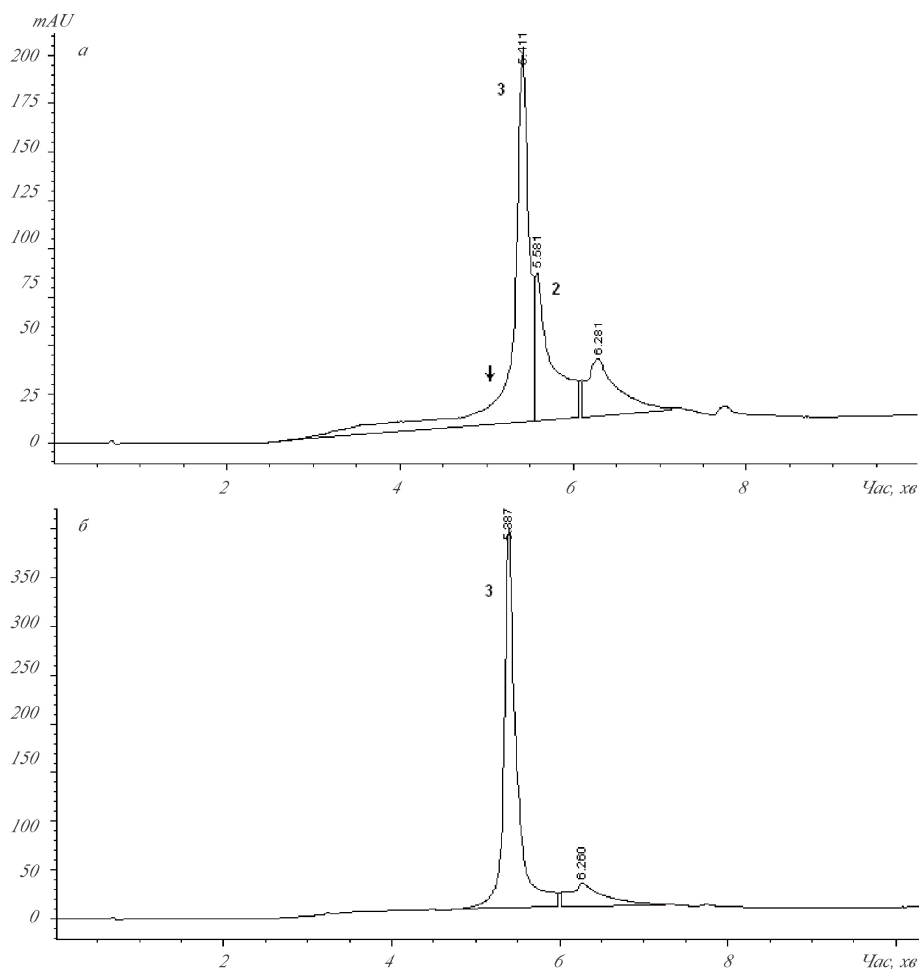
Синтез кон'югата пептид-олігонуклеотид-флуоресцеїн

конформацію нативного білка, уникнувши можливої внутрішньомолекулярної взаємодії COOH-групи з основними амінокислотами пептиду [7, 8].

Для мічення гібриду обрано флуоресцеїн, який залишається одним із найчутливіших флуоресцентних зондів. Отримали олігонуклеотид, що містить залишок барвника на 3'-кінці, пептид же приєднували до 5'-кінця (схема). Репортерну групу вводили в олігонуклеотид прямим твердофазним синтезом на флуоресцеїн-модифікованому носії «Силохром-2», після чого 5'-кінець олігомеру функціоналізували аміноалкільною групою карбонілдіімідазольним методом для забезпечення кон'югації з другим лігандом [4]. Олігонуклеотид, що містив барвник на 3'-кінці та аміногексильну групу, приєднану до 5'-кінця, деблокували амонілізом за кімнатної температури. Раніше показано [3], що при амонілізі в стандартних умовах (протягом ночі за температури 55 °C) фрагмент лінкера -NH-CS-NH- трансформується в гуанідинову структуру -NH-C(NH)-NH-, яка на наступному етапі могла би вступати в побічну реакцію ацилювання. Продукт 1 очищали

гель-електрофорезом. Мічений олігомер легко детектується в гелі за інтенсивною жовто-зеленою флуоресценцією.

