

综述与专论

肽缀合反义寡核苷酸的合成和性能

陈长坡 闵吉梅 张礼和*

(北京大学医学部天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 反义寡核苷酸可作为基因表达的抑制剂和潜在的治疗药物, 但多种类型的寡核苷酸为聚阴离子化合物, 难以跨过细胞膜。已知包括融合肽、信号肽在内的多种生物活性多肽具有跨膜与核定位能力。讨论了反义寡核苷酸-肽缀合物的合成和生物活性。

关键词 反义寡核苷酸, 融合肽, 信号肽, 合成, 肽-寡核苷酸缀合物

学科分类号 Q523, R914

自从第一次报告用反义寡核苷酸治疗劳氏肉瘤病毒以来, 利用合成寡核苷酸 (ODN) 作为基因表达抑制剂得到了深入的研究。有多个反义药物目前正在进行临床试验, 美国食品及药物管理局 (FDA) 已批准了第一个反义药物, 用于治疗巨细胞病毒引起的视网膜炎。作为药物使用的反义寡核苷酸 (ASON) 必须对靶序列具特异的亲和力、可激活 RNaseH 对 mRNA 的切割、迅速进入细胞、可抵抗细胞内核酸酶的降解。天然 ODN 显然无法满足这些要求。人们主要在两个方面进行了深入的研究, 一方面是对 ODN 进行化学改造和修饰; 另一方面是发展 ODN 的胞内转运载体。近年来, 肽-寡核苷酸缀合物引起了人们的研究兴趣, 这些由肽和寡核苷酸组成的缀合分子, 由于肽的引入而拥有了某些新的生物或生物物理特性, 因此, 为把 ODN 开发为实用的临床药物开辟了新的途径。

1 肽序列的选择

1.1 融合肽

各种病毒都有一段病毒编码细胞表面蛋白 C 端融合肽 (fusion peptide), 并据以介导重要的生理过程, 如病毒与靶细胞的结合及随后发生的通过融合膜而使病毒内化^[1]。修饰或未修饰 ODN 进入细胞多是通过胞吞途径完成的。细胞吞噬的 ODN 保留在吞噬颗粒中, 并最终在溶酶体内被分解。但病毒包被蛋白包装的病毒基因组被吞入溶酶体后, 其包被蛋白可破坏溶酶体膜而不被其中的酶分解。基于这种认识, 人们希望融合肽-寡核苷酸缀合物能逃避溶酶体的降解进入细胞质或细胞核中, 从而发

挥反义治疗作用。用于缀合物合成的此类多肽有 HIV gp41 融合肽^[2]、流感病毒融合肽^[3]等。

1.2 信号肽

信号肽 (signal peptide) 是天然存在的具有膜通透能力的多肽片段, 在其作用下一些新生蛋白质可越过多重膜体系而被分泌到细胞外。同时人们发现信号肽也是一些蛋白质定位在质膜和其他一些与细胞外相通的细胞器内的信号。蛋白质重组了信号肽编码的序列后可改善基因产物的分泌能力。人们期望 ODN 和这种信号序列缀合后, 提高其透过细胞膜的能力。在肽-寡核苷酸缀合物研究较多的是 KDEL 序列^[4]。

目前核-胞浆间物质转运研究最清楚的是蛋白质向核内输入。该过程是由待输入蛋白质内部核定位信号 (nuclear location signal, NLS) 所介导的。NLS 是一段具有特殊组成和排列的氨基酸序列, 它通常主要由富含碱性氨基酸的一段序列构成一个连续的或两部分组成的模体 (motif), 核输入是一个温度和能量依赖的过程。目前发现并研究的核定位信号序列有 50 多种。已用于肽-寡核苷酸缀合物合成的有 SV40 大 T 抗原、流感病毒核蛋白、蛙的 nucleoplasmin 及酵母的 NLS 信号肽^[5,6]。

