



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# **Peptidi-oligonukleotidikonjugaattien synteesi ja sovellukset**

Kimi Keskitalo

Bio-organisen kemian tutkimusryhmä  
LuK-tutkielma  
Laajuus: 6 op

25.4.2025  
Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu  
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Kemia

**Tekijä:** Kimi Keskitalo

**Otsikko:** Peptidi-oligonukleotidikonjugaattien synteesi ja sovellukset

**Ohjaaja:** Heidi Korhonen

**Sivumäärä:** 18 sivua + liitteet 2 sivua

**Päivämäärä:** 25.4.2025

---

Oligonukleotideilla on tutkittu olevan lupaavia terapeuttisia ominaisuuksia geneettisten ja epigeneettisten sairauksien hoidossa. Niiden käyttöä rajoittaa kuitenkin heikko kudoksiin kulkeutuminen ja soluunotto, jotka johtuvat suuresta molekyylikoosta ja mahdollisista varauksista. Tämän ongelman ratkaisemiseksi on kehitetty useita kuljettajamolekyylejä, kuten lipidejä, peptidejä, polymeerejä ja epäorgaanisia nanopartikkeleja.

Solukalvon läpäisevät peptidit (CPP) ovat osoittautuneet erityisen lupaaviksi oligonukleotidien kuljettajina, sillä niillä on todettu olevan hyviä ominaisuuksia soluun sisäännoton ja kudoksiin kuljettamisen kannalta. Solukalvon läpäisevät peptidit voidaan liittää oligonukleotideihin joko eikovalenttisesti tai kovalenttisilla sidoksilla eli ns. linkkereillä, jolloin muodostuu peptidi-oligonukleotidikonjugaatteja (POC). Kyseisiä konjugaatteja voidaan syntetisoida monilla eri menetelmillä, jotka perustuvat joko post-synteettiseen konjugointiin tai vaiheittaiseen kiintokantajasynteettiin. Synteesimenetelmän valinta riippuu halutusta lopputuotteesta ja sen ominaisuuksista, jonka takia se pitää valita tapauskohtaisesti.

Peptidi-oligonukleotidikonjugaatteja on tutkittu lääketieteellisissä sovelluksissa, joissa lupaavia tuloksia on saatu antibakteerisissa ja viruksia ehkäisevissä lääkkeissä, syöpähoidoissa sekä geeniterapiassa sairauksien, kuten Duchennen lihasdystrofian ja spinaalisen lihasatrofian, hoidossa. Tulevaisuudessa peptidi-oligonukleotidikonjugaatit voivat mahdollistaa yksilöllisempiä ja tarkemmin kohdennettuja hoitoja. Tällä hetkellä tutkimus keskittyy uusien, tehokkaampien ja helpompien synteesimenetelmien kehittämiseen sekä konjugaatteihin liittyvien biologisten haasteiden, kuten endosomaalisen vapautumisen ja kohdentumisen, parantamiseen.

---

**Avainsanat:** solukalvon läpäisevät peptidit, peptidi-oligonukleotidikonjugaatti, post-synteettinen menetelmä, vaiheittainen kiintokantajasynteesi, linkkeri

# Sisällys

<b>1</b>	<b>Johdanto</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Oligonukleotidien terapeuttiset sovellukset</b> .....	<b>2</b>
2.1	Oligonukleotidit ja niiden analogit .....	2
2.2	Antisense-oligonukleotidit .....	3
2.3	Pienet häiritsevät RNA:t .....	4
<b>3</b>	<b>Solukalvon läpäisevät peptidit</b> .....	<b>4</b>
3.1	Luokittelu .....	4
3.2	Kuljetusmekanismit .....	5
3.3	Peptidien paikkaspesifisyys.....	6
<b>4</b>	<b>Peptidi-oligonukleotidikonjugaattien synteesi</b> .....	<b>7</b>
4.1	Post-synteettinen konjugointi .....	7
4.1.1	Amidisisidos .....	7
4.1.2	Disulfidisisidos .....	8
4.1.3	Tioetterikiinnitys .....	9
4.1.4	Atsidi-alkyyni click-reaktio.....	10
4.1.5	Karboxylireaktiot .....	11
4.1.6	Diels-Alder-reaktio .....	13
4.2	Vaiheittainen kiintokantajasynteesi .....	14
4.2.1	Kiintokantajat .....	14
4.2.2	Bi- ja trifunktionaaliset linkkerit .....	15
<b>5</b>	<b>Sovelluksia ja tulevaisuuden näkymät</b> .....	<b>17</b>
<b>6</b>	<b>Yhteenveto</b> .....	<b>17</b>
<b>7</b>	<b>Lähteet</b> .....	<b>19</b>

## Lyhenteet

RNA = Ribonukleiinihappo

FDA= Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto, engl. Food and Drug Administration

siRNA= Pieni häiritsevä RNA, engl. Small interfering RNA

RISC = RNA:n aikaansaama hiljennyskompleksi, engl. RNA-induced silencing complex

sgRNA = engl. Single-guide RNA

crRNA = engl. CRISPR RNA

POC = Peptidi-oligonukleotidikonjugaatti, engl. Peptide-oligonucleotide conjugate

HBTU = *O*-(1H-bentsotriatsoli)-*N,N,N',N'*-tetrametyyliuroniheksafluorofosfaatti

PEG-PS = Polyetyleeniglykoli polystyreeni, engl. Polyethylene glycol polystyrene

CPG = Kontrolloitu huokoinen lasi, engl. Controlled pore glass

DMTr = Dimetoksitriityyli

Fmoc = Fluorenyylimetoksikarbonyyli

DNA = Deoksiribonukleiinihappo

MPG = Monopropyleeniglykoli, engl. mono-propylene glycol

Pep-1 = Fosfoenolipyruvaatti-1, engl. phosphoenolpyruvate-1

MOE = 2'-*O*-(2-metoksietyyli)

LNA = Lukittu nukleiinihappo, engl. locked nucleic acid

HER2 = engl. human epidermal growth factor reseptor 2

SSO = Silmukointia muokkaava oligonukleotidi, engl. splice-switching-oligonucleotide

## 1 Johdanto

Oligonukleotideilla on tutkittu olevan hyviä terapeuttisia ominaisuuksia geneettisten sairauksien hoidossa. Oligonukleotidit kohtaavat kuitenkin vaikeuksia kudoksiin toimituksen ja soluunoton yhteydessä suuren koon ja mahdollisten varauksien vuoksi. Oligonukleotideja ei siis voida käyttää lääketieteellisissä sovelluksissa ilman muokkaamista. Oligonukleotideihin voidaan lisätä solun sisäänottoa edistäviä kantajamolekyylejä, kuten lipidejä, peptidejä, polymeerejä tai epäorgaanisia nanopartikkeleja.<sup>1,2</sup>

Kantajamolekyyleistä lupaavaksi on havaittu solukalvon läpäisevät peptidit (CPP), joilla on tutkittu olevan hyviä ominaisuuksia solujen sisään ottamisen ja kudoksiin toimituksen kannalta. Solun läpäisevistä peptideistä on tutkimuksen edetessä tullut korvaamaton kuljettajamolekyyliryhmä vaikeasti kuljetettavien makromolekyylien kuljettamisessa tiettyihin soluihin, solun osiin, kudoksiin sekä sisäelimiin.<sup>1</sup>

Solukalvon läpäisevät peptidit voidaan kiinnittää oligonukleotideihin ilman kovalenttista kiinnitystä tai ne voidaan kiinnittää haluttuihin oligonukleotideihin kovalenttisin sidoksin, jolloin muodostuu peptidi-oligonukleotidikonjugaatteja.<sup>1-3</sup> Kovalenttisesti kiinnitettyjä peptidi-oligonukleotidikonjugaatteja on tutkittu erilaisissa lääketieteellisissä sovelluksissa. Lupaavia tuloksia on saatu antibakteereissa, viruksia ehkäisevissä lääkkeissä, syöpähoidossa sekä geeniterapioissa geneettisten sairauksien, kuten Duchennen lihasdystrofian ja spinaalisen lihasatrofian hoidossa.<sup>4,5</sup>

Peptidi-oligonukleotidikonjugaattien syntetisointia on tutkittu paljon ja konjugaatiomenetelmiä on kehitetty lukuisia. Menetelmät voidaan jakaa post-synteettisiin menetelmiin ja vaiheittaiseen kiintokantajasynteesiin. Molemmilla menetelmillä on omat hyvät ja huonot puolensa, jonka takia synteesimenetelmä valitaan tapauskohtaisesti.<sup>1,2</sup>

Tutkielmassa perehdytään oligonukleotidien terapeuttisiin sovelluksiin ja erilaisiin toimintatapoihin, millä ne toimivat solun sisälle päästessään. Tutkielmassa käydään läpi lupaaviksi todettuja solukalvon läpäisevien peptidien rakenteita ja toimintamekanismeja. Sen jälkeen puhutaan peptidi-oligonukleotidikonjugaattien syntetisoinnista, sekä niiden terapeuttisista sovelluksista ja tulevaisuuden näkymistä.

