

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Tõnis Lehto

**Rakku siseneva peptiidi, PepFect14, funktsionaliseerimine PEG  
polümeeriga ning tema rakendamine oligonukleotiidide  
transpordiks koos PepFect6-ga**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendaja(d): Prof. Ülo Langel

Kaitsmisele lubatud .....

Juhendaja .....

*alkiri, kuupäev*

Tartu 2014

## Sisukord

|   |    |
|---|----|
| Kasutatud lühendid.....   | 3  |
| Sissejuhatus .....  | 4  |
| 1. Kirjanduse ülevaade .....  | 6  |
| 1.1. Valdkonna kirjeldus .....  | 6  |
| 1.1.1. Nukleiinhapete transport .....   | 6  |
| 1.1.2. Ekstra- ja intratsellulaarsed barjäärid nukleiinhapete transpordil.....                              | 8  |
| 1.1.3. Ekstra- ja intratsellulaarsete barjääride ületamine transportvektorite<br>modifitseerimise abil..... | 9  |
| 1.1.4. Rakku sisenevad peptiidid .....  | 11 |
| 1.1.5. Nukleiinhapete vektoriseerimine rakku sisenevate peptiididega.....                                   | 12 |
| 1.1.6. Rakku sisenevad peptiidid PepFect6 ja PepFect14.....   | 13 |
| 1.2. Peptiidide sünteesimine .....  | 14 |
| 1.2.1. Tahkel kandjal peptiidisüntees .....   | 14 |
| 1.3. Peptiidide puhastamine ja massispektromeetria .....  | 17 |
| 1.3.1. Pöördfaasi kõrgrõhu-vedelikkromatograafia (RP-HPLC) .....  | 17 |
| 1.3.2. MALDI-TOF massispektromeetria.....   | 17 |
| 1.4. Nanopartiklite moodustamine ja karakteriseerimine.....   | 18 |
| 1.4.1. Mittekovalentne komplekseerimismeetod .....  | 18 |
| 1.4.2. Geelelektroforees .....  | 18 |
| 1.4.3. Nanopartiklite suurus ning $\zeta$ -potentsiaal.....   | 19 |
| 1.4.4. siRNA transport rakku ning selle hindamine .....   | 20 |
| 2. Eksperimentaalne osa .....   | 21 |
| 2.1. Töö eesmärgid: .....   | 21 |
| 2.2. Peptiidide süntees, puhastamine ning identifitseerimine.....   | 21 |
| 2.3. Komplekside moodustamine ning visualiseerimine .....   | 24 |
| 2.4. Komplekside füsikokeemiliste omaduste uurimine.....  | 25 |
| 2.5. Geeni vaigistamine rakukultuuris .....   | 26 |
| 3. Tulemused ja arutelu .....   | 28 |
| Kokkuvõte .....   | 37 |
| Summary .....   | 38 |
| Kasutatud kirjanduse loetelu .....  | 39 |
| Lisad .....   | 43 |
| Lihtlitsents .....  | 48 |

## Kasutatud lühendid

|               |  |
|---------------|--|
| AcN           | atseetonitril  |
| DCM           | diklorometaan  |
| DIEA          | diisopropüületüülamiin   |
| DLS           | footonkorrelatsioon spektroskoopia ( <i>dynamic light scattering</i> , ingl. k)      |
| DMF           | dimetüülformamiid  |
| EtBr          | etiidiumbromiid  |
| FBS           | veise looteserum ( <i>fetal bovine serum</i> , ingl. k)                              |
| Fmoc          | 9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüül rühm  |
| HBTU          | N-(1)-N-metüül-<br>metaanamiinium heksaflorofosfaat N-oksiid                         |
| HF            | vesinikfluoriidhape  |
| HOBt          | 1-hüdroksübensotriasool  |
| MALDI-TOF     | maatriks-assisteeritud laserdesorptsioonionisatsioon-lennuaja<br>massispektromeetria |
| MBHA          | 4-metüülbenshüdrüülamiin   |
| MPS           | mononukleaarsete fagotsüütide süsteem  |
| NH            | nukleiinhape   |
| ON            | oligonukleotiid  |
| pDNA          | plasmiidne DNA   |
| PEG           | Polüetüleen glükool  |
| PF6           | PepFect6   |
| PF14          | PepFect14  |
| RP-HPLC       | pöördfaas-vedelikkromatograafia  |
| RSP           | rakku sisenev peptiid  |
| siRNA         | väike interfereeruv RNA ( <i>small interfering RNA</i> , ingl. k)                    |
| SKO           | splaissingut korrigeeriv oligonukleotiid   |
| <i>t</i> -Boc | tert-butüüloksükarbonüül rühm  |
| TFA           | trifluoroatseethape  |
| TIS           | triisopropüülsilaan  |
| U87           | inimese glioblastoomi rakud ( <i>human glioblastoma cells</i> , ingl. k)             |

## Sissejuhatus

Seoses inimgenoomi täieliku sekveneerimisega on leitud märkimisväärselt palju uusi potentsiaalseid ravimsihtmärke. Enamasti asuvad need märklauad raku sisemuses ning nende mõjutamiseks mõeldud biomakromolekulid nagu näiteks valgud ja nukleiinhapped pole oma füsikokeemiliste omaduste tõttu võimelised ise bioloogilisi membraane ületama ja seega ka oma toimkohale jõudma. Lisaks on need molekulid oma bioloogilisest päritolust tulenevalt immuunsüsteemi poolt ära tuntavad ning sihtmärgiks neid lagundavatele ensüümidele, mis kõik vähendab nende biosaadavust ning seega ka võimalikku ravitoimet. Selleks, et sedalaadi molekulid jõuaksid efektiivselt oma toimekohani, vajavad nad transportvektorite abi.

Nukleiinhapete transpordis kasutatavad transportvektorid jagatakse kahte gruppi: viraalsed ning mitteviraalsed vektorid. Viraalsed vektorid on oma olemuselt äärmiselt efektiivsed geneetilise materjali toimetamiseks rakkudesse, aga nende kasutamine on kõrvaltoimete tõttu piiratud. Lisaks pole need põhimõtteliselt kasutatavad sünteetiliste oligonukleotiidide transpordiks ning samuti on geneetilise informatsiooni hulk, mida viirustesse saab mahutada, piiratud. Seega on aina rohkem hakatud tähelepanu pöörama mitteviraalsetele alternatiividele, mis valdavalt baseeruvad erinevatel katioonsetel lipiididel, polümeeridel või peptiididel, sealhulgas rakku sisenevatel peptiididel. Nende kõigi ühiseks nimetajaks on, et nad on võimelised moodustama nukleiinhapete ja nende analoogidega nanomõõtmetes osakesi ehk nanopartikleid.

Paraku on nanoosakestele omane, et immuunsussüsteem püüab organismi nendest puhastada ning see vähendab oluliselt nende poolväärtusaega suures vereringes ja seega ka biosaadavust. Nende soovimatute interaktsioonide vältimiseks on laialdaselt kasutusel hüdrofiilse kuid neutraalse polümeeri, polüetüleen glükooli (PEG), lisamine osakeste pinnale ehk PEGüleerimine. PEG moodustab osakese pinnale hüdrofiilse kihi, mis aitab neutraliseerida osakese pinnal olevat laengut ning lisaks pakub steerilist kaitset verekomponentide eest.

Käesolev töö on keskendunud rakku sisenevatele peptiididele (RSP). RSP-d on definitsiooni kohaselt kuni 40 aminohappest koosnevad katioonsed ja/või amfipaatsed peptiidid ning nad on võimelised transportima rakkude sisemusse erinevat tüüpi bioaktiivseid molekule. RSP-de üheks oluliseks eeliseks teiste mitteviraalsete vektorite ees on nende madal toksilisus.