1.3 其他肽序列

Antennapedia 穿透细胞膜的机制与常见的吞噬过程不同。内化模型研究表明^[7], 其三个 α 螺旋可通过碱性氨基酸的正电荷与细胞膜表面的负

* 通讯联系人。

Tel: 010-62091570, E-mail: zdszlh@mail.bjmu.edu.cn

收稿日期: 2001-01-05, 接受日期: 2001-01-20

电荷以静电引力相结合, 这种稳定的结合作用可使肽聚集在水-膜界面, 从而使双层脂膜结构转变为向内翻转的胶束, 使肽直接进入细胞质中. ODN 与 antennapedia 共价结合的缀合物胞内转运机制与此相似. 阳离子肽如 HIV-1 的 Tat 蛋白部分序列^[8]、具有两亲性且可形成 α 螺旋的肽、胰岛素样生长因子模拟片段等也用于肽缀合反义寡核苷酸的合成.

2 肽缀合反义寡核苷酸的合成方法

2.1 液相会聚法

固相合成肽和寡核苷酸都有成熟的标准合成方案, 人们利用这些方法先分别合成肽和寡核苷酸, 并在链的末端或适当位置引入特异的官能团, 分别脱保护、纯化后进行缀合反应. 用于肽和寡核苷酸连接的化学键有二硫键、硫醚键及酰胺键^[9].

二硫键已知在生物体内可被还原性物质打开, 从而使缀合物中的 ODN 以自由形式释放出来. 这种连接方法采用末端为半胱氨酸残基的脱保护肽, 与 5' 或 3' 端引入巯基的脱保护 ODN 反应. ODN 末端巯基的引入一般有两种方法, 一是采用双功能基试剂在合成寡核苷酸时一步引入; 二是先按标准合成方案合成 ODN, 最后一步用 5' 氨基化的核苷酸单体进行合成, 或将最后一个核苷酸的 5' 位转化为氨基后, 与 3-(2-吡啶二硫基) 丙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (SPDP) 反应引入保护的巯基. 2-吡啶基硫活化的末端巯基与自由巯基反应形成二硫键. Antopolsky 等^[10] 用这一方法合成了 MPM (membrane permeable motif) 序列及 MPM-NLS 杂合肽与 18mer 的 ODN 组成的缀合物.

顺丁烯二酰亚胺基-苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯^[6]与 (4-N-马来酰亚胺甲基)-环己基-1-羧酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯^[11]也用于缀合物的合成. 将碘(溴)代乙酸与 ODN (或肽) 的末端结合后, 再与末端为巯基的肽 (或 ODN) 反应, 为缀合物的连接提供了新途径^[12] (图 1).

McMinn 等^[13]采用光敏感的连接分子合成寡核苷酸, 在光照条件下将带保护基的 ODN 切割下来, 并在 3' 位出现一个氨基. 为使氨基酸侧链保护基的脱除与 ODN 的脱保护条件兼容, 将肽链中 Ser 的侧链羟基用乙酰基保护, 并将肽链的氨基末端乙酰化封闭. 合成的肽从 Rink 树脂上用弱酸切割下来后, 在 DMF 中用 PyBOP (benzotriazole-1-yl-oxy-trispyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) 活化

后和 ODN 末端缀合的氨基反应, 得到了以酰胺键连接的肽缀合寡核苷酸.

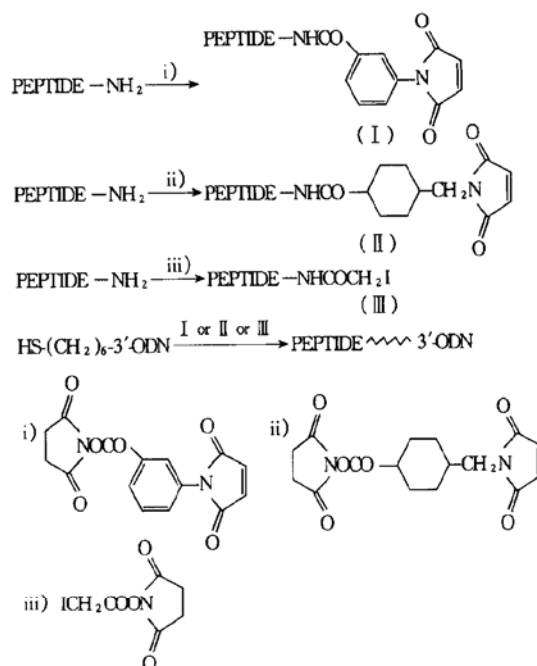


Fig. 1 Liquid phase fragment coupling reactions used in the preparation of peptide-oligonucleotide conjugates