## 2 Oligonukleotidien terapeuttiset sovellukset

Oligonukleotidien käyttäminen lääkeaineina perustuu niiden ominaisuuteen tunnistaa ja sitoutua tarkasti niiden komplementaariseen sekvenssiin. Oligonukleotideja voidaan käyttää vaikuttamaan solun erilaisiin RNA molekyyliin. Tällaisia ovat esimerkiksi esilähetti-RNA, lähetti-RNA ja ei-koodaava RNA, kuten mikro-RNA. Oligonukleotidit voivat myös toimia vaikuttamalla vierasperäisten virusten<sup>6</sup> tai bakteerien<sup>7</sup> RNA:han.<sup>1</sup>

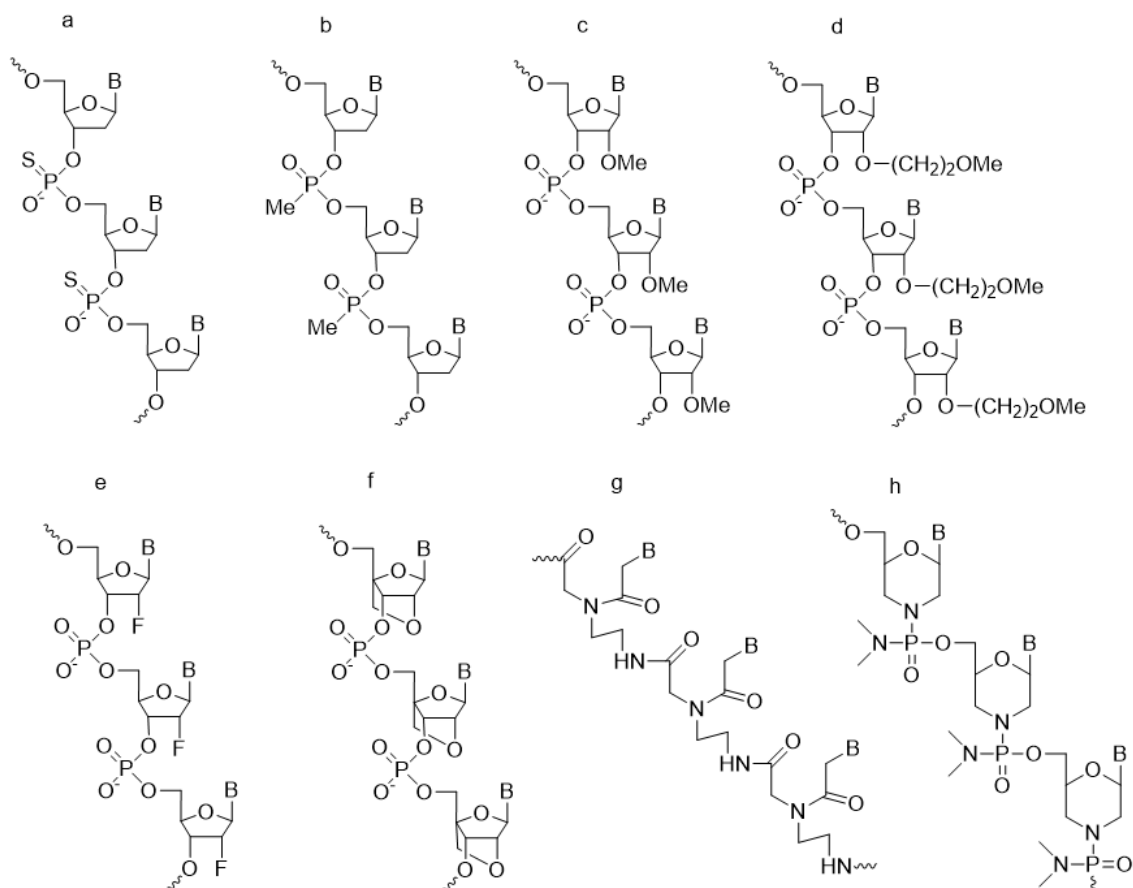
Oligonukleotideilla voidaan myös vaikuttaa genomiseen DNA:han, proteiineihin sekä pieniin molekyyliin. Tämä tarkoittaa sitä, että niillä voidaan vaikuttaa biologisiin prosesseihin. Ne voivat myös häiritä taudinaiheuttajien aineenvaihduntaa tai muokata immuunivastetta tiettyjä antigeenejä vastaan.<sup>1</sup>

Terapeuttiset oligonukleotidit voidaan jakaa useaan eri ryhmään sen perusteella, miten ne vaikuttavat. Erilaisia ryhmiä ovat esimerkiksi antisense-oligonukleotidit ja siRNA, joita käsitellään seuraavissa kappaleissa. Vaikka ryhmät eroavat toisistaan, niiden kaikkien toimintamekanismi perustuu silti komplementaaristen emäsparien muodostamiseen.<sup>1</sup>

### 2.1 Oligonukleotidit ja niiden analogit

Oligonukleotidit, joita ei olla kemiallisesti muokattu, pilkkoutuvat nopeasti nukleaasin vaikutuksesta. Tämän seurauksena terapeuttisesti aktiiviset oligonukleotidit ovat usein kemiallisesti muokattuja.<sup>1</sup>

Ensimmäisiä antisense-oligonukleotideja muokattiin fosfaattisidoksia modifioimalla. Tällaisia muokkauksia ovat esimerkiksi fosforotioaatit (Kuva 1a) tai metyylifosfaatit (Kuva 1b). Myös useita muita fosfaattiryhmän muokkauksia on tutkittu.<sup>1</sup> Oligonukleotidien sokeriosat ovat myös usein muokattuja, mikä suojaa oligonukleotidia nukleaaseilta ja parantaa näin niiden pysyvyyttä.<sup>1</sup> Esimerkiksi sokerirenkaan 2'-asemaa muokkaamalla saadaan 2'-*O*-metyyli (Kuva 1c), 2'-*O*-(2-metoksietyyli) (MOE) (Kuva 1d) tai 2'-deoksi-2'- $\alpha$ -fluoro (Kuva 1e) rakenteet. Sokerirengasta muokkaamalla voidaan myös valmistaa lukittu nukleinihappo (LNA) (Kuva 1f).<sup>1</sup>



Kuva 1. Erilaisia oligonukleotianalogeja. Mukailtu viitteestä [1]

Oligonukleotidien koko sokerifosfaattirunko voi olla myös keinotekoinen. Analogeja, joissa runkorakenne on vaihdettu ovat esimerkiksi peptidinukleiinihappoihin (PNA) (Kuva 1g) tai fosfordiamidaattimorfoliinioligomeerihin (PMO) (Kuva 1h) perustuvat rakenteet.<sup>1</sup>

## 2.2 Antisense-oligonukleotidit

Antisense-oligonukleotidit ovat vanhin ja eniten tutkittu terapeuttisten oligonukleotidien ryhmä. Kuten edellä mainittu, niiden toiminta perustuu synteettisten oligonukleotidien tai niiden analogien kykyyn sitoutua haluttuun komplementaariseen RNA:han. Antisense-oligonukleotidit voivat estää lähetti-RNA:n translaation hajottamalla sen RNase H entsyymin avulla, tai steerisesti estämällä ribosomien sitoutumisen siihen. Antisense-oligonukleotideilla on myös mahdollista muuttaa esilähetti-RNA:n silmukointia (engl. splice-switching-oligonucleotide, SSO).<sup>1</sup>

Lähiaikoina näistä vaikutustavoista silmukoinnin muokkaaminen on ollut paljon esillä Duchennen lihasdystrofian hoitamiseen tarkoitettujen lääkkeiden ansiosta. Sairauden

hoitamiseen FDA on hyväksynyt lääkekäyttöön kolme PMO-pohjaista (Kuva 1h) SSO-lääkettä v. 2016–2021.<sup>1</sup>

### 2.3 Pienet häiritsevät RNA:t

Pienet häiritsevät RNA:t (engl. small interfering RNAs) eli siRNA:t ovat tyypillisesti lyhyitä kaksijuosteisia RNA-molekyylejä, jotka hiljentävät spesifisten geenien ilmentymistä. Ne eroavat antisense -oligonukleotideista vaikutusmekanismissa, joka tässä tapauksessa perustuu RNA-interferenssiin (engl. RNA interference, RNAi). RNAi löydettiin vuonna 1998 Firen ja Mellon toimesta. Tämän löydön perusteella heidät palkittiin vuonna 2006 fysiologian ja lääketieteen Nobelin palkinnolla.<sup>1</sup>

Terapeuttiset siRNA:t koostuvat kahdesta juosteesta, joista toinen on antisense-juoste, joka sitoutuu kohde-lähetti-RNA:han. Solun sisällä siRNA liitetään RNA-säätelykompleksiin (engl. RNA-induced silencing complex, RISC). Kompleksin Argonaut proteiini Ago2 purkaa siRNA:n dupleksirakenteen, jolloin antisense-juoste ohjaa kompleksin sitoutumaan spesifiseen lähetti-RNA:han, joka hajotetaan. Tämä estää proteiinisynteesin, jolloin geenin ilmentyminen vähenee.<sup>1</sup>

## 3 Solukalvon läpäisevät peptidit

CPP:t eli solukalvon läpäisevät peptidit huomattiin lupaaviksi oligonukleotidien kuljettajiksi jo 20 vuotta sitten. Ne ovat yleensä lyhyitä tai keskipitkiä peptidiketjuja, joissa on 5–40 aminohappoa. Niiden kyvystä kuljettaa erilaisia solukalvon läpäisemättömiä molekyylejä soluun on muodostunut arvokas työkalu erilaisten makromolekyylien, kuten oligonukleotidien kuljettamisessa. CPP:t voidaan kiinnittää oligonukleotideihin ilman kemiallista kiinnitystä tai ne voidaan kiinnittää haluttuihin oligonukleotideihin kovalenttisesti, jolloin muodostuu peptidi-oligonukleotidikonjugaatteja.<sup>1</sup>

### 3.1 Luokittelu

CPP:illä ei tällä hetkellä ole vakiintunutta luokittelua. Kirjallisuudessa ne kuitenkin jaetaan usein kahteen pääryhmään, joko niiden alkuperän perusteella tai niiden fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien perusteella. Luokittelu alkuperän perusteella perustuu siihen, onko se proteiiniperäinen vai synteettisesti tai kimeerisesti, eli kahden eri organismin perimästä yhdistämällä, valmistettu. Tämä tapa luokitella solukalvon läpäiseviä proteiineja on kuitenkin epäkäytännöllinen, koska se ei kerro siitä, miten peptidit vuorovaikuttaa solukalvon kanssa.<sup>1</sup>