Antud töö eesmärgiks oli sünteesida PEG-ga modifitseeritud PepFect14 RSP ning uurida PEGüleerimise mõju lühikeste nukleiinhapete transpordile, kas üksi või koos teise RSP, PepFect6-ga.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Valdkonna kirjeldus

Ühe suurima biomeditsiinilise saavutusena on inimgenoomi täielik sekveneerimine [1] oluliselt süvendanud meie teadmisi haiguste geneetilistest põhjustest. Need uued teadmised on viinud mitmete uute meetodite välja arendamiseni, millega on võimalik mõjutada haigust tekitavate geenide aktiivsust molekulaarsel tasandil. Kasutades nukleiinhappeid (NH) ning nende sünteetilisi oligonukleotiidseid analooge (ON) saab taastada, vaigistada või korrigeerida geenide ekspressiooni ning antud valdkonda kutsutakse geeniteraapiaks. Paraku pole need nukleiinhapetel põhinevad makromolekulid tänu oma suurusele ja kõrgele laengule võimelised ise bioloogilisi membraane läbima ning oma toimekohani jõudmiseks vajavad nad transportvektorite abi.

### 1.1.1. Nukleiinhapete transport

Nukleiinhapete transpordiks kasutatavad vektorid jagunevad tinglikult kahte rühma: viiruslikud ja mitteviiruslikud vektorid. Viiruslikud vektorid on juba oma olemuselt väga efektiivsed geneetilise materjali transportimiseks raku tuuma ning lisaks sellele on nende poolt vahendatud geeniekspressioon rakkudes pikaajaline ning ühtlane. Nendest omadustest tulenevalt on nad ka kõige laialdasemat rakendust leidvad transportvektorid klassikalises geeniteraapias ning aktiivselt uurimise all ka paljudes kliinilistes uuringutes [2]. Samas kaasnevad viiruslike vektorite päritoluga nende rakendamisele ka mitmed piirangud. Esmalt on viiruste kasutamine seotud tugevate immunoloogiliste kõrvaltoimetega ning ohtudega on seotud ka mitmete viiruste võime integreeruda peremeesorganismi genoomi [3-5]. Teiseks on geneetilise informatsiooni hulk, mida spetsiifilisse viirusesse saab sisestada, viiruse enda genoomi suurusega piiratud. Vähem oluline ei ole ka fakt, et ravimitena kasutatavate viiruste valmistamine vajaliku kliiniliselt sobiva kvaliteediga on väga töömahukas [6]. Viraalsete vektorite ohutusega seotud probleemide tõttu on viimasel ajal üha intensiivsemalt uuritud erinevaid mitteviraalseid alternatiivseid meetodeid, eriti lühikeste sünteetiliste oligonukleotiidide transpordiks, mille jaoks viraalsed vektorid ei ole kohaldatavad.

Mitteviraalsed meetodid jagunevad oma olemuselt füüsikalisteks ja keemilisteks meetoditeks. Füüsikaliste meetodite hulka kuuluvad näiteks mikroinjektsioon ja elektroporatsioon, mis on küll üsna efektiivsed rakukultuurides, aga kliinilistes uuringutes rakendamiseks kas liiga keerukad või ohtlikud. Keemilised meetodid on muutumas ühe atraktiivsemaks, kuna

süntetiline keemia võimaldab neid vektoreid üsna lihtsasti toota suurtes kogustes ning kliinilisest aspektist kõrget kvaliteeti silmas pidades. Süntetiline lähenemine tähendab ka seda, et selliseid vektoreid on lihtne edasi arendada ja modifitseerida, et parandada ravimite bioloogilist saadavust ning spetsiifilisust üha enam.

Enamik ON-de vektoriseerimiseks mõeldud mitteviraalseid platforme põhineb katioonsete lipiidide, polümeeride, peptiidide või anorgaaniliste nanoosakeste võimel komplekseerida või oma pinnale siduda kargomolekule, jäädes seejuures nanomõõtmetesse [7]. Alternatiivina arendatakse ka kovalentselt konjugeeritud transportvektor-ON molekule, mis on kliinilisest vaatenurgast eelistatum, kuna antud molekuli keemiline koostis on defineeritud. Paraku on vastasmärgiliselt laetud domäänidega konjugaate raske puhastada ning nende molekulide agregeerumist praktiliselt võimatu takistada. Lisaks ei piisa ON-i negatiivsete laengute neutraliseerimiseks vaid ühest katioonsest vektormolekulist [8] ning seega on kovalentne vektoriseerimismeetod piiratud neutraalsete ON-de nagu peptiidsidemega nukleiinhapete (PNA-de) ja fosfordiamidaat morfoliino ONde (PMO-de) kasutamisega.

Laetud ON-de puhul kasutatakse siiski enamasti mittekovalentset komplekseerimismeetodit, kus osakeste moodustumine sõltub negatiivselt laetud ON ja positiivselt laetud katioonsete lipiidide, polümeeride või peptiidide vahelistest elektrostaatilistest interaktsioonidest. Lisaks aitavad moodustunud komplekse stabiliseerida ka hüdrofoobsed interaktsioonid ning vesiniksidemed. ON-de raku transportimiseks on toodud näidetest kliinilistes uuringutes enim kasutamist leidnud erinevad liposoomid. Liposoomid on lipiidse kaksikkihiga uni- või multilamellaarsed vesiikulid. Tänu katioonsetele lipiididele võimaldavad nad endasse kapseldada negatiivselt laetud nukleiinhappeid, vähendades nii nende kättesaadavust nukleasidele ning parandades seega ON-de biosaadavust. Samal ajal võimaldavad liposoomid ka hüdrofoobsete molekulide transporti lipiidises kaksikkihis. Liposoomide eelisteks on nende odavus, lihtne valmistatavus ning modifitseeritavus [9]. Liposomaalsete transfektsiooni reagentide negatiivseks küljeks on nende toksilisus nii rakukultuurides [10], kui ka *in vivo*.

Katioonsed polümeerid on grupp mitteviraalseid vektoreid, mis on leidnud laialdast kasutust ON-de transpordis, nii *in vitro* kui ka *in vivo* tingimustes. Katioonsed polümeeridest kasutatakse nii lineaarse kui hargnenud ahelaga struktuure, mis baseeruvad näiteks polüetüleenimiinil (PEI) [11], polü-L-lüsiinidel, polü-L-ornitiinidel [12], kuid ka erinevate generatsioonidega polüamidoamiin (PAMAM) dendrimeeridel [13]. Lisaks süntetilistele

polümeeridele kasutatakse nukleiinhapete transpordiks ka looduslikel polümeeridel nagu tsüklodekstriinil [14] ja polü-D-glükoosamiinil (*Chitosan*) [15] põhinevaid molekule. Paraku on traditsiooniliste polümerisatsiooni meetodite teel saadavad polümeerid nii oma suuruselt kui struktuuri poolest väga heterogeensed ning see limiteerib nende potentsiaalset kasutamist kliinilistes rakendustes.

Lisaks vajavad mainimist ka orgaanilistel ja anorgaanilistel nanostruktuuridel põhinevad mitteviraalsed transportvektorid, mis võimaldavad samaaegselt ravimite transporti kui nende visualiseerimist reaalajas ehk teranostikat. Näidetena võib ära tuua süsiniknanotorudel [16], metallioksiididest koosnevatest magnetilistest nanoosakestel [17], raskemetalle mitte sisaldavatel pooljuhtidest kvantpunktidel [18] ning kulla nanoosakesed [19] põhinevaid transportersüsteeme. Kuna neid vektoreid kasutatud alles väga lühikest aega, siis nende tõelisest potentsiaalist arusaamiseks tuleb neid veel sügavuti uurida.