Для постсинтетичної кон'югації найчастіше використовують тіол-модифіковані олігонуклеотиди, які реагують з пептидами, що містять тіол-специфічні групи (наприклад, малеїмідні), або ж через залишок цистеїну з утворенням S-S-зв'язку [2, 5, 6, 8, 9]. У цій роботі застосовано метод утворення тіоефірного зв'язку через залишок цистеїну, що базується на високоспецифічній реакції тіолів з йодацетамідами [7]. Йодацетильну групу селективно вводили в аміноалкілолігонуклеотид обробкою надлишком йодоцтового ангідриду у водно-органічному буфері (pH 8). За даними ВЕРХ, практично повна трансформація вихідного амінолігонуклеотиду 1 в йодацетамід 2 відбувається вже за 2 год, при цьому не фіксується утворення помітної кількості побічних продуктів. Час утримання йодацетамідної похідної на колонці (5,6 хв) більший, ніж у вихідного аміноалкілолігомеру (5,1 хв). Як показали контрольні експерименти, при



Обернено-фазова ВЕРХ суміші, отриманої при кон'югації йодацетамідо-олігонуклеотиду **2** з пептидом через 1 год (*а*) та 2 год (*б*) реакції. Детекція при 260 нм. Стрілкою вказано положення на хроматограмі аміноалкілолігонуклеотиду **1**

обробці йодоцтовим ангідридом того ж олігонуклеотиду без аміноалкільної групи через 2 та 4 год не утворюються нові продукти, тобто ацилювання за м'яких умов проходить селективно по аліфатичній  $\text{NH}_2$ -групі, а реакції по аміногрупах основ не спостерігаються. Продукт **2** відділяли від надлишку реагенту переосадженням метанолом та використовували для приєднання до пептиду без додаткового очищення.

Кон'югацію олігонуклеотиду з пептидом (10 екв.) проводили у слабкоосновному водному буфері (0,1 М HEPES, pH 8). Реакція утворення гібриду **3** проходила швидко (2 год) та чисто. Час утримання на обернено-фазовій колонці продукту кон'югації олігонуклеотиду з гідрофільним пептидом (5,4 хв) менший, ніж у вихідного йодацетаміду **2**, проте більший, ніж у аміноалкілолігомеру **1** (рисунк). За тих же умов пептид протягом 4 год не реагував з олігонуклеотидом **1** чи його аналогом з

вільним 5'-гідроксилком. Отже, реакція SH-групи цистеїну з йодацетамідною функцією олігонуклеотидної похідної високоспецифічна і спричинює утворення продукту кон'югації з хорошим виходом і практично без побічних реакцій. Кон'югат пептид-олігонуклеотид-флуорофор виділяли з реакційної суміші за допомогою ВЕРХ. Вихід очищеного гібриду становив 38 %.

Структуру кон'югата **3** з високою точністю підтверджено методом електроспрей-мас-спектроскопії. В його спектрі поглинання присутні смуги олігонуклеотиду (260 нм) та флуоресцеїну (494 нм), причому співвідношення інтенсивностей поглинання у видимій та ультрафіолетовій області добре узгоджується з теоретично розрахованим за коефіцієнтами екстинкції компонентів гібриду. Для даної нуклеотидної послідовності  $\epsilon_{260} = 1,85 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [10], а у флуоресцеїну відповідні коефіцієнти становлять  $2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  і  $7,3 \cdot 10^4$  для 260

і 494 нм [4]. Звідси обчислене для кон'югату співвідношення  $A_{494}/A_{260} = 0,35$ , що близько до експериментального значення 0,39. Пептидна частина гібриду не поглинає при 260 нм.

У подальших дослідженнях буде вивчено біологічну активність синтезованого потрійного кон'югата, в тому числі транспорт флуоресцентно міченого гібриду в клітину та вплив приєднаного пептиду на антисенсові властивості олігонуклеотиду.

Отже, у даній роботі отримано трикомпонентний біокон'югат, який складається з транспортно-го пептиду, олігонуклеотиду і флуорофора. Підтверджено високу ефективність розробленого носія для твердофазного синтезу на основі силікагелю «Силохром-2», що дозволяє отримувати кон'югати олігонуклеотидів з двома різними лігандами.

Автор висловлює подяку д-ру О. Мазаргілю (Dr. Honore Mazarguil, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS, Toulouse, France) за наданий зразок пептиду та д-ру Ж. Пратвіль (Dr. Genevieve Pratviel, Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS, Toulouse, France) – за участь в обговоренні результатів.