Parempi tapa luokitella CPP:itä on jakamalla ne niiden fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien perusteella. Tässä luokittelutavassa peptidit voidaan jakaa kationisiin, amfipaattisiin ja hydrofobisiin peptideihin.<sup>1</sup>

Kationiset CPP:t koostuvat pääasiassa positiivisesti varautuneista aminohapoista, kuten arginiinista, lysiinistä tai histidiinistä. Tämä saa aikaan polykationisen rakenteen, joka mahdollistaa tehokkaan soluun kulkeutumisen. Kationisista peptideistä kaikkein parhaiksi on havaittu arganiinirikkaat peptidit.<sup>8</sup> Niiden tehokkuus perustuu kahteen asiaan. Ensimmäinen on se, että niiden sisältämät guanidiiniryhmät omaavat korkean  $pK_a$ -arvon, jonka takia ne pysyvät fysiologisessa pH:ssa täysin protonoituneena, ja vuorovaikuttavat tällöin paremmin negatiivisesti varautuneiden solukalvon osien kanssa. Toinen on niiden kyky muodostaa vetysidoksia negatiivisesti varautuneiden karboksyyli-, sulfaatti- ja fosfaattiryhmien kanssa.<sup>1</sup>

Suurin CPP luokka on amfipaattiset peptidit.<sup>9</sup> Amfipaattiset peptidit sisältävät positiivisesti varautuneiden alueiden lisäksi myös hydrofobisia alueita, joita muodostavat esimerkiksi valiini, leusiini, isoleusiini tai alaniini.<sup>10</sup> Suurin osa näistä peptideistä ovat joko kimeerisiä tai synteettisesti valmistettuja, mutta myös luonnollisista proteiineista peräisiä amfipaattisia peptidejä tunnetaan.<sup>1</sup>

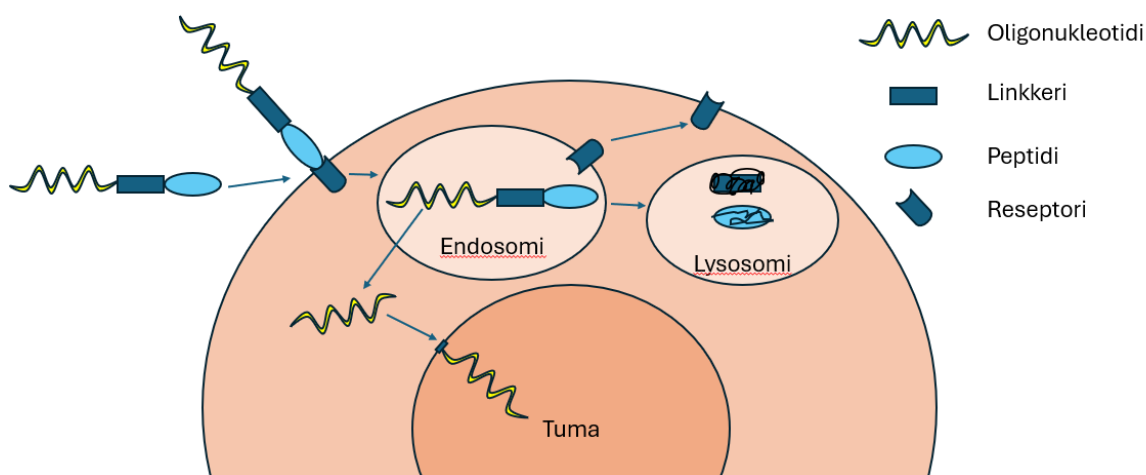
Pienin CPP luokka on hydrofobiset peptidit, jotka koostuvat poolittomista tai varauksettomista aminohapoista. Hydrofobisia CPP:itä tunnetaan vain muutamia ja niiden soluunpääsemismekanismeja ei vielä täysin ymmärretä. Soluun pääsemisen oletetaan johtuvan niiden korkeasta affiniteetista solukalvon hydrofobisten alueiden kanssa.<sup>1</sup>

### 3.2 Kuljetusmekanismit

CPP:itä tutkitaan paljon ja niille on löydetty sovelluksia esimerkiksi peptidi-oligonukleotidikonjugaateissa, joissa ne kuljettavat oligonukleotidin haluttuun kudokseen tai soluun. Tarkkaa mekanismeja ei tiedetä ja tutkimusten myötä on havaittu, että sama CPP voi hyödyntää useita eri sisäänottomekanismeja riippuen olosuhteista.<sup>1</sup>

Solun sisäänottomekanismit voidaan jakaa kahteen ryhmään, jotka ovat suora translokaatio ja endosytoosi (Kuva 2). Suoraa translokaatiota, voi tapahtua endosytoosi inhibiittorien läsnäollessa. Prosessi sisältää useita reittejä, jotka perustuvat solukalvon läpäisevän peptidin positiivisen varauksen ja solukalvon negatiivisesti varautuneiden rakenteiden vuorovaikutukseen.<sup>1</sup> Yksi näistä reiteistä toimii niin, että CPP destabilisoi solukalvon muodostaen siihen rengasmaisia huokosia.<sup>11</sup>

Endosytoosi on kuljetustavoista todennäköisempi. Siinä solu ottaa molekyyliä sisäänsä ympäröimällä ne kalvorakkuloilla eli endosomeilla. Prosessi on soluille luonnollinen ja sitä tapahtuu kaikissa solutyypeissä. Endosytoosi voi tapahtua useilla eri tavoilla, joista tärkeimmät ovat makropinosytoosi, klatriinin tai kaveoliinin välittämä endosytoosi, sekä näistä riippumaton endosytoosi.<sup>12</sup>



Kuva 2. Yksinkertaistettu kuva peptidi-oligonukleotidikonjugaatin endosytoosista. Mukailtu viitteestä [2] Peptidi-oligonukleotidikonjugaattien kohdalla on tärkeää, että oligonukleotidi vapautuu endosomista ennen, kun se kuljetetaan lysosomille, jossa se hajotettaisiin (kuva 1). Tämän takia endosomista vapautuminen on yksi peptidi-oligonukleotidikonjugaattien suurimmista haasteista.<sup>13</sup> Toimintamekanismista ei ole täyttä varmuutta, mutta peptidi-oligonukleotidikonjugaattien pois pääsemiseksi endosomista on ehdotettu, että kationiset solukalvon läpäisevät peptidit voivat vuorovaikuttaa endosomaalisen kalvon negatiivisesti varautuneiden osien kanssa, mikä mahdollistaisi konjugaatin vapautumisen.<sup>1</sup>

### 3.3 Peptidien paikkaspesifisyys

Sen lisäksi, että CPP:t omaavat hyviä ominaisuuksia makromolekyylien kuljettajina, niiden on myös huomattu toimivan paikkaspesifisinä kuljettajina etenkin syöpäsoluihin.<sup>2,14</sup> Tämä paikkaspesifisyys perustuu syöpäsolun pinnalla olevien reseptorien yliekspressioon. Etenkin sellaiset reseptorit, joita ei yleensä esiinny juuri yhtään terveissä soluissa toimivat hyvinä kohdereseptoreina.<sup>14</sup> Esimerkkejä tällaisista reseptoreista on esimerkiksi BB2,  $\alpha_v\beta_3$  ja HER2 reseptorit, joita on tutkittu mahdollisten peptidi-oligonukleotidikonjugaatteihin perustuvien syöpälääkkeiden kehittämiseksi.<sup>2</sup>

## 4 Peptidi-oligonukleotidikonjugaattien synteesi

Solunläpäisevien peptidien kiinnittäminen kuljetettavaan oligonukleotideihin on luokiteltu yleisesti kahteen tyyppiin, jotka ovat kovalenttinen ja ei-kovalenttinen kiinnitys. Ei-kovalenttinen kiinnitys saadaan usein aikaan vain sekoittamalla peptidi ja oligonukleotidi keskenään. Kiinnitys perustuu fysikaalisiin ominaisuuksiin, kuten elektrostaattisuuteen tai hydrofobisuuteen.<sup>1</sup> Solunläpäisevät peptidit ovat ei-kovalenttisessa kiinnityksessä usein primäärisiä tai sekundäärisiä amfipaattisia peptidejä, joissa on hydrofobinen sekä hydrofiilinen osa. Tällaisia ovat esimerkiksi MPG ja Pep-1.<sup>15</sup> Nämä solunläpäisevät peptidit muodostavat nanohiukkasmaisia komplekseja, joka pystyvät läpäisemään solukalvon tehokkaasti endosytoosin avulla (Kuva 1).<sup>16</sup> Nanokompleksit myös suojaavat oligonukleotidia nukleasihydrolyysiltä.<sup>17</sup> Ei-kovalenttisen kiinnityksen ongelmana on kuitenkin se, että nanokompleksien koot vaihtelevat toisistaan, mikä vaikeuttaa lääkeaineen annostelua *in vivo* -olosuhteissa.<sup>1</sup>

Peptidi-oligonukleotidikonjugaatteja (POC), jotka ovat kovalenttisesti kiinnitettyjä, on valmistettu pääasiassa kahdella synteessimenetelmällä, jotka ovat vaiheittainen kiintokantajasynthesei ja post-synteettinen konjugaatio. Molemmista menetelmistä on etunsa ja haasteensa, minkä takia valinta riippuu konjugoitavan molekyylin ominaisuuksista ja halutusta lopputuloksesta.<sup>1,2</sup>