### **1.1.2. Ekstra- ja intratsellulaarsed barjäärid nukleiinhapete transpordil**

Nukleiinhapete transport oma toimekohale rakkude sisemuses on väga väljakutsete rohke protsess. Selleks, et jõuda oma sihtmärkkudede või -rakkudeni peavad NH/vektor nanopartiklid ületama mitmeid rakuväliseid ja -siseseid barjääre. Esiteks on transportsüsteemide saatus väga tihedalt seotud nende füsikokeemiliste omadustega nagu suurus, pinnalaeng, kolloidne stabiilsus ning suurusjaotus. Teiseks, kuna tegemist on organismi jaoks võõrkehade, siis organismil on nende vastu mitmeid kaitsesüsteeme nagu mononukleaarsete fagotsüütide süsteem (*MPS – mononuclear phagocyte system*). MPSi poolt läbi viidavas osakeste elimineerimises osalevad põhiliselt maksas ja põrnas asuvad makrofaagid ehk õgirakud, mis tunnevad ära võõrkehadele seonduvaid/opsoniseeruvaid proteiine ja antikehi ehk opsoniine. Eelistatult seonduvad opsoniinid tugevamini laetud osakestele ning vähem neutraalsetele osakestele [20]. Lisaks, filtreeritakse väiksemad osakesed neerude poolt, mis vähendab nende poolväärtusaega suures vereringes [21]. Kolmandaks peavad need osakesed ekstravaseeruma läbi veresoonte seinte rakkudevahelisse ekstratsellulaarsesse maatriksisse, kust edasi on võimalik jõuda sihtmärk rakkudeni. Neljandaks tuleb NH/vektor nanopartiklil ületada rakumembraan. Selleks seostuvad osakesed rakumembraaniga ning kasutavad enamasti rakku sisenemiseks erinevaid endotsütoosi mehhanisme. Endotsütoosi järgselt on osakesed küll raku sisemuses, kuid neid ümbritseb rakumembraani lipiididest ja valkudest moodustunud vesiikul ehk endosoom, mille pH on madalam, kui raku tsütoplasmas. Olenevalt transporditavate nukleiinhapete

toimekohast peavad osakesed endosoomidest vabanema erinevates kohtades raku sees. Näiteks käesolevas töös kasutatud siRNA-de transpordil peavad osakesed vabanema endosoomidest võimalikult kiiresti kuna nende toimekoht asub tsütosoolis. Plasmiidse DNA (pDNA) ja spalissingut korrigeerivate oligonukleotiidide (SKO-de) puhul nii kiire endosoomidest vabanemine aga vajalik pole, kuna nende toimekoht asub tuumas. Tuuma ümbritseb kahekihiline lipiidne membraan, mis nende molekulide puhul on täiendavaks rakusiseseks barjääriks. Endosoomidest vabanemist peetakse mitteviraalses transpordis kõige olulisemaks biosaadavust limiteerivamaks faktoriks. Lõpuks on ka oluline, et jõudes oma toimekohale peab toimuma NH molekulide vabanemine nanopartiklitest, et nad saaksid avaldada oma farmakoloogilist toimet [22]. Seega on mitteviraalsetel vektoritel põhinev nukleiinhapete transport äärmiselt kompleksne protsess ning uute vektorite disainimisel tuleb kõikide nende faktoritega arvestada.

### **1.1.3. Ekstra- ja intratsellulaarsete barjääride ületamine transportvektorite modifitseerimise abil**

Nagu eelpool mainitud omavad NH/vektor nanopartiklite füsioloogilised omadused olulist rolli nende käitumisele *in vivo* tingimustes. Esiteks, osakeste optimaalseks suuruseks peetakse üldiselt vahemikku 5-250 nm ning suurus on üks olulisi parameetreid, mis mõjutab nende jaotumist erinevate kudede vahel. Näiteks on teada, et alla 10 nm suurused osakesed püsivad vereringes väga lühikest aega ning valdavalt sekreteeritakse koheselt läbi neerude uriini, kuigi samal ajal läbivad väikesed osakesed efektiivsemalt veresoonte seinu. Samas esinevad osade organite nagu neerude, maksa veresoonte endoteelkoos poorid, mille diameeter võib ulatuda 50-100 nm, mis aitab ka keskmise suurusega osakestel jõuda sihtmärgini [21, 23]. Lisaks on kasvajate puhul näidatud, et kasvajates on makromolekulide ja nanoosakeste akumulatsioon kõrgem kui teistes kudedes, kuna neis on vaskulatuur ülearenenud ning lümfisüsteem alaarenenud, mis võimaldab kuni 400 nm osakestel akumulereuda ka sinna [24]. Vastavat nähtust kutsutakse EPR efektiks (*Enhanced Permeability and Retention effect*) [25, 26].

Teiseks on oluline osakeste pinnalaeng ehk  $\zeta$ -potentsiaal, mis peaks nanopartiklite puhul jääma vahemikku -30 mV-st kuni 30 mV-ni [22]. Seda kahel põhjusel: esiteks, kuna suuremate pinnalaengute korral on vesilahustes dispergeeritud nanopartiklid kolloidselt liiga stabiilsed ning teiseks, saavad kõrgemate pinnalaengute puhul opsoniinid tänu elektrostaatilistele interaktsioonidele nanopartiklitele paremini seonduda, mille tulemusena

elimineeritakse need fagotsütoosi teel kiiremini [20]. Opsoniseerimise vältimiseks peavad osakesed olema võimalikult neutraalse pinnalaenguga, mis põhjustab aga osakeste agregatsiooni.

Üks võimalus sellistest ebasoodsatest interaktsioonidest vabanemiseks ning nukleiinhapete biosaadavuse parandamiseks on NH/vektor nanopartiklite pinna modifitseerimine hüdrofiilsete polümeeridega nagu polüetüleen glükool (PEG). PEGi ahelad pakuvad osakestele seonduvate valkude eest steriilist kaitset, vähendades valkude adsorptsiooni osakeste pinnale kuni 80% [27]. Lisaks moodustub PEGi ahelatele seonduvatest vee molekulidest osakeste pinnale veekiht, mis aitab neutraliseerida osakeste pinnalaengut pikendades nii nende poolväärtusaega vereringes. Seejuures bioloogilisest aspektist on optimaalseima suurusega PEG-d molekulmassiga vahemikus 500-5000 Da [28-31]. PEGüleerimise kasutamise juures tuleb arvestada, et samamoodi nagu PEG takistab valkude seondumist osakeste pinnale takistab ta ka nanopartiklite seondumist rakkude ning võimet endosoomidest vabaneda, mis alandab transportvektori efektiivsust rakkudesse sisenemisel [32]. Seega on optimaalne osakeste PEGüleerimisaste sellises vahemikus, kus valkude adsorptsioon osakestele on võimalikult madal, bioloogiline aktiivsus rakkudes kõrge ning poolväärtusaeg vereringes võimalikult pikk.

Nii nagu eelpool mainitud, peavad NH/vektor nanopartiklid jõudma oma toimekohale sihtmärkkudede ja -rakkude sisemuses. Üheks võimaluseks, et suunata selliseid osakesi spetsiifilistesse toimekohtadesse, võib transportvektoritele lisada sihtmärkrakkude pinnal olevatele retseptoritele spetsiifilisi ligande nagu antikehi, peptiide, proteiine, muid keemilisi ühendeid jne [6]. Seejuures tuleb arvestada, et täiendav osakeste ligandidega modifitseerimine võib mõjutada nende füsioloogilisi omadusi. Enam-jaolt kombineeritakse sellist lähenemist PEGüleerimisega, kuna PEG-ide lisamine võimaldab vähendada vektorist tulenevaid ebaspetsiifilisi interaktsioone ning aidata paremini presenteerida kasutatavat koespetsiifilist ligandi.