图 1 液相缀合反应式 (马来酰亚胺法及卤代乙酸酯法)

会聚法的最大优点是分别用成熟方法高产率地合成肽和寡核苷酸, 不存在保护基的不相容问题. 但这种在溶液中进行的会聚反应由于在缀合反应前需要对肽和 ODN 分别进行纯化, 且缀合反应易受肽和 ODN 的二级结构的影响, 产率一般不高. 同时在溶液中进行的片段会聚缀合方法, 一般要求仅在肽的端位出现半胱氨酸残基, 从而限制了对肽序列的选择.

2.2 逐步合成法

固相逐步合成法就是在固相载体上将 ODN 和肽合成的单体逐个连接形成缀合物. 基于切割及核苷酸自动合成仪的特殊要求, 成功地用于合成肽-寡核苷酸缀合物的固相载体仅有 CPG、PS-PEG 等少数几种. 主要合成方法可分为两种, 一是先合成肽序列, ODN 的 3' 位和肽连接. 一般用 BOC 法合成肽链, 侧链基团用 Fm 或 Fmoc 保护, 肽与载体的连接采用碱敏感连接分子^[5]; 另一种策略是先合成 ODN, 其 5' 位与肽相连, 用与 ODN 相容的 Fmoc 方案合成肽.

已有多种方法可将核苷酸的 5' 羟基转化为氨基, 有人将 5' 位氨基用 MMT 保护, 经 3' 位亚磷酰化制备用于 ODN 合成的亚磷酰化试剂, 在标准

ODN 合成的最后一步接上这种 5' 氨基化的核苷酸, 以此氨基为起点合成肽, 是分步合成法中 ODN 与肽连接的又一模式^[14].

有报道^[15]将固相载体上引入双官能团化合物, 该双官能团化合物含有不同保护基保护的羟基和氨基, 先将羟基保护基团 DMT 在酸性条件下脱除, 据以合成 ODN 片段, 再脱除保护氨基的 Fmoc 基团, 使用 Fmoc 方案合成肽序列 (图 2a). Napoli 等^[16]将 5'-O-DMT-3'-叔丁基二甲基硅基-N⁴-苯甲酰基-2'-脱氧尿嘧啶的 4'-氨基与固相载体 Tentagel 树脂连接, 在酸性条件下脱除 DMT (4, 4'-二甲氧基三苯甲基) 后, 据以合成 ODN, 最后再使用氟化氢-三乙胺脱除叔丁基二甲基硅保护基, 据以进行肽序列的合成 (图 2b).

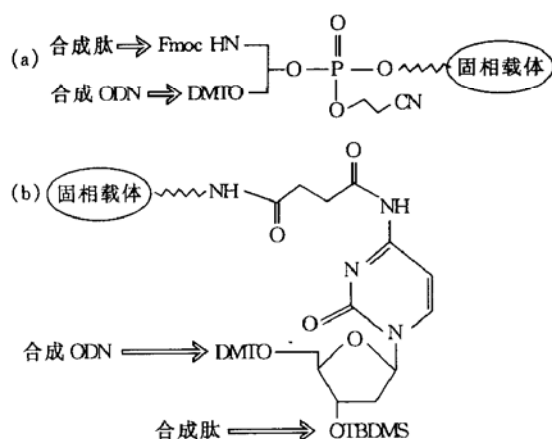


Fig. 2 Bifunctional supports for in-line stepwise synthesis of peptide oligonucleotide conjugates

图 2 用于逐步合成缀合物的双官能团固相载体

在逐步合成法中, 无论先合成肽或是先合成寡核苷酸, 都存在侧链保护策略的选择问题, 这些限制了肽序列的选择. 因此迫切需要探索与肽及寡核苷酸合成均兼容的新的保护策略.