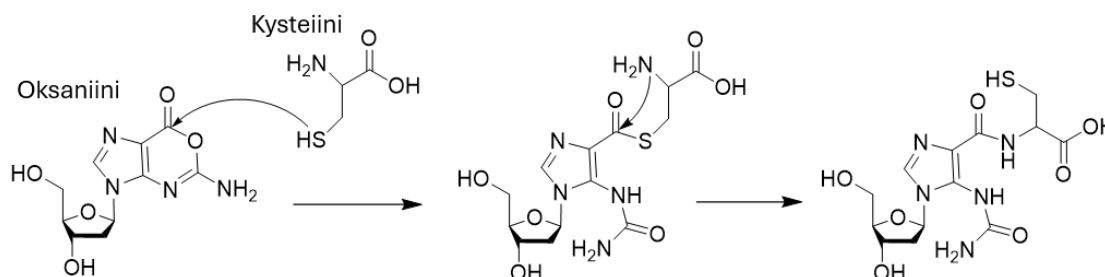
### 4.1 Post-synteettinen konjugointi

Post-synteettisessä menetelmässä peptidi ja oligonukleotidi on syntetisoitu ensin erikseen, minkä jälkeen ne yhdistetään. Tämä menetelmä on joustavampi, sillä komponentit voidaan konjugoida jälkeenpäin käyttämällä erilaisia kemiallisia reaktioita. Post-synteettisen menetelmän etuna on kemoselektiivisyys ja soveltuvuus monenlaisiin konjugaatioyhdistelmiin, mutta menetelmä on työläs ja vaatii useita puhdistusvaiheita, mikä laskee usein kokonaissaantoa.<sup>1</sup>

#### 4.1.1 Amidisidos

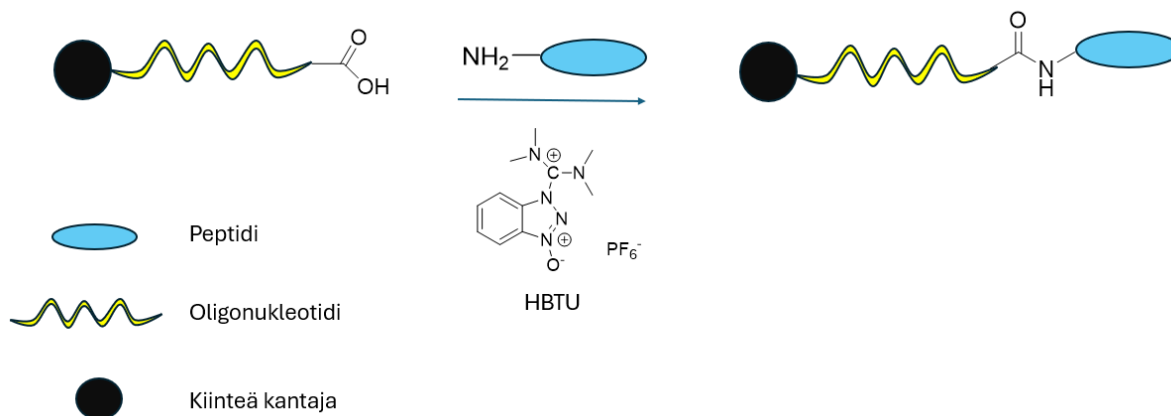
Eniten tutkittu post-syntetisointimenetelmä on amidisidoksen muodostaminen.<sup>18</sup> Kiinnitys voidaan tehdä paikkaspesifisellä natiivilla ligaatiolla tai peptidejä sitovien reagenssien, kuten HBTU:n avulla.<sup>1</sup>

Paikkaspesifinen natiivi ligaatio on suhteellisen uusi menetelmä, joka perustuu oksaniiniemäksen ja peptidin N-terminaalisten kysteiniin käyttämiseen. Kysteiniin tioliryhmä hyökkää nukleofiilisesti oksaniiniemäksen aktivoituneeseen kohtaan, minkä seurauksena tapahtuu intramolekulaarinen uudelleenjärjestäytyminen (Kaavio 1) <sup>1,19</sup> Peptidi voidaan tällä menetelmällä sijoittaa mihin tahansa oligonukleotidiketjun kohtaan. Menetelmän huonona puolena on kuitenkin se, että komplementaaristen emäsparien muodostuminen häiriintyy.<sup>1</sup>



Kaavio 1. Yksinkertaistettu kuva paikkaspesifisestä natiivi ligaatiosta. [19]

Amidisidos voidaan muodostaa selektiivisesti myös yksinkertaisilla kondensaatioreagensseilla. Yksi tällainen reagenssi on HBTU, joka on suunniteltu toimimaan sellaisten oligonukleotidien kanssa, joissa 5'-päähen on lisätty karboksyyliiryhmä. HBTU aktivoi tämän karboksyyliiryhmän, jolloin peptidi saadaan kiinnitettyä (Kaavio 2).<sup>1</sup>



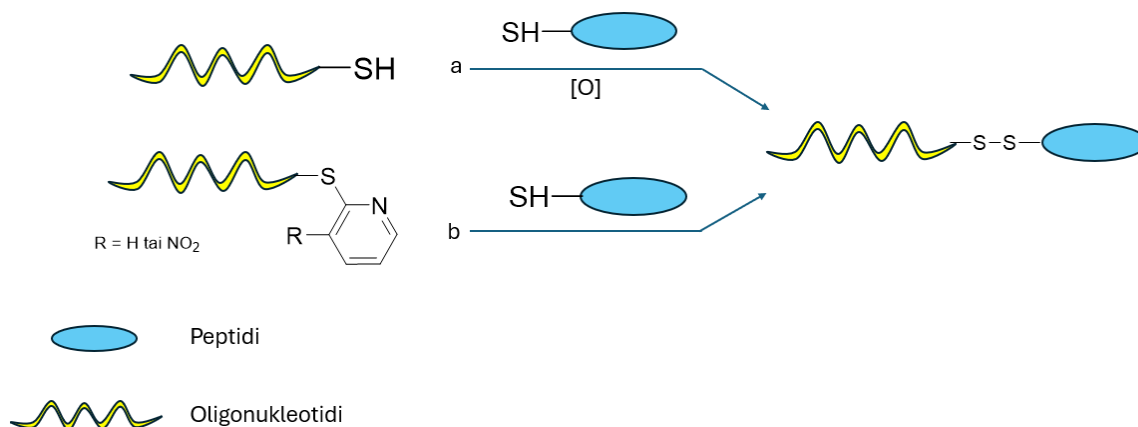
Kaavio 2. Amidisidos, peptidejä sitovan reagenssin HBTU avulla. Mukailtu viitteestä [2]

#### 4.1.2 Disulfidisisidos

Disulfidisisidokset perustuvat kahden rikkiatomin väliseen kovalenttiseen sidokseen. Disulfidisisidoksilla kiinnitettyjen konjugaattien on tutkittu olevan helposti käsiteltäviä ja stabiileja massaspektrometriseen karakterisoimiseen.<sup>18</sup> Niiden on myös tutkittu pilkkoutuvan

pelkistävissä olosuhteissa, kuten sytoplasmassa tai endosomeissa. Tätä ominaisuutta on voitu käyttää hyväksi lääkeaineiden kuljetuksessa, jossa disulfididisidos katkeaa solunsisäännoton jälkeen ja lääkeaine vapautuu haluttuun solunosaan.<sup>20</sup>

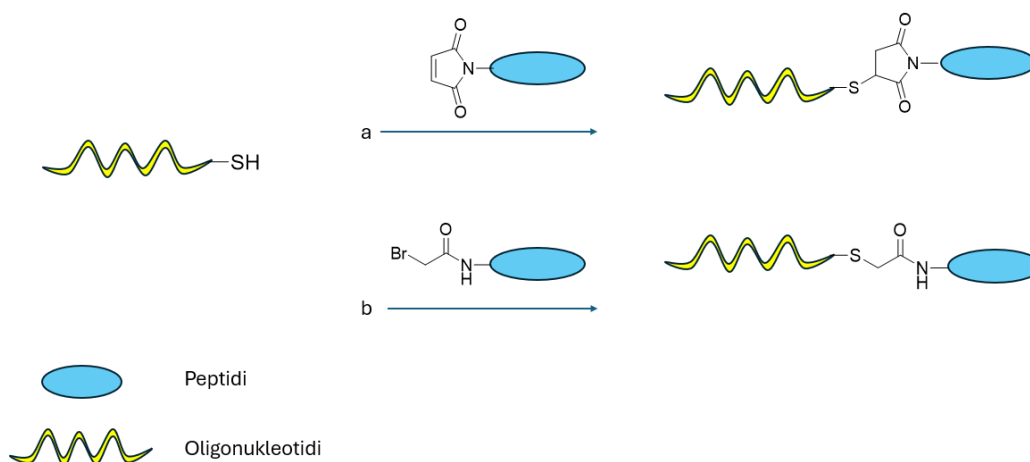
Disulfididisoksella kiinnitettyjen peptidi-oligonukleotidikonjugaattien muodostamiselle on kaksi tapaa, joista ensimmäinen perustuu kahden tioliryhmän sisältävän fragmentin suoraan hapettamiseen (Kaavio 3a). Ongelmana tässä lähestymistavassa on kuitenkin se, että siinä on huono selektiivisyys, jonka takia peptidi- tai oligonukleotidifragmentit muodostavat sivutuotteena homodimeerejä. Toinen tapa perustuu toisen tioliryhmän sisältävän fragmentin modifioimiseen niin, että muodostuu aktivoitu disulfidi. Modifioimisessa käytetään usein pyridyyli-sulfenyylimä tai 3-nitropyridyyli-sulfenyylimä (Kaavio 3b). Modifioimisen on etenkin oligonukleotidin kohdalla tutkittu lisäävän spesifisyyttä ja parantavan saantoa.<sup>1</sup>



Kaavio 3. Disulfidikiinnitys (a) suoralla hapettamisella ja (b) pyridyyli-sulfenyylimä tai 3-nitropyridyyli-sulfenyylimä aktivoinnilla. Mukailtu viitteestä [2]