Rakumembraani läbimisel jõuavad NH/vektor osakesed endosoomidesse, mis muutuvad ajapikku lüsoosoomideks, kus degradeeritakse nukleiinhapped vastavate ensüümide poolt. Endosoomidesse kinnijäämist peetaksegi mitteviraalse transpordi põhiliseks biosaadavust limiteerivaks etapiks. Endosoomidest vabanemiseks kasutatakse enamasti endosomolüütilisi reagente nagu klorokviin, mille toimemehhanism põhineb endosoomides oleva happelise keskkonna (pH=5,5-6,5; lüsoosoomides pH=4,5-5,5) puhverdamises. See põhjustab

endosoomide osmootset paisumist, mille tagajärjel endosoomid lõhkevad ning nende sisu vabaneb tsütoplasmasse [33]. Sellisel pH-st sõltuval alusete protoneerumisel põhineb ka mitmete erinevate mitteviraalsete vektorite endosoomidest vabanemise mehhanism (näiteks erinevad PEI-d). Teiseks laialt kasutatavaks võimaluseks on vektorite modifitseerimine hüdrofoobsete ainetega, näiteks erinevate rasvhapetega, mis võimaldaksid suurendada interakteerumist endosoomide membraaniga ning seeläbi suurendada endosoomidest vabanemist. Näiteks on rakku sisenevate peptiidide puhul edukalt kasutatud nende N-terminaalset lipideerimist steariinhapetega, mis võimaldas oluliselt parandada nukleiinhapete transporti rakkudesse [34-36].

#### 1.1.4. Rakku sisenevad peptiidid

Üks grupp mitteviraalseid vektoreid, mida on viimasel kahel aastakümnel edukalt kasutatud nukleiinhapete transpordiks, on rakku sisenevad peptiidid (RSP-d). Definitsiooni kohaselt on RSP-d katioonsed ja/või amfipaatilised 5-40 aminohapest koosnevad peptiidid, mis on võimelised transportima nendega kovalentselt või mittekovalentselt seotud kargomolekule rakkude sisemusse [37]. Enamasti kasutavad RSP-d rakku sisenemiseks erinevaid endotsütootilisi teid [37]. RSP-de eeliseks teiste mitteviraalsete transportvektorite ees on nende madal toksilisus ja kõrge transpordiefektiivsus, mis teeb neist perspektiivikad transporvektorid nukleiinhapetel baseeruvatele potentsiaalsetele ravimolekulidele [38].

Enne RSP-de avastamist 1988. aastal oldi arvamisel, et peptiidid ja valgud pole tänu oma hüdrofiilsele iseloomule ning suurele molekulmassile võimelised ise rakumembraane läbima. See teadmine lükati ümber kahe grupi poolt, kes teineteisest sõltumatult avastasid, et inimese immuunpuudulikkust põhjustava viiruse (HIV-1) transkriptsiooni transaktivaator (Tat) proteiin on võimeline translokeeruma läbi rakumembraani [39, 40]. 1991. aastal näitas A. Prochiantzi grupp, et 60 aminohapest koosnev homeodomään *Drosophila Antennapedia* valgust on võimeline ületama rakumembraani [41]. Kolm aastat hiljem kinnitas sama grupp, et efektiivsuse säilitamiseks piisab vaid 16 aminohappelisest järjestusest *Drosophila Antennapedia* valgu homeodomääni kolmandas heeliksis [42]. Vastava peptiidi nimeks on penetratiin (pAntp) ning seda peetakse RSP-de kui eraldiseisva valdkonna alguseks. Viimase 20 aasta jooksul on seda valdkonda käsitlevate tööde hulk kasvanud eksponentsiaalselt ning avastatud on sadu erineva päritoluga RSP-sid.

Kuigi rakku sisenevaid peptiide on uuritud 20 aastat, pole endiselt konsensust, milliseid sisenemismehhanisme RSP-d rakumembraani läbimiseks kasutavad ning kuhu nad raku sees

jõuavad. Üldine arusaam on, et kargomolekulidega seotuna kasutavad RSP-d rakku sisenemiseks erinevaid energias sõltuvaid endotsütoosi teid. Endotsütoosi kasutamist kinnitab fakt, et endosomolüütilise reagentide lisamine kargo/RSP kompleksidele või kovalentselt seotud RSP-le parandab nende poolt transporditud nukleiinhapete bioloogilist efekti rakukultuuris [43-45]. Samas ei saa välistada ka otsest rakumembraani läbimist, kuna esineb juhtumeid, kus kargo/RSP osakesed sisenevad rakkudesse endotsütoosist sõltumata [46]. Seega sõltub RSP-de sisenemismehhanism kasutatavast RSP-st, selle kontsentratsioonist, kargomolekulidest ning nende sidumismeetodist, rakuliinist, katsetingimustest ning pole välistatud, et RSP-d kasutavad rakkudesse sisenemiseks mitut mehhanismi paralleelselt.

### **1.1.5. Nukleiinhapete vektoriseerimine rakku sisenevate peptiididega**

Nukleiinhapete vektoriseerimiseks RSP-dega on võimalik kasutada kahte strateegiat: kovalentset ja mittekovalentset. Kovalentse strateegia puhul on kargo molekul seotud RSP-le kovalentse sidemega, näiteks disulfiid- või peptiidsidemega. Mittekovalentne strateegia põhineb negatiivselt laetud nukleiinhapete suhkur-fosfaat selgroo ja positiivselt laetud peptiidide aminorühmade vahelistel elektrostaatilistel interaktsioonidel, mille tagajärjel komplekseeritakse nukleiinhapped nanomõõtmeter osakestesse. Mõlemal meetodil on nii positiivseid kui negatiivseid külgi, näiteks, kliinilise rakendatavuse seisukohast on kovalentset strateegiat eelis, kuna tegu on keemiliselt defineeritud sturktuuriga. Samas saab seda rakendada ainult neutraalselt laetud nukleiinhapete nagu PMO-de ja PNA-de puhul, mis limiteerib selle meetodi ainult lühikeste NH-de kasutamisele. Lisaks on kovalentsete konjugaatide süntees kulukam, töömahukam, aega nõudev ning saagis on madalam. Mittekovalentse strateegia eelisteks on selle lai rakendusala ning kasutatavuse lihtsus, mis seisneb RSP-de ja NH-de segamisel erinevatel laengu või molaarsuhetel. Esmalt tutvustati mittekovalentset strateegiat Morrise jt poolt 1997. aastal [47] ning sellest ajast peale on see meetod leidnud rakendust paljude erinevat tüüpi bioaktiivsete molekulide nagu pDNA, siRNA, SKO, peptiidide ja valkude transpordiks. Nukleiinhapete puhul on näidatud, et lisaks elektrostaatilistele interaktsiooni mängivad osakeste moodustumisel ja stabiliseermisel rolli ka hüdfoobsed interaktsioonid [36]. Käesolevas töös on rakendatud mittekovalentset strateegiat.