*I. Ya. Dubey*

Synthesis of fluorescently labeled oligonucleotide conjugate with transport peptide on modified Silochrom-2 support

Summary

*Synthesis of triple conjugate of oligonucleotide with transport peptide and fluorophore is described. 5'-aminoalkyl-modified 3'-fluorescein-labeled 18-mer oligonucleotide, complementary to the region of E. coli -galactosidase gene was prepared by solid phase synthesis on fluorescein-modified support Silochrom-2. Its treatment with iodoacetic anhydride led to the formation of iodoacetamide derivative. The latter reacted specifically with cysteine-containing 10-mer peptide, a fragment of the transport domain of large T-antigen of SV40 virus, to provide high yield of target hybrid.*

*Keywords: oligonucleotide conjugates, transport peptides, fluorescein.*

*И. Я. Дубей*

Синтез флуоресцентно меченого кон'югата олігонуклеотида з транспортним пептидом на модифікованому носітелі «Силохром-2»

Резюме

*Описан синтез тройного конъюгата олигонуклеотида с транспортным пептидом и флуорофором. Твердофазным методом на флуоресцеин-модифицированном полимерном носителе*

*«Силохром-2» получен меченый 5'-аминоалкил-3'-флуоресцеином 18-звенный олигонуклеотид, комплементарный участку гена -галактозидазы Escherichia coli. Его обработка йодоацетическим ангидридом привела к образованию 5'-йодацетамидного производного, которое, в свою очередь, специфически реагировало с 10-звенным цистеин-содержащим пептидом – фрагментом транспортного домена большого Т-антигена вируса SV40 – с образованием целевого гибрида с высоким выходом.*

*Ключевые слова: олигонуклеотидные конъюгаты, транспортные пептиды, флуоресцеин.*

## ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fischer P. M., Krausz E., Lane D. P. Cellular delivery of impermeable effector molecules in the form of conjugates with peptides capable of mediating membrane translocation // Bioconjugate Chem.–2001.–12, N 6.–P. 825–841.
2. Pierce T. L., White A. R., Tregear G. W., Sexton P. M. Peptide-oligonucleotide hybrids in antisense therapy // Mini-Rev. Med. Chem.–2005.–5, N 1.–P. 41–55.
3. Dubey I., Pratviel G., Meunier B. Modification of the thiourea linkage of fluorescein-oligonucleotide conjugate to a guanidinium motif during ammonia deprotection // Bioconjugate Chem.–1998.–9, N 5.–P. 627–632.
4. Дубей І. Я., Дубей Л. В., Федоряк Д. М. Синтез 3'- та 3',5'-модифікованих олігонуклеотидів на функціоналізованому силікагелі «Силохром-2» // Біополімери і клітина.–2007.–23, № 2.–С. 137–142.
5. Bongartz J.-P., Aubertin A.-M., Miohaud P. J., Lebleu B. Improved biological activity of antisense oligonucleotides conjugated to a fusogenic peptide // Nucl. Acids Res.–1994.–22, N 22.–P. 4681–4688.
6. Turner J. J., Arzumanov A. A., Gait M. J. Synthesis, cellular uptake and HIV-1 Tat-dependent trans-activation of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell-penetrating peptides // Nucl. Acids Res.–2005.–33, N 1.–P. 27–42.
7. Reed M. W., Fraga D., Schwartz D. E., Scholler J., Hinrichsen R. D. Synthesis and evaluation of nuclear targeting peptide-antisense oligonucleotide conjugates // Bioconjugate Chem.–1995.–6, N 1.–P. 101–108.
8. Eritja R., Pons A., Escarceller M., Giralt E., Albericio F. Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence // Tetrahedron.–1991.–47, N 24.–P. 4113–4120.
9. de la Torre B. G., Albericio F., Saison-Behmoaras E., Bachi A., Eritja R. Synthesis and binding properties of oligonucleotides carrying Nuclear Localization Sequences // Bioconjugate Chem.–1999.–10, N 6.–P. 1005–1012.
10. Handbook of biochemistry and molecular biology / Ed. G. Fasman.–Boca Raton: CRC press, 1975.–Vol. 1.–P. 175.

УДК 577.113.6:542.95  
Надійшла до редакції 01.03.08