2.3 固相片段合成法

Peyrottes 等^[17]基于对液相片段合成及固相逐步合成方法的分析, 设计了固相片段合成法. 先在 Wang 树脂上合成侧链保护的多肽 Asir Arg₃ Pro₂ Asir Gly, 天冬氨酸、精氨酸的侧链分别用 Trt 和 Pmc (2, 2, 5, 7, 8-pentamethylchroman-6-sulfonyl) 进行保护. ODN 的合成用标准亚磷酸法, 脱去最后一个碱基 5' 位的 DMT 保护基, 用羰基二咪唑活化后, 选用不同长度的 α , ω -二胺将末端转换为氨基, 用三乙胺-乙腈 (4:6) 脱去 ODN 的氰基保护基, 与脱保护的肽反应, 以 40% 的收率得到了缀合物.

3 肽缀合反义寡核苷酸的性质

3.1 T_m 值

T_m 值从一个侧面反映了缀合物的杂交稳定性. Eritja 等^[18]将 SV40 大 T 抗原的核定位信号序列 Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val 与人 c-myc 癌基因的 15mer 反义序列的 3' 位以二硫键结合, 以利于向胞内转运及防止 3'-核酸外切酶对 ODN 的降解. 缀合物的 T_m 值为 59℃, 而正常序列的 T_m 值为 56℃. 推测可能是碱性氨基酸所带的正电荷与 ODN 的负电荷作用, 增强了双螺旋的稳定性. Torre 报道^[5], 把 Ha-ras 基因的反义序列和 SV40 大 T 抗原的 NLS 片段缀合后, T_m 值由 61.5℃ 上升到 63.5℃, 但电泳结果表明, 肽缀合反义寡核苷酸和互补 RNA 的结合不理想, 可能是该 RNA 片段中存在二级结构造成的.

Harrison 等^[11]用精氨酸、鸟氨酸、组氨酸和赖氨酸等四种碱性氨基酸和疏水性氨基酸色氨酸及亮氨酸, 合成了 49 个末端为半胱氨酸的肽组成的库. 该肽库与 8mer 的 ODN 序列 (5' 位氨基和 SMCC 反应进行衍生化) 反应得到了 49 个缀合物, 未缀合的 ODN 的 T_m 值为 19.5℃, 缀合物的 T_m 值 (除一个为 19.5℃ 外) 都有所提高, 提高值与肽序列中碱性氨基酸的个数呈正相关. Wei 等^[12]将两段反义 ODN 和聚精氨酸的 N、C 端分别相连, 每个精氨酸残基可使缀合物的 T_m 值上升 2℃. Reed 等^[19]将 24mer 的乙肝表面抗原启动密码子区的反义序列分别和 SV40 大 T 抗原、流感病毒核蛋白、酵母 $\alpha 2$ 核蛋白的 NLS 以硫醚键缀合, 测定了这三个缀合物及 5' 保护但未与肽缀合的同序列 ODN 的 T_m 值, 结果分别为 61.8℃、59.0℃、60.8℃ 和 62.8℃, 说明和肽共价结合后并未对 ODN 的杂交性能产生明显的影响.

3.2 细胞吸收与胞内定位

反义寡核苷酸发挥生物效应的细胞内区主要在细胞质和细胞核, 靶 mRNA 主要定位于细胞质, 而原 mRNA 及对 RNA-DNA 双链产生切割作用的 RNase H 则主要定位于细胞核. 羧基端含有 KDEL 序列的肽可介导内质网腔蛋白从高尔基器输出, 识别 KDEL 序列的受体定位于高尔基器、IC 和内质网上, 并在这些细胞器间作为物质转运的载体. Pichon 等^[4]合成了 KDEL 序列与 ODN 的缀合物, 研究了荧光标记的肽缀合 ODN 的细胞吸收和胞内定位. 发现缀合物主要定位于内质网、IC 和高尔

基器中, 而胞内体和溶酶体中较少. 缀合的 KDEL 改变了 ODN 的胞内转运途径. Bongartz 等^[3]使用 HIV Tat 蛋白编码基因的反义序列和流感病毒融合肽形成的缀合物, 经荧光标记后, 利用 CEM-SS 淋巴细胞和 BHK21 成纤维细胞研究透膜作用, 发现在无血清条件下可使细胞吸收增加 1~5 倍, 但在血清存在下, 这种透膜作用有所下降.