### 1.1.6. Rakku sisenevad peptiidid PepFect6 ja PepFect14

PepFectide seeriasse kuuluvate peptiide eelkäijaks on transportaan (TP) ning tema analoogid. Transportaani näol on tegu 27 aminohappest koosneva kimäärse peptiidiga, mille 12-aminohappeline N-terminaalne järjestus on võetud neuropeptiid galaniinist ning 14-aminohappeline C-terminaalne järjestus vapsiku toksiinist mastoparaan, mis on omavahel ühendatud üle lüsiini [48]. Otsimaks rakku sisenemise eest vastutavat järjestust sünteesiti terve hulk TP analooge. TP10 on transportaani 10. analoog, mis on N-terminaalselt 6 aminohappe võrra transportaanist lühem, olles sama aktiivne kuid vähem toksiline [49]. Selleks, et parandada TP10 võimet transportida temaga mittekovalentselt seotud nukleiinhappeid modifitseeriti TP10 N-terminaalselt rasvhappe steariinhapega, mille tulemusena saadi RSP PepFect3. Tänu rasvhappe lisamisele paranes oluliselt TP10 võime transportida rakkudesse pDNA-d kui ka SKO-de transporti ning mõjutada vastavate geenide ekspressiooni [34, 35]. Lisaks näitasid PepFect3/pDNA nanopartiklid TP10/pDNA omades kõrgemat stabiilsust [35]. Seoses PepFect3 madala aktiivsusega siRNA-de transpordil, mis tuleneb PF3/siRNA komplekside endosoomidesse kinni jäämisest, modifitseeriti PepFect3 endosomolüütilise triflorometüülkvinoliini derivaadiga. Selleks lisati PepFect3 7. lüsiini  $\epsilon$ -aminorühmale kolmest lüsiinist koosnev lüsiinipuu, millele seoti üle suktsiinhappe 4 triflorometüülkvinoliini derivaati. Saadud peptiid, PepFect6, oli võrreldes PepFect3-st kuni 70% efektiivsem geeni siRNA-ga vaigistamisel rakukultuuris. Lisaks vahendasid PepFect6/siRNA nanopartiklid siRNA doosil 1 mg/kg intravenoosel manustamisel hiirtes üle 60%-list geenivaigistamist maksas [44]. Samal aastal tuldi välja ka teise PepFect3 analoogiga PepFect14, kus võrreldes eelkäijaga on lüsiinid ja isoleutsiinid vahetatud vastavalt ornitiinide ja leutsiinide vastu. Lüsiinide asendamisel ornitiinidega on näidatud, et see võib erinevates rakuliinides tõsta transfektsiooni efektiivsust kuni 10 korda [50]. On võimalik, et PepFect14 kõrge aktiivsus võib olla seotud ornitiini kui ebestandardsest aminohappest, mis on veres olevatele proteaasidele raskemini ära tuntav ning seega on ornitiine sisaldavad peptiidid ensümaatilisele degradatsioonile vastupidavamad. Antud PepFect14 peptiid oli võrreldes PepFect3-ga SKO-de transpordil mitukümmend korda aktiivsem, samas kui ilma rasvhappe modifikatsioonita ns-PepFect14 jäi PepFect3-ga samale tasemele [51]. Teises uurimuses sama peptiidiga näidati, et PepFect14 on võimeline väga efektiivselt transportima ka suuri nukleiinhappeid nagu pDNA ning vahendama nende poolt kantava geeni ekspressiooni [52].

Käesolevas töös on kasutatud RSP-d Pepfect6 kui baasvektorit siRNA-de transpordiks, millele lisatakse polüetüleen glükooliga C-terminaalselt modifitseeritud PepFect14-t, et

parandada partiklite stabiilsust seerumi komponentidele ning perspektiivis parandada ka poolväärtusaega vereringes. Modifitseerimiseks valiti PepFect14, kuna see on võimeline tugevalt komplekseerima nii lühikesi kui pikki nukleiinhappeid ning lisaks on selle süntees väheste modifikatsioonidega.

## 1.2. Peptiidide sünteesimine

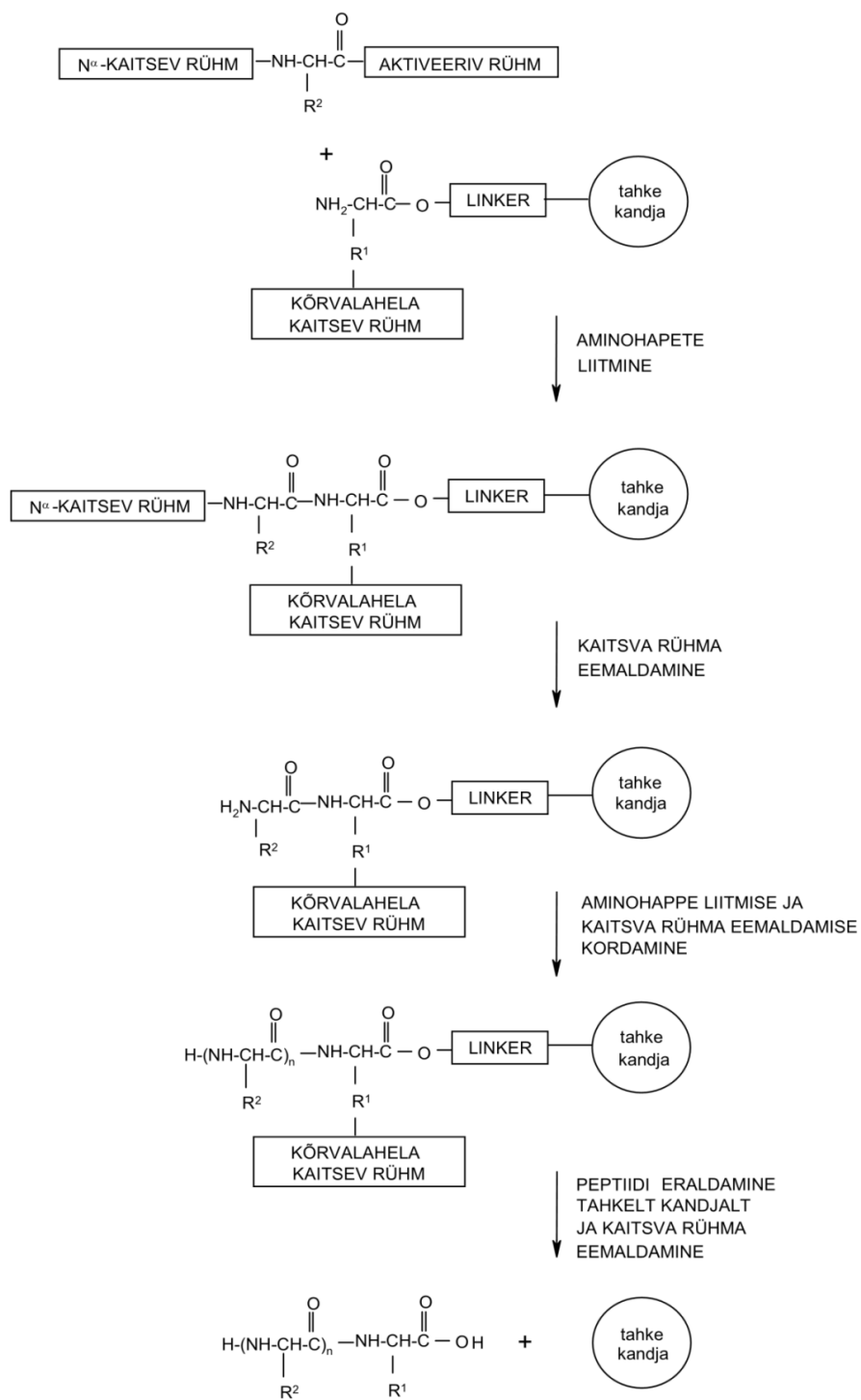
### 1.2.1. Tahkel kandjal peptiidisüntees

Tahkel kandjal peptiidisünteesi meetodile pandi alus 1963. aastal Robert Bruce Merrifieldi poolt [53], mille eest autasustati teda 1984. aastal Nobeli preemiaga. Tänu laiale rakendusala on see tänapäeval üldtunnustatud meetod peptiidide ja proteiinide sünteesimiseks, mida pole bakterite abil võimalik toota. Lisaks võimaldab see meetod ka tehis- ja D-aminohapete kasutamist ning aminohapete külghelate modifitseerimist.

