

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 олиго-нуклеотидов 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 (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 $\varepsilon\text{-NH}_2$ -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'- 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-аминолинкер C6 фосфорамидит (*Lumiprobe, 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'- 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 биоконьюгат очищали методом гель-фильтрационной (ГФ) хроматографии и подтверждали структуру с помощью ВЭЖХ/МС. На финальном этапе коньюгат РНК-олигонуклеотид-пептид дуплексировали с антисмысловой последовательностью РНК. Готовый биоконьюгат миРНК-пептид очищали с помощью ГФ ВЭЖХ и подтверждали структуру с помощью ВЭЖХ/МС.

Разработанный метод получения биоконьюгата миРНК с пептидом позволяет устраниить 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 биоконьюгатов олигонуклеотидов с различными пептидами.