#### 4.1.3 Tioetterikiinnitys

Tioetterikiinnitys on yksi yleisimmistä kiinnitystavoista peptidi-oligonukleotidikonjugaattien muodostamisessa.<sup>21</sup> Sidokset on muodostettu käyttämällä kahta eri lähestymistapaa, ensimmäinen tapa perustuu tiolien kiinnittämiseen maleimideihin Michaelin additiolla (kaavio 4a) ja toinen tapa perustuu haloasetamidien nukleofiiliseen substituutioon (kaavio 4b).<sup>1</sup>



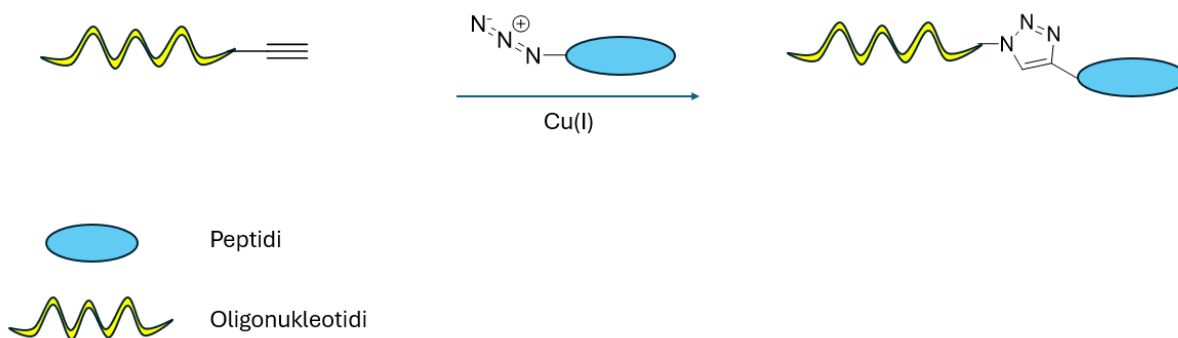
Kaavio 4. Tiolieetterikiinnitys (a) Michaelin additiolla ja (b) haloasetamidin nukleofiilisella substituutiolla. Mukailtu viitteestä [2]

Tioli-maleimidikiinnityksessä maleimidiryhmä kiinnitetään ensin peptidiin tai oligonukleotidiin sukkinyylin välityksellä. Peptidiin tai oligonukleotidiin kiinnittyneenä maleimidiryhmä toimii Michaelin vastaanottajana ja reagoi nopeasti vapaan tioliryhmän kanssa muodostaen tioli-maleimidisidoksen. Konjugoitumiseen kuitenkin vaikuttaa myös tioliryhmän nukleofiilisyyttä. Korkeasti reaktiiviset tiolit voivat muodosta disulfidisidoksia, mikä estää tioli-maleimidiliitoksen muodostumista. Tämän lisäksi myös kilpailevat nukleofiilit voivat reagoida Michaelin additiolla maleimidiryhmän kanssa muodostaen ei-haluttuja kovalenttisesti kiinnittyneitä konjugaatteja.<sup>18</sup>

Tioli-maleimidikiinnitys ei vaadi katalyyttia ja se voidaan suorittaa vesiliuoksessa, minkä takia siitä on tullut eniten käytetty peptidi-oligonukleotidikonjugaattien synteesimenetelmä.<sup>18</sup> Sen huonona puolena verrattuna esimerkiksi disulfidikiinnitykseen on se, että siinä on *in vivo* huomattu oligonukleotidin ennenaikaista irtoamista kuljettavasta peptidistä. On kuitenkin tutkittu, että tämä saadaan korjattua avaamalla tioli-maleimidisidos retro-Michael-renkaanavausreaktiolla.<sup>18</sup>

#### 4.1.4 Atsidi-alkyyini click-reaktio

Click-kemia on paljon tutkittu aihe ja sille on löydetty paljon käyttökohteita esimerkiksi biomolekyylien konjugoinnissa, lääkeaineiden kehityksessä, materiaalitieteissä ja radiokemiassa.<sup>22</sup> Peptidi-oligonukleotidienkonjugaattien syntetisoinnissa yleisimmin käytetty click-kemia on kupari(I)ionin katalysoima 1,3-dipolaarinen atsidi-alkyyynisykloadditio (Kaavio 5).<sup>1,22,23</sup>



Kaavio 5. Kupari(I)katalysoitu 1,3-dipolaarinen atsidi-alkyynisykoadditio. Mukailtu viitteestä [2]

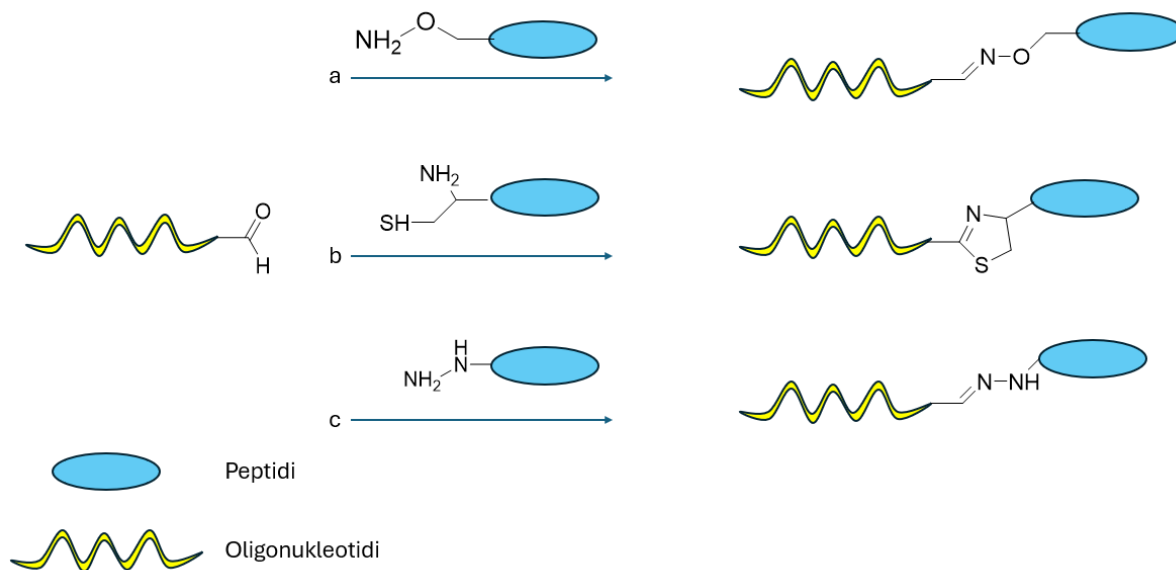
Atsidi-alkyyni click-reaktiossa atsidiryhmä ja alkyyniryhmä muodostavat 1,3-dipolaarisen rakenteen, jossa ne lähestyvät toisiaan. Katalyyttinä toimiva kupari(I) avaa alkyyniryhmän, jolloin atsidiryhmä voi kiinnittyä siihen muodostaen 1,2,3-triatsolirenkaan.<sup>22</sup>

Atsidi-alkyyni click-reaktion tehokkuus perustuu siihen, että atsidiryhmä ei reagoi helposti luonnollisten biomolekyylien kanssa, vaan se spesifisesti alkyynien kanssa. Tämä ja muut ominaisuudet, kuten alhainen reaktiolämpötila, korkea saanto, yksinkertaiset mekanismit ja korkea selektiivisyys ovat johtaneet siihen, että kyseisestä konjugaatiomenetelmästä on tullut suosittu peptidi-oligonukleotidikonjugaattien syntetiikassa.<sup>22</sup>

Atsidi-alkyyni click-reaktion huonona puolena on kuitenkin se, että hapen läsnäollessa katalyyttinä käytetty kupari(I) hapettuu nopeasti tuottaen reaktiivisia happiryhmiä, jotka voivat hajottaa tiettyjä aminohappoja, kuten histidiiniä, kysteiiniä, metioniinia, tryptofaania ja tyrosiinia. Tämä sytotoksisuus rajoittaa kupari(I)katalyytin käyttöä elävissä soluissa.<sup>24</sup>

#### 4.1.5 Karbonyylireaktiot

Karbonyylireaktioista yleisimmät ovat oksiimireaktio (Kaavio 6a), tiatsolidiinireaktio (Kaavio 6b) ja hydratsonireaktio (Kaavio 6c). Reaktiot voidaan suorittaa miedoissa olosuhteissa käyttämällä reaktiivisia funktionaalisia ryhmiä. Oksiimireaktio perustuu karbonyyliyhdisteiden, kuten aldehydien tai ketonien väliseen reaktioon amino-oksiryhmän kanssa. Oksiimireaktiossa aldehydi reagoi hydratsiiniryhmän kanssa muodostaen *O*-alkyylioksiimin. Tiatsolidiinireaktiossa tämä reaktio tapahtuu 1,2-aminotioliryhmän kanssa, jolloin muodostuu tiatsolidiini. Hydratsoni-reaktiossa nimensä mukaisesti aldehydi reagoi hydratsiinin kanssa muodostaen hydratsonin.<sup>1,2</sup>



Kaavio 6. Yleisimmät karbonyylireaktiot (a) oksimireaktio, (b) tiatsolidiinireaktio ja (c) hydratsonireaktio. Mukailtu viitteestä [2]