Oma printsiibilt seisneb tahkel kandjal peptiidisüntees korduvas tsüklis mille etappideks on aminohappe sidumine, üleliigsete reagentide välja pesemine, ajutise kaitserühma eemaldamine ning taaskord pesemine (joonis 1). Aminohappe sidumisreaktsiooni energiabarjääri alandamiseks aktiveeritakse aminohappe C<sup>α</sup>-karboksüülrühm elektronegatiivse iseloomuga fosfooniumi või urooniumi soolaga nagu HBTU - N-(1H-bensotriasool-1-üül)(dimetüülamino)metüleeni-N-metüül-metaanamiinium heksaflorofosfaat N-oksiid). Saadud OBt (bensotriasool) ester jätab aminohappe karbonüülsele süsinikule piisavalt positiivse osalaengu, kuhu saab nukleofiilselt atakeerida tahkel kandjale läbi funktsionaalse linkerit seotud aminorühm. Seejärel pestakse reaktsiooninõust üleliigsed reagentid ning eemaldatakse peptidüülkandjalt ajutine aminotermiinalne kaitserühm, jättes seejuures kõrvalahelate funktsionaalsed rühmad kaitstuks, ning alustatakse järgmise aminohappe sidumisega eelpool kirjeldatud meetodil. Soovitud peptiidiahela valmimisel eemaldatakse peptidüülkandjalt ajutine kaitserühm ning eemaldatakse peptiid kandjalt tugeva happega, mille käigus vabanetakse ka kõikidest külghelate püsivatest kaitserühmadest. Püsivate kaitserühmade peptiidile tagasi seondumise vältimiseks lisatakse eemaldamissegusse vastavaid karbokatioone stabiliseerivaid ühendeid nagu triisopropüülsilaan. Peale peptiidi eemaldamist ekstraheeritakse peptiid vastavast lahusest ekstraheerimise teel.

Vastavalt ajutisele kaitserühmale jagatakse tahkel kandjal peptiidisüntees kaheks: Fmoc strateegial (Fmoc - 9-fluoroenüülmetüülloksükarbonüül rühm) ning tBoc strateegial (tBoc-tert-butüülloksükarbonüül rühm) põhinevaks. Fmoc strateegia põhineb ortogonaalsete

kaitserühmade meetodil, mille puhul ajutine kaitserühm on eemaldatav alsusega, nagu piperidiin, ning kõrvalahelate kaitserühmad ja funktsionaalne linker on happe-labiilsed (eemaldatavad TFA-ga). tBoc-strateegia puhul on kõik kaitserühmad happetundlikud, kuid ajutiste kaitserühmade eemaldamiseks kasutatakse trifluoroatseethapet (TFA) ning püsivate kaitserühmade ja peptiidi eemaldamiseks kasutatakse veevaba vesinikfluoriidhapet (HF). HF-i toksilisus limiteerib selle meetodi kasutamist tavalistes laborites, kuna see nõuab spetsiaalseid laboritarvikuid ning vastava koolituse läbinud inimesi. Sellepärast kasutatakse enamustes laborites ning ka käesolevas töös Fmoc strateegiat [54].



Joonis 1. Tahkel kandjal peptidisünteesi üldskeem [54].

### 1.3. Peptiidide puhastamine ja massispektromeetria

#### 1.3.1. Pöördfaasi kõrgrõhu-vedelikkromatograafia (RP-HPLC)

RP-HPLC on laialdaselt kasutatav kromatograafia meetod molekulide eraldamiseks nende hüdrofoobsuse alusel, mida kasutatakse näiteks peptiidide puhastamiseks sünteesi kõrvalproduktidest. Selleks juhitakse sünteesiproduktina saadud peptiidilahust mobiilse faasi abil läbi kolonni, mis on sisaldab statsionaarset faasi. Statsionaarseks faasiks on pöördfaasi kromatograafias poorsele silikaadile kovalentselt seotud mittepolaarsed alküülalad, mille pikkus valitakse vastavalt rakendusele: C<sub>3</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>. Pikemate ahelatega saab puhastada paremini hüdrofiilsemaid ning lühematega hüdrofoobsemaid peptiide. Mobiilseks faasiks on polaarsed solvendid, millest üks on vesi ning teine atseetonitriil või metanool. Proovi komponentide eraldumine sõltub uuritava aine interaktsioonidest eluendiga ning eluendimolekulide omavahelistest interaktsioonides. Vesi ise on väga nõrga elueeriva toimega, kuna veemolekulid moodustavad eelistatult omavahel vesiniksidemeid, mis ei lase uuritava proovil mobiilsesse faasi siseneda ning need seostuvad tugevalt statsionaarse faasiga. Proovi elueerimiseks kasutatakse tavaliselt atseetonitriili või metanooli gradienti, mis vähendab ühtlaselt mobiilses faasis vesiniksidemete hulka tänu millele elueeruvad alustuseks proovi hüdrofiilsemad komponendid ning hiljem hüdrofoobsemad komponendid. Gradiendi abil lahutatakse erineva hüdrofoobsusega proovikomponendid ajas. Lisandina kasutatakse solventides ioonpaardumis reagentina hapet, mis garanteerib funktsionaalrühmade täieliku laetuse ning soodustab seega sama polaarsusega molekulide samaaegset kolonnist väljumist. Kolonnist väljudes juhitakse lahus UV-Vis spektromeetrisse, kus detekteeritakse komponendid kiirguse neelduvuse järgi peptiidsidele omastel lainepikkustel vahemikus 190-230 nm. Kromatogrammile joonistuvate piikide alusel korjatakse fraktsioonid kas käsitsi või automaatse kollektoriga edasiseks analüüsimiseks.

#### 1.3.2. MALDI-TOF massispektromeetria

MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) on massispektromeetria alaliik, millega saab analüüsida nii bioloogilise päritoluga polümeerseid molekulide (DNA, proteiinid, peptiidid, suhkrud) kui sünteetiliste polümeeride (polümeerid, dendriimerid jt makromolekulid) laengu-massi suhet [55]. Uuritav proov segatakse proovi desorptsiooni ja ionisatsiooni võimaldava maatriksiga ning aurutatakse seejärel kuivaks.

Maatriksina kasutatakse tavaliselt mõnd orgaanilist ühendit nagu  $\alpha$ -tsüano-4-hüdrosükaneelhape [56].

Proovile suunatud laserkiire abil aurustatakse nii maatriks kui analüüt. Tekkinud analüüdi ioonid kiirendatakse kõrgepinge abil elektriväljas ning lahutatakse lennutorus sõltuvalt massi ja laengu suhtele ( $m/z$ ). Kuna elektrivälja tugevus on konstantne siis mõjub kõikidele sama laenguga ionidele ka sama suur jõud. Seega, suurema massi ja laengu suhtega ioonid ehk raskemad ioonid liiguvad lennutorus väiksema kiirendusega kui väiksema  $m/z$  suhtarvuga ioonid ning väljuvad seetõttu lennutorust hiljem kui kergemad ioonid. Lennutoru lõpus detekteeritakse molekulid elektriliste laengutena ning lähtuvalt ionide lennuajast (*time-of-flight* e. TOF) kuvatakse vastav  $m/z$  suhtarvude spekter. MALDI-TOF massispektromeetria eelisteks on tema kõrge massitundlikkus ( $>1\text{MDa}$ ), vähene analüüdi fragmenteeritus, põhiliselt annab ühelaengulisi ioone, madal signaali-müra suhe, kiirus ning väike proovikulu.

## 1.4. Nanopartiklite moodustamine ja karakteriseerimine

### 1.4.1. Mittekovalentne komplekseerimismeetod

Rakku sisenevate peptiidide ja siRNA nanopartiklite moodustamiseks kasutati mittekovalentset komplekseerimismeetodit. Selleks segatakse peptiidid siRNA-ga lahustis (nt deioniseeritud vees) ning inkubeeritakse saadud lahust komplekside moodustumiseks toatemperatuuril. Inkubeerimise käigus moodustuvad elektrostaatiliste ja hüdrofoobsete interaktsioonide tulemusena peptiidide ja siRNA-de vahel nanomõõtmes osakesed [47]. Varieerides lisatava peptiidi hulka saab moodustata erineva peptiidi/siRNA molaarsuhetega nanopartikleid.

### 1.4.2. Geelelektroforees

Agaroosi geelelektroforees on erinevate suurustega nukleiinhapete eraldamiseks ja visualiseerimiseks laialdaselt kasutatav meetod. Neutraalse pH juures negatiivselt laetud fosfaatrühmadega nukleiinhapped eraldatakse agaroosgeelile elektrivälja rakendamisel suuruse järgi. Kuna väiksematel nukleiinhapetel on geeli poore lihtsam läbida, siis nad liiguvad ajas kaugemale kui suuremad nukleiinhapped. Nukleiinhapete visualiseerimiseks lisatakse geelile etiidumbromiidi, mis seostudes RNA või DNA-ga fluorestseerub UV alas.