Chaloin 及其合作者^[6]合成了由信号肽和融合肽组成的杂合肽, 该序列和 26mer 荧光标记的 ODN 缀合后, 和 HS68、NIH3T3 细胞一起温育 3 min 即有 90% 的细胞内出现荧光信号. Tung^[9]报道, 核定位信号肽和其他序列组成的杂合肽与 ODN 缀合, 该缀合物的荧光信号主要集中在胞内体中. 因此可以认为, 肽缀合反义寡核苷酸的跨膜转运和细胞内定位在不同细胞系中是有差异的.

3.3 缀合物对核酸酶的稳定性

天然磷酸二酯键易被体内无处不在的核酸酶降解, 不能直接用作临床治疗药物. (AlaLys)₅ Ala 和 30mer 的寡核苷酸的 3' 位共价结合后, 将缀合物与蛇毒磷酸二酯酶、脾磷酸二酯酶及 P1 磷酸酶一起温育, 发现缀合物可抗蛇毒磷酸二酯酶的降解, 脾磷酸二酯酶及 P1 磷酸酶也仅可使缀合物部分降解^[20]. Juby 等^[15]也报道, 17mer 的寡核苷酸的 3' 位和三肽、五肽 [Z-D-Phe-L-Phe-Gly、(Lys)₅ 和 (Trp)₅] 共价结合后, 缀合物在 pH 8.9、37℃ 条件下与蛇毒磷酸二酯酶温育 1 h, 未见水解; 而相应的未与肽缀合的 ODN 则发生了严重的降解.

3.4 反义活性

Bongartz 等^[3]将肽-寡核苷酸 (HIVTat 蛋白 AUG 启动位点的反义序列) 和转染 HIV 病毒的 CEM-SS 淋巴细胞进行温育, 测定细胞内逆转录酶活性, 结果表明, 肽缀合反义寡核苷酸在无血清条件下可抑制逆转录酶的翻译, 肽缀合后可使反义 ODN 的抗病毒活性提高 5~10 倍, 在有效剂量 (0.1~1 μmol/L) 浓度下未发现明显的毒性效应, 但未发现序列特异性的抑制作用.

Tung 等^[8]合成了 Tat 蛋白衍生肽缀合的与 HIV TAR RNA 茎环区互补的 6mer ODN, 由于 Tat 衍生肽与 TAR RNA 的双链区有特异的结合能力, 在 3' 位以六碳连接分子与肽相连的缀合物及在 5' 位以十二碳为连接臂与肽缀合的 ODN, 在体外都可激活 RNaseH 对 TAR RNA 的切割, 这种作用被认为是由肽和 ODN 的双重特异性引起的. 也有研究发现^[21], 将反义寡核苷酸与 pAntennapedia 共价结合

后, 可使细胞中淀粉样前体蛋白的合成出现显著的一过性下降. 最近, Astriab-Fisher 等^[22]把 Tat 蛋白衍生肽序列 RKKRRQRRPPQC 和 pAntennapedia 肽片段 RQIKIWFQNRRMKWKKGGC, 分别以二硫键共价结合于 P-糖蛋白 mRNA 的反义序列上, 发现肽缀合 ASON 在 10% FBS 存在下仍可进入细胞并表现出反义活性, 而现在普遍使用的 Lipofectin 在 FBS 的存在下则不能将 ODN 有效转运到细胞中.