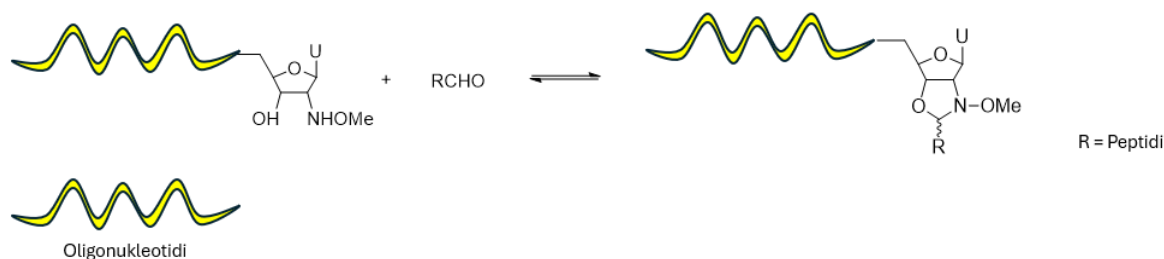
Oksimireaktio peptidi-oligonukleotidikonjugaattien syntetisoinnissa tapahtuu normaalisti aldehydiryhmän sisältävän oligonukleotidin ja hydratsiiniryhmän omaavan peptidin välillä. Reaktiivisen amino-oksiryhmän kiinnittäminen peptidiin on kannattavampaa kuin sen kiinnittäminen oligonukleotidiin, sillä aminooksi-oligonukleotidit reagoivat liuotimissa esiintyvien aldehydi- ja ketonijäämien, kuten asetaldehydin tai asetonin kanssa.<sup>1,18</sup>

Oksimireaktion hyvänä puolena on se, että aldehydiryhmä voidaan kiinnittää oligonukleotidin 3'- tai 5'-päähän, mikä mahdollistaa sen bifunktionalisoinnin.<sup>18</sup> Tämä mahdollistaa sen, että oligonukleotidiin voidaan kiinnittää kaksi eri peptidiä tai peptidin ja leimausaineen.<sup>1</sup> Reaktion huonona puolena on kuitenkin se, että reaktiivinen amino-oksiryhmä vaatii huolellista käsittelyä, jonka takia sen monipuolinen soveltaminen on vaikeaa.<sup>18</sup>

Tiatsolidiinireaktiossa peptidi-oligonukleotidikonjugaatti muodostetaan aldehydin ja 1,2-aminotioliryhmän omaavien kysteiinien välille käyttämällä hyväksi reaktion korkeaa selektiivisyyttä 1,2-aminotiolin kanssa. Reaktion hyvänä puolena, korkean selektiivisyyden lisäksi, on sen nopea reaktiokinetiikka sekä miedot reaktio-olosuhteet. Huonoja puolia ovat kuitenkin se, että aldehydit voivat reagoida ristiin muiden nukleofiilien kanssa, sekä se, että konjugaateilla on huono stabiilisuus fysiologisessa pH:ssa.<sup>18</sup> Huonoksi puoleksi voisi ajatella myös sen, että reaktio on kannattavampaa suorittaa hapettomissa olosuhteissa, joka vaikeuttaa synteysin suorittamista.<sup>1,18</sup>

Hydratsonireaktiossa aldehydiryhmän omaava oligonukleotidi kiinnitetään hydratsiiniryhmän sisältävään peptidiin. Reaktion hyvänä puolena on se, että hydratsonisidokset eivät reagoi muiden yleisten ryhmien kanssa, eli ne ovat ortogonaalisia. Huono puoli on kuitenkin se, että hydratsoniryhmät ovat epästabiileja synteessin sekä puhdistuksen aikana. Tämän seurauksena reaktiolla on rajoitetusti sovelluksia peptidi-oligonukleotidikonjugaattien syntetisoinnissa.<sup>18</sup>

Edellä mainittujen mekanismien lisäksi, yksi mielenkiintoinen Turun yliopistossa kehitetty konjugaatiomenetelmä perustuu pH-riippuvaiseen *N*-metoksioksatsolidiini kiinnitykseen. Tässä menetelmässä aldehydiryhmä kiinnitetään oligonukleotidin sijasta peptidiin ja 2'-*N*-metoksiamiiniryhmä kiinnitetään oligonukleotidiin niin, että 3'-OH jätetään vapaaksi.<sup>25</sup> *N*-metoksioksatsolidiinin muodostuminen on reversiibeli reaktio pH:n laskiessa, mikä mahdollistaa sen, että oligonukleotidi vapautuu solun sisälle endosytoosin jälkeen.<sup>1,2</sup> Konjugaatit hajoavat hyvin hitaasti pH 7 olosuhteissa.<sup>25</sup>



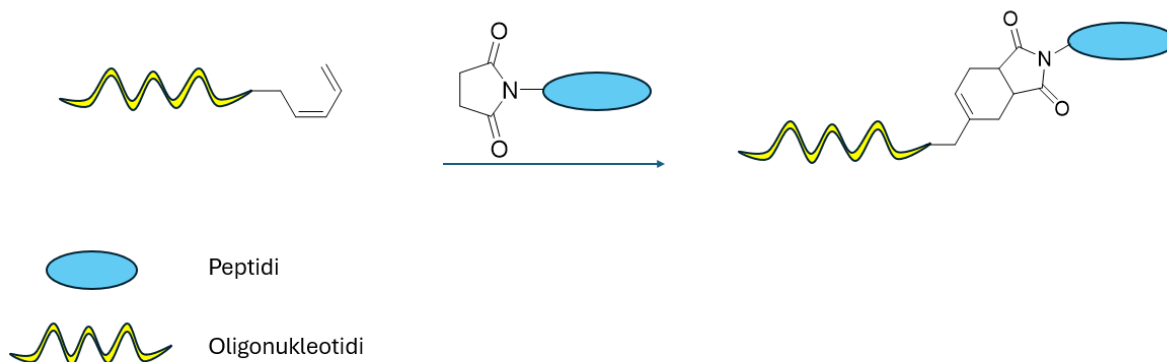
Kaavio 7. Yksinkertaistettu kuva pH-reversiibelistä *N*-metoksioksatsolidiiniligaatiosta. [26]

#### 4.1.6 Diels-Alder-reaktio

Diels-Alder-reaktiota on tutkittu jo yli kolmekymmentä vuotta, jonka aikana on kehitetty useita eri menetelmiä kiinnittää peptidejä ja oligonukleotideja toisiinsa.<sup>1</sup> Reaktion suosio biokonjugaatiomenetelmänä perustuu siihen, että se voidaan suorittaa vesiliuoksessa korkealla saannolla ja hyvällä kemoselektiivisyydellä. Peptidi-oligonukleotidikonjugaattien syntetisoinnissa hyvä menetelmä on esimerkiksi dieeni-maleimidi Diels-Alder-sykloadditioreaktio.<sup>1</sup>

Grandas tutkimusryhmineen on tutkinut dieeni-maleimidi Diels-Alder-sykloadditioreaktiota, jossa oligonukleotidin 5'-päähen kiinnitetään asyklinen dieeni, joka reagoi maleimidipeptidin kanssa (Kaavio 8).<sup>1</sup> Reaktio voidaan suorittaa vesiliuoksessa ja sen nopeutta voidaan säädellä reagenssien määrää säätelemällä. Se onnistuttiin tutkimuksissa suorittamaan 8–10 tunnissa käyttämällä pientä malimidi-peptidien ylimäärää.<sup>26</sup> Edellä mainitun menetelmän todettiin olevan hyvä tapa syntetisoida suuria peptidi-oligonukleotidikonjugaatteja. Menetelmää tulee

kuitenkin kehittää, jos peptidisekvenssin halutaan sisältävän kysteini. Ongelmaksi tässä tapauksessa tulee vapaan tioliryhmän mahdollisuus tuottaa ei haluttuja sidoksia Michaelin addition seurauksena.<sup>26</sup>



Kaavio 8. Dieeni-malimidi Diels-Alder-reaktio. Mukailtu viitteestä [2]

## 4.2 Vaiheittainen kiintokantajasynteesi

Vaiheittaisessa kiintokantajasynteesissä peptidi- ja oligonukleotidikomponentit on rakennettu peräkkäin samalla kiintokantajalla. Peptidiosa syntetisoidaan yleensä ensin käyttäen tietyillä suojaryhmillä suojattuja aminohappoja, minkä jälkeen oligonukleotidi rakennetaan vaiheittain kiinni peptidiketjuun funktionaalista linkkeriä käyttämällä. Menetelmän huonona puolena on kuitenkin se, että sitä rajoittavat oligonukleotidi- ja peptidisynteesin yhteensopimattomuudet, kuten happoherkkyys ja monimutkainen suojaryhmäkemia.<sup>1</sup>

### 4.2.1 Kiintokantajat

Vaiheittaisessa kiintokantajasynteesissä on tärkeä valita oikeanlainen kiintokantaja, jotta synteesi onnistuu halutusti. Kiintokantajan valinnassa pitää ottaa huomioon synteesimekanismi. Se aloitetaanko synteesi kiinnittämällä peptidi vai oligonukleotidi ensin vaikuttaa kiintokantajan valintaan, sillä yksittäistä kiintokantajaa, joka olisi ihanteellinen molemmissa tapauksissa, ei olla vielä onnistuttu valmistamaan.<sup>1</sup>

Käytetyin kiintokantaja tämän tyyppisisissä peptidi-oligonukleotikonjugaattien synteesissä on kontrolloitu huokoinen lasi (engl. controlled pore glass, CPG). CPG:n käyttäminen ei kuitenkaan ole kaikissa tapauksissa kannattavaa, sillä halutun konjugaatin saanto voi jäädä pieneksi.<sup>1</sup> Robles ym. vertailivat CPG:tä, polyetyleeniglykoli polystyreeniä (engl. polyethylene glycol polystyrene, PEG-PS) ja 1 % polystyreeni-ko-divinyylibentseeniä pentalysiiniä