Käesolevas töös on geelektroforeesi kasutatud peptiidi ja siRNA komplekside moodustumise hindamiseks erinevatel peptiid/siRNA molaarsuhetel. Selleks võrreldakse vaba siRNA

migreeruvust geelis erinevatel molaarsuhetel moodustatud komplekside ja vaba siRNA vahel. Vaba siRNA liigub geelis kõige kaugemale ja annab selles punktis kõige tugevama fluorestsentsi. Komplekseerimisel siRNA-le lisatava peptiidi hulga suurenedes väheneb vaba siRNA fluorestsents kuni kadumiseni, kuna kogu siRNA on peptiidiga komplekseeritud ja osakesed pole tänu oma suurusele võimelised geeli läbima.

### 1.4.3. Nanopartiklite suurus ning $\zeta$ -potentsiaal

Footonokorrelatsiooni spektroskoopia on dünaamilisel valguse hajumisel [57] põhinev tehnika, mille abil saab määrata vedelikes dispergeeritud või lahustunud osakeste nagu valkude, polümeeride, mitsellide, nanopartiklite emulsioonide jne keskmist suurust ning suurusjaotust. Selle meetodi põhimõte seisneb solvendimolekulide soojusliikumisest põhjustatud osakeste liikumises ehk Browni liikumises. Monokromaatse ja koherentse laserikiirguse juhtimisel nendele osakestele toimub ajas fluktueeruva intensiivsusega valguse hajumine. Intensiivsuse fluktuatsioon sõltub osakeste suurusest, kuna väiksemad osakesed liiguvad kiiremini kui suuremad. Analüüsides neid intensiivsuse fluktuatsioone on võimalik leida Browni liikumise kiirus, millest saab läbi Stokes-Einsteini valemi arvutada osakeste suuruse. Mõõdetavat suuruseks on osakeste hüdrodünaamiline diameeter, mis kirjeldab mõõdetava osakesega samasuguse translatoorse difusioonikoeffitsiendiga sfäärilist osakest. Translatoorne difusioonikoeffitsient sõltub lisaks osakese suurusele ka osakese pinna struktuurist ning lahuses olevate ionide tüübist ning kontsentratsioonist.

Tulenevalt partiklite pinnal olevate rühmade ionisatsioonist ja/või laetud osakeste adsorptsioonist partiklite pinnale omab enamik partikleid vesilahustes pinnalaengut. Partiklite pinnalaeng mõjutab neid ümbritsevate ionide jaotust lahuses, mille tulemusena tekib partikli pinnale kiht, mis erineb ümbritsevast lahusest oma koostise poolest. Osakeste Browni liikumises liigub see kiht partikli osana kaasa.  $\zeta$ -potentsiaal on potentsiaal selle kihi punkti, kus ta libiseb mööda ülejäänud lahusest, ning ülejäänud lahuse vahel.  $\zeta$ -potentsiaal on põhiliseks osakestevahelisi interaktsioone põhjustavaks jõuks ning see võib olla nii positiivne kui negatiivne [58, 59].

$\zeta$ -potentsiaali mõõtmiseks rakendatakse partiklite dispersioonile elektrivälja, mis paneb osakese lahuses liikuma vastaslaenguga elektroodi suunas kiirusega, mis on proportsionaalne tema  $\zeta$ -potentsiaaliga. Vastav kiirus mõõdetakse laser interferomeetria abil, millest on võimalik arvutada osakese elektroforeetiline mobiilsus ning sellest omakorda  $\zeta$ -potentsiaal.

#### 1.4.4. siRNA transport rakku ning selle hindamine

RSP-de poolt vahendatud siRNA-de transporti raku tsütoplasmasse ning geeniekspressiooni vaigistamist saab hinnata reportersüsteemide abil. Enamasti põhinevad need reportersüsteemid bioloogilisel luminesentsil, mida on võimalik kvantifitseerida fotomeetriliselt. Ühe näitena kasutatakse selleks oksüdeeriva toimega lutsiferaasi ensüümi ning tema substraadil, lutsiferiini, põhinevat reportersüsteemi. Lutsiferaasi geeni ekspresseerimisel rakutuumas transkribeeritakse vastavalt geenilt funktsionaalne mRNA, millelt sünteesitakse translatsiooni käigus lutsiferaasi valk/ensüüm. Lutsiferaasi hulga määramiseks lüüsitakse rakud ning lisatakse rakkudele lutsiferaasi substraati, lutsiferiini, mille oksüdeerimisel tekib oksülutsiferiin ning eraldub valgus, mida on võimalik mõõta. Mida rohkem eraldub valgust, seda rohkem on toodetud lutsiferaasi ensüümi ning vastupidi.

siRNA-de transpordi efektiivsuse hindamiseks kasutatakse ära eukarüootsetes rakkudes esinevat post-transkriptsioonilist geenide vaigistamise mehhanismi ehk RNA interferentsi (RNAi) [60]. RNAi käigus lõigatakse pikemad kaheaahelised RNA molekulid 21-23 aluspaari pikkusteks fragmentideks, mida kutsutakse siRNA-deks (*small interfering RNA*). siRNA-d vahendavad komplementaarsete mRNA-de lõikamist läbi RISC kompleksis (*RNA-induced silencing complex*), kus kaheaahelise siRNA mittekomplementaarne ahel eemaldatakse argonaute 2 valgu poolt ning komplementaarne ahel aktiveerib RISC kompleksis mRNA lõikamise ehk geeni vaigistamise [61]. Sünteetiliste siRNA-de abil saab spetsiifiliselt vaigistada enamiku teadaolevate järjestustega geene, mis teeb sellest strateegiast väga suure perspektiiviga meetodi erinevate haiguste raviks. Käesolevas töös on kasutatud sünteetilist siRNA-d, mis on komplementaarne lutsiferaasi mRNA-le. Vastava siRNA seostumisel RISC kompleksiga lõigatakse komplementaarne lutsiferaasi mRNA, mille tulemusena lutsiferaasi mRNA hulk väheneb ning kaasnevalt sünteesitakse translatsiooni käigus vähem ensüümi ning substraadi lisamisel eralduv valgushulk on madalam. Seega korreleerub geeni vaigistamise määr eralduva valgushulga vähenemisega.

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1. Töö eesmärgid:

Käesoleva töö eesmärkideks on:

- Disainida polüetüleen glükooliga modifitseeritud ehk PEGüleeritud PF14 analoogid
- Sünteesida tahkel kandjal C-terminaalselt PEGüleeritud PF14 analooge ning RSP-d PF6
- Puhastada sünteesitud peptiidid kõrvalproduktidest RP-HPLC meetodil ning identifitseerida õige produkt MALDI-TOF massispektromeetria abil
- Hinnata PEGüleerimise mõju komplekside moodustumisele siRNA ja peptiidide vahel ning kirjeldada PEGüleerimise mõju komplekside suurusele ja  $\zeta$ -potentsiaalile
- Hinnata PEGüleerimise mõju geneetilise materjali transpordile *in vitro* mudelites

