

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-249

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОКОНЬЮГАТА МИРНК — ПЕПТИД С ВЫСОКИМ ВЫХОДОМ****METHOD FOR OBTAINING A SIRNA-PEPTIDE BIOCONJUGATE WITH A HIGH YIELD**

О. А. Герасимов, О. Ю. Домашева, Л. Г. Бушина, И. Б. Козлов

*Центр стратегического планирования  
и управления медико-биологическими рисками здоровью ФМБА России, Москва*

O. A. Gerasimov, O. Y. Domasheva, L. G. Bushina, I. B. Kozlov

*Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, FMBA of Russia, Moscow*

✉ IKozlov@cspfmba.ru

**Аннотация**

Процессы биоконъюгации позволяют получить соединения с биологической активностью и структурными фрагментами, обеспечивающими адресную доставку. Подход открывает перспективы их применения как компонентов генной терапии. Разработан метод получения биоконъюгата миРНК с пептидом, который позволяет учесть влияние конкурирующих реакций, снижающих выход продукта.

**Abstract**

Bioconjugation allows the production of compounds with biological activity and structural fragments that provide targeted delivery. This approach opens up the possibility of using them as components in gene therapy. A method has been developed for producing a bioconjugate of miRNA with a peptide, which takes into account the influence of competing reactions that reduce the yield of the product.

Подходы биоконъюгации включают современные методы, направленные на получение химерных молекул, сочетающих свойства нуклеиновых кислот и пептидов. Подобные соединения являются перспективными для применения в качестве терапевтических лекарственных средств, например для подавления экспрессии генов посредством механизма РНК-интерференции.

Набор методов, позволяющих создать ковалентную связь между двумя компонентами разной природы, широко используется для получения средств таргетной доставки миРНК или других генотерапевтических олигонуклеотидов с помощью пептидов к рецепторам целевых клеток.

Для получения биоконъюгатов миРНК с пептидами широко применяются линкерные молекулы, которые с высокой селективностью образуют ковалентные связи как с функциональными группами пептидной цепи, так и с миРНК. Благодаря контролируемой длине линкеры позволяют задать расстояние между двумя молекулами. Наиболее распространенные линкеры представлены активированными эфирами (например, NHS-эфиры), которые используют для соединения с первичными аминами ( $\text{NH}_2$ -), а также малеимидами или алкилгалогенидами, применяемыми для проведения специфичной реакции с тиольными (SH)-группами цистеина.

Например, цистеин обеспечивает сайт-направленное введение линкера, что делает функциональную (SH)-группу удобной с точки зрения селективности присоединения миРНК. В то же время в случае отсутствия цистеина в структуре пептида присоединение линкера обеспечивается по  $\alpha$ - $\text{NH}_2$ -группе или  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$ -группе в боковой цепи лизина, однако их реакционная способность зависит от pH. Так, при  $\text{pH} < 7$  они находятся в протонированном состоянии и менее активны, тогда как при  $\text{pH} > 7$  селективно взаимодействуют с функциональными центрами линкерной молекулы.

Однако ключевой проблемой при получении биоконъюгатов РНК с другими молекулами, в частности с пептидами, является низкая эффективность конъюгации, обусловленная стерическими препятствиями и конкурирующими побочными реакциями. Мы разработали воспроизводимый метод, обеспечивающий высокую эффективность присоединения пептида к 5'- $\text{NH}_2$ -группе РНК-олигонуклеотида через тиольную группу цистеина.

Синтез РНК-олигонуклеотидов проводили амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе Polygen (Polygen GmbH, Германия). В процессе синтеза смысловых РНК-последовательностей на финальной стадии присоединяли TFA-амиолинкер С6 фосфорамидит (Lutiprobe, Россия). Олигонуклеотиды очищали методом обращенно-фазовой хроматографии. Структуру полученных РНК-олигонуклеотидов подтверждали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ/МС) на соответствие расчетным массам. К 5'- $\text{NH}_2$ -группе РНК-олигонуклеотида присоединяли 3-малеимидпропионо-

вой кислоты NHS-эфир (*Lumiprobe, Россия*), содержащий N-гидроксисукцинимидную функциональную группу. Реакционную смесь очищали на Zetadex CentriPure N2 (*EmpBiotech, Германия*) с целью отделения олигонуклеотида от непрореагировавшего линкера. Присоединение пептида к модифицированному олигонуклеотиду осуществляли через взаимодействие малеимидной функциональной группы с SH-группой цистеина. Полученный биоконъюгат очищали методом гель-фильтрационной (ГФ) хроматографии и подтверждали структуру с помощью ВЭЖХ/МС. На финальном этапе конъюгат РНК-олигонуклеотид-пептид дуплексировали с антисмысловой последовательностью РНК. Готовый биоконъюгат миРНК-пептид очищали с помощью ГФ ВЭЖХ и подтверждали структуру с помощью ВЭЖХ/МС.

Разработанный метод получения биоконъюгата миРНК с пептидом позволяет устранить ограничения, связанные с низкой эффективностью или возникновением конкурирующих реакций. Подбор условий присоединения линкера обеспечил высокий выход целевого продукта (85 %). Применение предложенного метода в будущем позволит сократить время и себестоимость получения биоконъюгатов олигонуклеотидов с различными пептидами.