Pichon 等^[4]研究了缀合了 KDEL 片段的反义寡核苷酸 (ODN-KDEL) 的活性. 与 HIV-1 gag 基因的 AUG 启动位点互补的反义寡核苷酸与 C 端含 KDEL 残基的肽共价结合, 含 KDEA 的肽作为对照. 该研究小组发现在 HepG2 细胞系中, 虽然 ODN-KDEL [IC_{50} 为 $(0.2 \pm 0.05) \mu\text{mol/L}$] 的细胞吸收是非缀合 ODN [IC_{50} 为 $(0.7 \pm 0.1) \mu\text{mol/L}$] 的四分之一, 但其反义活性则为非缀合 ODN 的五倍. ODN-KDEA [IC_{50} 值为 $(1.0 \pm 0.2) \mu\text{mol/L}$] 的细胞吸收虽与 ODN-KDEL 的水平相当, 但 ODN-KDEA 的反义活性与非缀合 ODN 相同. Arar 等^[13]将信号肽 KDEL 和 HIVgag mRNA 的反义序列共价结合, 测定该缀合物对感染了 HIV-1 的患者外周血单核细胞中病毒的抑制作用, 结果表明, 以硫醚键结合的缀合物的 IC_{50} = $(0.61 \pm 0.03) \mu\text{mol/L}$, 以二硫键结合的缀合物的 IC_{50} = $(1.80 \pm 0.14) \mu\text{mol/L}$, 未和肽缀合的 ODN 的 IC_{50} > 5 μmol/L.

Chaloin 等^[6]设计合成了多个两亲性肽段, 并用不同长度的连接分子将肽与 ODN 相连, 发现连接分子的大小对缀合物的核内定位具有一定的影响. 将内化能力最强的肽与 L 型钙离子通道 β 亚单位的反义序列共价结合, 缀合物和 HgC2 心肌细胞一起温育, 以研究其对 Ca^{2+} 离子通道的抑制作用, 和对照组 (未和肽缀合的 ODN) 相比, 缀合物的内化得到改善, 用缀合物处理后细胞的电流密度是对照组的 1/7.

Reed 等^[19]合成了钙调素 mRNA 的反义序列, 其 5' 位与 SV40 大 T 抗原等的 NLS 序列缀合后, 研究了缀合物对纤毛虫运动的影响, 将缀合物用电穿孔法注入细胞后, 未见对纤毛虫运动的抑制作用, 而 3' 位用己醇保护的反义寡核苷酸却对纤毛虫的运动产生抑制作用.

4 结 论

无论是作为分子生物学研究工具还是作为潜在药物, 肽缀合寡核苷酸都具有良好的发展前景. 在

过去的几年中, 肽-寡核苷酸缀合物的合成方法得到了长足发展, 但存在保护基不兼容、合成产率低等问题, 迫切需要发展与肽、寡核苷酸合成兼容的保护方案, 以高收率地制备缀合物, 满足分子生物学及药学研究的需要。由于信号肽、融合肽及其他肽序列介导跨膜转运的确切机制尚不清楚, 因此目前尚无普遍接受的用于 ODN 跨膜与核靶向转运的缀合肽设计和选择标准。同时由于各种细胞的膜结构及胞浆、核内组成的不同, 需对不同的细胞选择不同的转运肽序列。在肽缀合反义寡核苷酸的生理化学性质及反义活性研究方面, 特别是有关动物实验的研究工作报道较少。因此, 将肽缀合寡核苷酸应用于生物学研究并最终发展为实用的临床药物, 需要合成化学、药物化学及生物学领域的研究工作者共同努力。