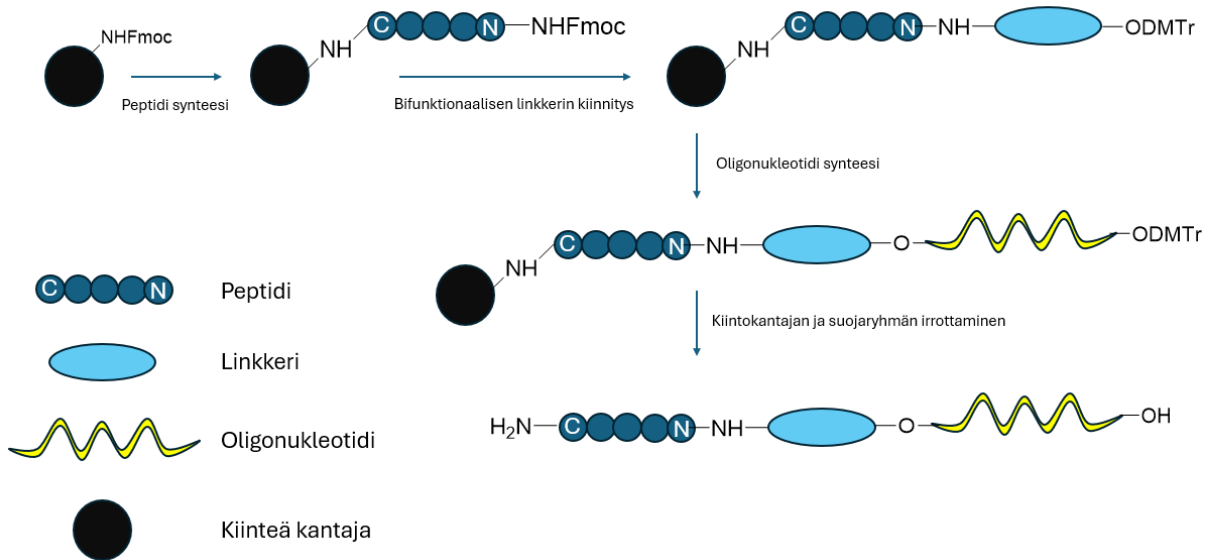
sisältävien peptidifragmenttien konjugoimiseen. Tutkimuksen lopputulos oli, että 1 % polystyreeni-ko-divinylibentseeni oli kiintokantajista paras peptidisynteesin kantaja.<sup>27</sup>

#### 4.2.2 Bi- ja trifunktionaaliset linkkerit

Vaiheittaisessa kiintokantajasynteesissä kiinteän kantajan ja biomolekyylien välille pitää valita sopivat linkkerit, joiden avulla peptidi tai oligonukleotidi saadaan kiinnitettyä kiintokantajaan. Linkkerit voidaan jakaa bifunktionaalisiin (Kaavio 9) ja trifunktionaalisiin linkkereihin (Kaavio 10) niiden sisältävien kiinnityskohtien perusteella. Bifunktionaaliset linkkerit jaetaan kahteen eri tyyppiin, sen perusteella onko se kiintokantajan ja toisen biomolekyylin välillä, vai peptidin ja oligonukleotidin välillä.<sup>1</sup>

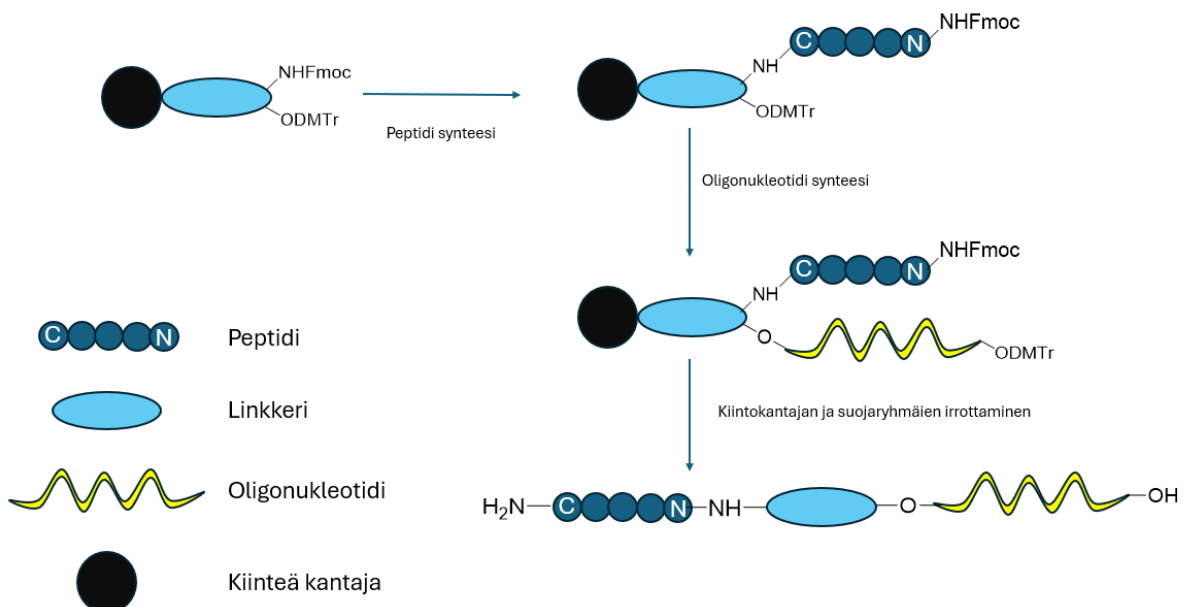
Kiintokantajan ja biomolekyylin välisen linkkerin valitsemisessa on tärkeää valita rakenne, joka kiinnittyy kiintokantajaan reversiibelisti, jotta valmis peptidi-oligonukleotidikonjugaati saadaan irrotettua kiintokantajasta. Synteseissä, joissa peptidi valmistetaan ensin, ei voida käyttää happolabiilia bifunktionaalista linkkeriä, sillä se estäisi oligonukleotidin syntetisoinnin. Tämän takia useimmat linkkerit kiinnittyvät kiintokantajaan esterisidoksella, joka voidaan irrottaa kätevästi emäshydrolyysilla, aminolyysillä tai beta-eliminaatiolla. Kun bifunktionaalista linkkeriä käyttävä synteesi aloitetaan oligonukleotidin valmistuksella, linkkerin on hyvä sisältää oligonukleotidin ensimmäinen nukleosidi, jolloin kiintokantajan irrottaminen synteesin loppuksi onnistuu käsittelemällä sitä ammoniakkin vesiliuoksella.<sup>1</sup>

Peptidi-oligonukleotidikonjugaattien vaiheittaisessa kiintokantaja-synteesissä tarvitaan peptidin ja oligonukleotidin väliin funktionaaliset ryhmät, joiden avulla konjugaatin toinen osa saadaan syntetisoitua. Usein käytetty strategia on kiinnittää peptidiin hydroksyyli ryhmän sisältävä aminohappo, johon oligonukleotidi voidaan syntetisoida fosforamidiitimenetelmällä. Toinen tapa kiinnittää peptidi ja oligonukleotidi on käyttää lisäbifunktionaalista linkkeriä, joka sisältää suojatun hydroksyyli ryhmän sekä aktivoitua karboksyyli ryhmän (Kaavio 9). Oligonukleotidi pystytään tällöin syntetisoimaan linkkerin hydroksyyli ryhmään.<sup>1</sup>



Kaavio 9. Bifunktionaalisen linkkerin avulla suoritettu synteesi. Mukailtu viitteestä [1]

Trifunktionaaliset linkkerit eroavat bifunktionaalisista linkkereistä siinä, että kiinteään kantajaan kiinnittyvän osan lisäksi ne sisältävät sekä suojatun hydroksyyliiryhmän, että aminoryhmän. Tämä mahdollistaa sen, että oikeilla suojaryhmillä suojattuna molemmat konjugaatin osat voidaan syntetisoida rinnakkain (Kaavio 10). Trifunktionaalisiin linkkereihin syntetisoidaan yleisemmin ensin peptidi, minkä jälkeen jatketaan oligonukleotidin synteisiin. Suojaryhmistä yleisimmät ovat DMTr ja Fmoc. DMTr toimii suojaryhmänä hydroksyyliiryhmälle ja Fmoc aminoryhmälle.<sup>1</sup>



Kaavio 10. Trifunktionaalisen linkkerin avulla suoritettu synteesi. Mukailtu viitteestä [1]

## 5 Sovelluksia ja tulevaisuuden näkymät

Peptidi-oligonukleotidikonjugaateille on keksitty useita eri terapeuttisia sovelluksia, joita on tutkittu erilaisten tautien hoitamiseksi. Esimerkiksi luuytimeen kohdentuvaa heptapeptidiä on yritetty käyttää silmukointia muokkaavien oligonukleotidien kohdentamiseen.<sup>28</sup> Tarkoituksena on muokata ferrokelaasientsyymiä koodaavan sekvenssin silmukointia, jolloin entsyymien tuotanto lisääntyisi ja mahdollisesti auttaisi erytropoieenin protoporfyrin hoitamisessa.<sup>2</sup>

Yksi kiinnostava peptidi-oligonukleotidikonjugaattien sovelluksista liittyy neurotensiini neuropeptidin hyödyntämiseen. Kyseisiä neuropeptidejä esiintyy keskushermostossa sekä ruoansulatuskanavassa, ja ne osallistuvat moniin biologisiin prosesseihin, kuten dopaminergiseen signalointiin, lämpötilaa alentaviin ja kipua lievittäviin vasteisiin. Tutkimusten edetessä peptidin käyttäminen mahdollistaisi siis kohdentamisen kyseisiin kudoksiin.<sup>2</sup>

Peptidi-oligonukleotikonjugaatteja on tutkittu myös verenpaineen ja plasmatilavuuden säätelyssä. Esimerkiksi tällaisesta sovelluksesta perustuu angiotensiini II-peptidin käyttämiseen antisense-oligonukleotidin kuljettamisessa. Angiotensiini II-peptidi on keskeinen bioaktiivinen hormoni reniini-angiotensiinijärjestelmässä, joka säätelee verenpainetta ja plasmatilavuutta. Peptidi sitoutuu angiotensiini II-reseptoreihin, joita esiintyy pääasiassa sydämessä, munuaisissa ja lisämunuaisissa. Tämä mahdollistaa esimerkiksi antisense-oligonukleotidin kohdentamisen kyseisiin sisäelimiin.<sup>2</sup>

Edellä mainittujen sovelluksien lisäksi peptidi-oligonukleotidikonjugaatteja tutkitaan jatkuvasti uusien sovelluskohteiden löytämiseksi. Jatkuvan tutkimuksen seurauksena peptidi-oligonukleotidikonjugaatit voivat tulevaisuudessa olla korvaamattomia yksilöllisten geeniterapioiden ja syöpälääkkeiden kohdentamisessa, sekä lääkeaineiden kuljettamisessa kohdesoluihin ja kudoksiin. Tulevaisuudessa synteesisimenetelmien kehityksen myötä peptidi-oligonukleotidikonjugaatteiden tehokkuus ja turvallisuus paranevat. Haasteita on kuitenkin vielä ratkaistavana, mutta synteesisimenetelmien sekä oligonukleotidilääkkeiden tutkimuksen edetessä peptidi-oligonukleotidikonjugaattien terapeuttisten sovelluksien määrä tulee varmasti kasvamaan.<sup>1,2</sup>

## 6 Yhteenveto

Peptidi-oligonukleotidikonjugaatteja on tutkittu jo kymmeniä vuosia ja niiden tutkimuksessa on edistytty paljon.<sup>1</sup> Vuonna 1998 Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (engl. Food and

Drug Administration, FDA) hyväksyi lääkekäyttöön ensimmäisen oligonukleotideihin perustuvan lääkkeen formivirseenin eli vitraveenin. Tämä on johtanut myös muiden oligonukleotideihin perustuvien lääkkeiden, kuten PMO-pohjaisen eteplirsenin, hyväksymiseen.<sup>1</sup>

Oligonukleotideihin perustuvien lääkkeiden tutkimuksen myötä on tullut tarpeeseen kehittää uudenlaisia kuljettajamolekyylejä. Solukalvon läpäisevät peptidit ovat osoittautuneet lupaaviksi kuljettajamolekyyleiksi, minkä takia niiden kiinnittämistä oligonukleotideihin on tutkittu paljon. Solukalvon läpäisevien peptidien toimintamekanismia ei vielä täysin ymmärretä, mutta on todettu, että sama peptidi voi läpäistä solukalvon usealla eri tavalla olosuhteista riippuen.<sup>1,2</sup>

Peptidi-oligonukleotidikonjugaattien synteesimenetelmät ovat kehittyneet vuosien aikana paljon ja uudenlaisia menetelmiä kehitetään jatkuvasti. Yleispätevää menetelmää ei ole vielä olemassa ja sellaisen laatiminen voi olla mahdotonta solukalvon läpäisevien peptidien erilaisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien takia. Konjugaatiomenetelmät voidaan jakaa kahteen pääryhmään, jotka ovat post-synteettinen konjugointi ja vaiheittainen kiintokantajasynteesi.<sup>1</sup>

Peptidi-oligonukleotidikonjugaateille on keksitty useita terapeuttisia sovelluksia, joita tutkitaan jatkuvasti. Useimmat sovellukset perustuvat erilaisten solukalvon läpäisevien peptidien ja niistä tehtyjen konjugaattien tutkimiseen. Esimerkiksi luuytimeen kohdentuvaa heptapeptidiä, keskushermostosta ja ruoansulatuskanavista löytyvää neurotensiini neuropeptidiä sekä reniini-angiotensiinijärjestelmässä esiintyvää angiotensiini II-peptidiä on tutkittu erilaisten oligonukleotidien kuljettajina hankalasti saavutettaviin kudoksiin ja soluihin. Myös syöpäsoluihin paikkaspesifisiä solukalvon läpäiseviä peptidejä tutkitaan parempien syöpähoitojen kehittämiseksi. Tällä hetkellä peptidi-oligonukleotidikonjugaatteja ei kuitenkaan vielä ole käytössä syövänhoidossa.<sup>2</sup>

Oligonukleotidilääkkeiden ja solukalvon läpäisevien peptidien tutkimisen sekä synteesimenetelmien kehittämisen myötä peptidi-oligonukleotidikonjugaattien terapeuttiset sovellukset tulevat varmasti kasvamaan tulevaisuudessa. Jatkuvan tutkimuksen ansiosta peptidi-oligonukleotidikonjugaatit voivat tulla korvaamattomiksi yksilöllisten geeniterapioiden ja syöpälääkkeiden kohdentamisessa, sekä muiden lääkeaineiden kuljettamisessa hankalasti saavutettaviin soluihin ja kudoksiin.<sup>1,2</sup>

## 7 Lähteet

1. Klabenkova, K., Fokina, A. & Stetsenko, D. Chemistry of peptide-oligonucleotide conjugates: A review. *Molecules* vol. 26 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules26175420> (2021).
2. Malinowska, A. L., Huynh, H. L. & Bose, S. Peptide–Oligonucleotide Conjugation: Chemistry and Therapeutic Applications. *Current Issues in Molecular Biology* vol. 46 11031–11047 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cimb46100655> (2024).
3. Fàbrega, C. *et al.* Lipid and Peptide-Oligonucleotide Conjugates for Therapeutic Purposes: From Simple Hybrids to Complex Multifunctional Assemblies. *Pharmaceutics* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020320> (2023).
4. Finkel, R. S. *et al.* Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine* **377**, 1723–1732 (2017).
5. Charleston, J. S. *et al.* Eteplirsen treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* **90**, e2135–e2145 (2018).
6. Wagner, A., Bock, C. T., Fechner, H. & Kurreck, J. Application of modified antisense oligonucleotides and siRNAs as antiviral drugs. *Future Medicinal Chemistry* vol. 7 1637–1642 Preprint at <https://doi.org/10.4155/fmc.15.114> (2015).
7. Hegarty, J. P. & Stewart, D. B. Advances in therapeutic bacterial antisense biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 102 1055–1065 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8671-0> (2018).
8. Mitchell, D. J., Steinman, L., Kim, D. T., Fathman, C. G. & Rothbard, J. B. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *Journal of Peptide Research* **56**, 318–325 (2000).
9. Milletti, F. Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape. *Drug Discovery Today* vol. 17 850–860 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002> (2012).
10. Zaro, J. L. & Shen, W. C. Cationic and amphipathic cell-penetrating peptides (CPPs): Their structures and in vivo studies in drug delivery. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* vol. 9 407–427 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11705-015-1538-y> (2015).
11. Herce, H. D. & Garcia, A. E. *Molecular Dynamics Simulations Suggest a Mechanism for Translocation of the HIV-1 TAT Peptide across Lipid Membranes*. *PNAS* vol. 104 (2007).
12. Koren, E. & Torchilin, V. P. Cell-penetrating peptides: Breaking through to the other side. *Trends in Molecular Medicine* vol. 18 385–393 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.012> (2012).
13. van den Berg, A. & Dowdy, S. F. Protein transduction domain delivery of therapeutic macromolecules. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 22 888–893 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.03.008> (2011).
14. Samec, T., Boulos, J., Gilmore, S., Hazelton, A. & Alexander-Bryant, A. Peptide-based delivery of therapeutics in cancer treatment. *Materials Today Bio* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100248> (2022).
15. Deshayes, S., Morris, M., Heitz, F. & Divita, G. Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 537–547 (2008).
16. Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. & Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol* **19**, 1173–1176 (2001).
17. Bawa, R. *et al.* Self-assembling peptide-based nanoparticles enhance cellular delivery of the hydrophobic anticancer drug ellipticine through caveolae-dependent endocytosis. *Nanomedicine* **8**, 647–654 (2012).
18. Patil, N. A. Conjugation Approaches for Peptide-Mediated Delivery of Oligonucleotides Therapeutics. *Aust J Chem* **75**, 24–33 (2022).

19. Jang, E. K. *et al.* Nucleobase-involved native chemical ligation: A novel reaction between an oxanine nucleobase and: N -terminal cysteine for oligonucleotide-peptide conjugation. *Chemical Communications* **56**, 5508–5511 (2020).
20. Saito, G., Swanson, J. A. & Lee, K.-D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 199–215 (2003).
21. Lu, K., Duan, Q. P., Ma, L. & Zhao, D. X. Chemical Strategies for the Synthesis of Peptide-Oligonucleotide Conjugates. *Bioconjug Chem* **21**, 187–202 (2010).
22. Nwe, K. & Brechbiel, M. W. Growing Applications of “Click Chemistry” for Bioconjugation in Contemporary Biomedical Research. *Cancer Biother Radiopharm* **24**, 289–302 (2009).
23. Lallana, E., Riguera, R. & Fernandez-Megia, E. Reliable and efficient procedures for the conjugation of biomolecules through huisgen azide-alkyne cycloadditions. *Angewandte Chemie - International Edition* vol. 50 8794–8804 Preprint at <https://doi.org/10.1002/anie.201101019> (2011).
24. Li, S. *et al.* Extent of the Oxidative Side Reactions to Peptides and Proteins during the CuAAC Reaction. *Bioconjug Chem* **27**, 2315–2322 (2016).
25. Aho, A., Sulkanen, M., Korhonen, H. & Virta, P. Conjugation of oligonucleotides to peptide aldehydes via a pH-responsive N-methoxyoxazolidine linker. *Org Lett* **22**, 6714–6718 (2020).
26. Marchán, V., Ortega, S., Pulido, D., Pedroso, E. & Grandas, A. Diels-Alder cycloadditions in water for the straightforward preparation of peptide - Oligonucleotide conjugates. *Nucleic Acids Res* **34**, (2006).
27. Robles, J. *et al.* Towards nucleopeptides containing any trifunctional amino acid. *Tetrahedron* **55**, 13251–13264 (1999).
28. Nowakowski, G. S. *et al.* A Specific Heptapeptide from a Phage Display Peptide Library Homes to Bone Marrow and Binds to Primitive Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells* **22**, 1030–1038 (2004).