参 考 文 献

- White J M. Membrane fusion. *Science*, 1992, **258** (5084): 917~ 924
- Soukchareun S, Tregear G W, Harslambidis J. Preparation and characterization of antisense oligonucleotide peptide hybrids containing viral fusion peptides. *Bioconjugate Chem*, 1995, **6** (1): 43~ 53
- Bongartz J P, Aubertin A M, Milhaud P G, *et al.* Improved biological activity of antisense oligonucleotides conjugated to a fusogenic peptide. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (22): 4681~ 4688
- Pichon C, Arar K, Stewart A J, *et al.* Intracellular routing dna inhibitory activity of oligonucleopeptides containing a KDEL motif. *Mol Pharmacol*, 1997, **51** (3): 431~ 438
- De la Torre B G, Albericio F, Saiso-Belmoaras E, *et al.* Synthesis and binding propertise of oligonucleotides containing nuclear location sequences. *Bioconj Chem*, 1999, **10** (6): 1005~ 1012
- Chaloin L, Vidal P, Lory P, *et al.* Design of carrier peptide-oligonucleotide conjugates with rapid membrane translocation and nuclear localization properties. *Biochem Biophys Commun*, 1998, **243** (2): 601~ 608
- Derossi D, Calvet S, Trembleau A, *et al.* Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem*, 1996, **271** (30): 18188~ 18193
- Tung C H, Wang J, Leibowitz M J, *et al.* Dual-specific interaction of HIV-1 TAR RNA with Tat peptide-oligonucleotide pairs. *Bioconj Chem*, 1995, **6** (3): 292~ 295
- Tung C H. Preparation and application of peptide-oligonucleotide conjugates. *Bioconj Chem*, 2000, **11** (5): 605~ 618
- Antopolsky M, Azhayeva E, Tengvall U, *et al.* Peptide-oligonucleotide phosphorothioate conjugates with membrane translocation and nuclear localization properties. *Bioconj Chem*, 1999, **10** (4): 598~ 606
- Harrison J, Balasubramanian S. Synthesis and hybridization analysis of a small library of peptide-oligonucleotide conjugates. *Nucleic Acid Res*, 1998, **26** (13): 3136~ 3145
- Wei Z, Tung C H, Zhu T, *et al.* Synthesis of oligoarginine-oligonucleotide conjugates and oligoarginine-bridged oligonucleotide pairs. *Bioconj Chem*, 1994, **5** (5): 468~ 474
- McMinn D L, Greenberg M M. Convergent solution-phase synthesis of a nucleotide using a protected oligonucleotide. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, **9** (4): 547~ 550
- Tetzlaff C N, Schwöpe I, Blecziński F, *et al.* A convenient synthesis of 5'-deoxythymidine and preparation of peptide-DNA hybrids. *Tetrahedron Lett*, 1998, **39** (24): 4215~ 4218
- Juby C D, Richardson C D, Brousseau R. Facile preparation of 3'-oligonucleotide peptide conjugates. *Tetrahedron Lett*, 1991, **32** (7): 879~ 882
- Napoli D L, Messere A, Montesarchio D, *et al.* A new solid-phase synthesis of oligonucleotides 3'-conjugated with peptides. *Bioorg Med Chem*, 1999, **7** (2): 395~ 400
- Peyrottes S, Mestre B, Burlina F, *et al.* The synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates by a fragment coupling approach. *Tetrahedron*, 1998, **54** (41): 12513~ 12522
- Eritja R, Pons A, Escarcellia M, *et al.* Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence. *Tetrahedron*, 1991, **47** (24): 4113~ 4120
- Reed M W, Fraga D, Schwartz D E, *et al.* Synthesis and evaluation of nuclear targeting peptide-antisense oligonucleotide conjugates. *Bioconj Chem*, 1995, **6** (1): 101~ 108
- Haralambidis J, Duncan L, Tregear G M. The solid phase synthesis of oligonucleotides containing a 3'-peptide moiety. *Tetrahedron Lett*, 1987, **28** (43): 5199~ 5202
- Alliquant B, Hantraye P, Mailleux P, *et al.* Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth *in vitro*. *J Cell Biol*, 1995, **128** (5): 919~ 927
- Astriab-Fisher A, Sergueev D S, Fisher M, *et al.* Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide-oligonucleotide conjugates. *Biochem Pharm*, 2000, **60** (1): 83~ 90

Synthesis and Properties of Peptide-oligonucleotide Conjugates

CHEN Chang-Po, MIN Ji-Mei, ZHANG Li-He*

(National Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract Antisense-oligonucleotide can be employed as gene expression inhibitor and potential therapeutic agents. However, many classes of oligonucleotide are polyanion and cannot penetrate cell membrane. It is known that several peptides, including fusion peptide and signal peptide, have the properties of transmembrane and/or cell nucleus localization. The synthesis and biological activity of antisense oligonucleotide-peptide conjugates are discussed.

Key words antisense oligonucleotide, fusion peptide, signal peptide, synthesis, peptide-oligonucleotide conjugate

* Corresponding author. Tel: 86-10-62091570, E-mail: zdszlh@mail.bjmu.edu.cn

Received: January 5, 2001 Accepted: January 20, 2001