### 2.2. Peptiidide süntees, puhastamine ning identifitseerimine

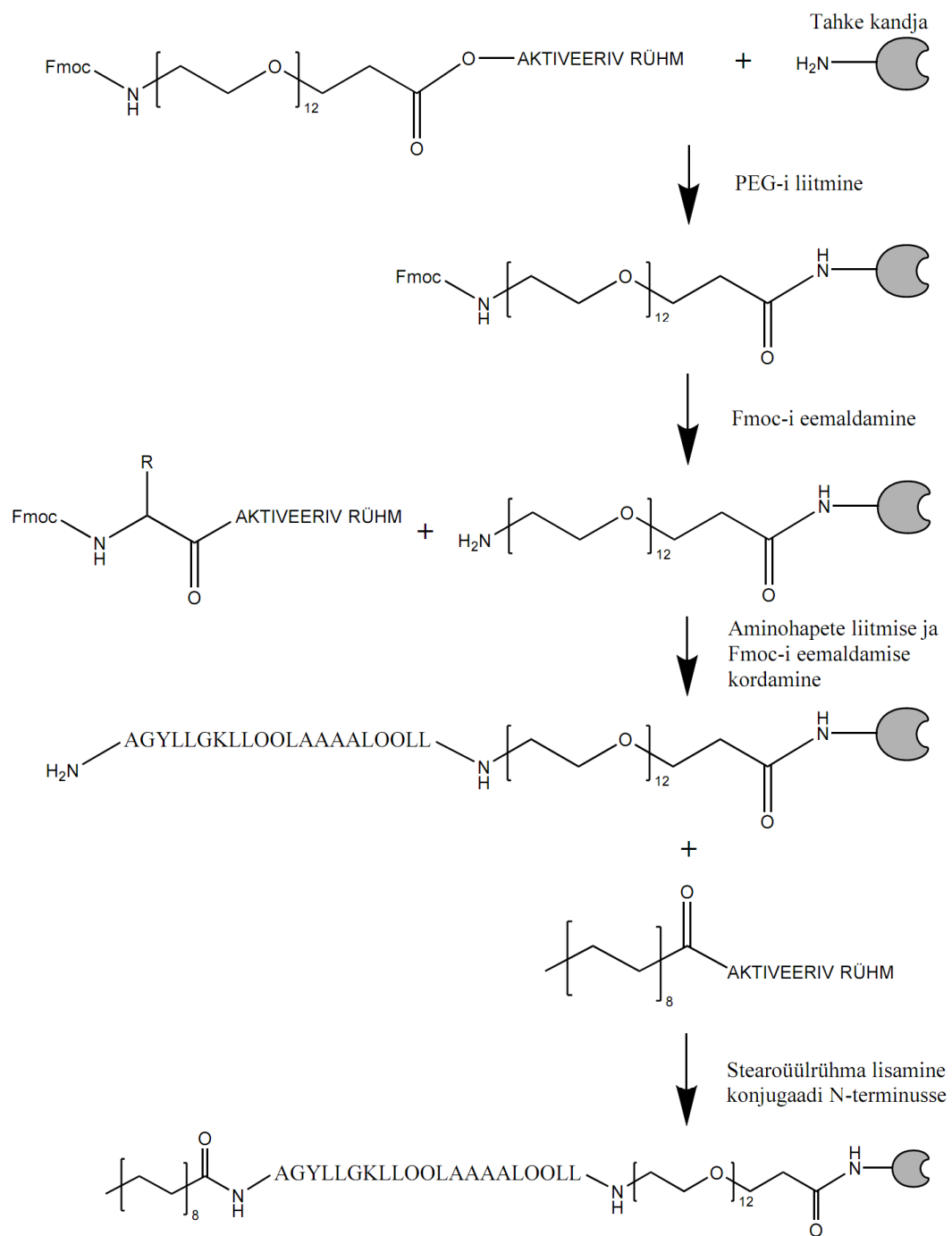
Kõik töös kasutatud peptiidid: PF14-PEG2000, PF14-PEG1000, PF14-PEG750 ning PF6 (vt tabel 1) sünteesiti käsitsi tahkel kandjal kasutades Fmoc strateegiat. Sünteesi skaala oli 0,1 mmol ( 1 ekvivalent), milleks kasutati Rink amiid MBHA tahket kandjat (Orpechem) funktsionaalsete rühmade hulgaga 0,41 mmol/g. Kõik peptiidid olid C-terminaalselt amideeritud. Reaktsioonid viidi läbi 5-kordses ülehulgas ning iga aminohappe sidumist korrati kaks korda, kui pole öeldud teisiti. PEGüleeritud peptiidide puhul seoti tahkele kandjale esimesena 2-kordses ülehulgas ( 2 ekvivalenti) heterobifunktsionaalne PEG polümeer. PF14-PEG1000 ja PF14-PEG2000 sünteesimiseks kasutati polüdispersseid PEGi polümeere Fmoc-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-PEG1000-CH<sub>2</sub>COOH, Fmoc-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-PEG2000-CH<sub>2</sub>COOH (Jenkem Technology USA) ning PF14-PEG<sub>12</sub> jaoks monodispersset Fmoc-NH-PEG<sub>12</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (ChemPep, USA). Reaktsioonil läbi viimiseks lahustati PEG-i polümeer 2 ekvivalendis aktivaatorites (0,5 M HCTU ja 0,5 M HOBT) ning lisati raktsiooninõus olevale tahkele kandjale ning reaktsioonil lasti toimuda 48 tundi 4 ekvivalendi DIEA juuresolekul. Seejärel eemaldati üleliigsed reagentid ning ülejäänud tahkel kandjal olevad vabad aminorühmad asetüleeriti kasutades atseetanhüdriidi ja DIEA 1:1 segu DMF-s 4x 2 min.

Seejärel eemaldati tahkelt kandjalt ajutine kaitserühm Fmoc ja jätkati peptiidiahela sünteesi allpool kirjeldatud meetodil. Aminohapete aktiveerimine viidi läbi eraldi 15 ml tuubis ning

selleks kasutati 0,5 M HCTU ja 0,5 M HOBT (Sigma-Aldrich) lahust DMF-s (Scharlau). Seejärel valati aktiveeritud aminohappe lahus kraani, filtri ja korgiga varustatud reaktsiooninõus asuvale tahkele kandjale ning lisati 10-kordses ülehulgas katalüsaator DIEA-d (Fluka). Reaktsioonil lasti toimuda 30 min ning tsüklit korrati veel üks kord. Peale seda eemaldati üleliigsed reagentid, pestes tahket kandjat kordamööda DMF-i ja DCM-ga. Ajutise Fmoc kaitserühma eemaldamiseks kasutati 20%-list piperidiini lahust DMF-s, esmalt 2 min ning siis 20 min. Seejärel pesti üleliigsed reagentid DMF-ga ning alustati järgmise aminohappe sidumist. Peale viimase aminohappe lisamist eemaldati eelmainitud meetodil peptidüül kandjalt ajutine Fmoc kaitserühm ning lisati steariinhape, mis seoti sarnaselt aminohapetele, aga reaktsioonil lasti toimuda üleöö (joonis 2).

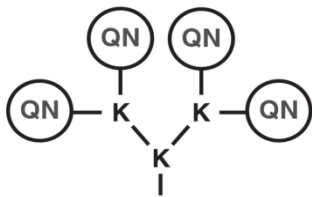
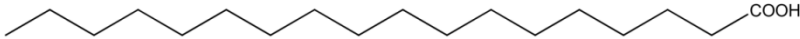
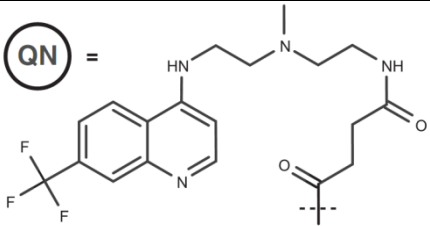
PF6 sünteesi jätkati 7. lüsiini  $\epsilon$ -aminorühmast Andaloussi jt poolt kirjeldatud protokoll järgi [44]. Seejärel viidi tahke kandja üle filtriga varustatud plastiksüstlasse ning kuivatati alandatud rõhul üleöö, misjärel eemaldati peptiid tahkelt kandjalt, kasutades selleks 95% TFA (Sigma Aldrich), 2,5% TIS (Sigma Aldrich) ja 2,5% ddH<sub>2</sub>O segu. Reaktsioonil lasti toimuda 3 tundi ning peptiidilahus viidi üle 50 ml tuubi. Tahket kandja pesti veel 1x TFA-ga ning 2x deioniseeritud veega, mis kõik lisati samasse tuubi. Orgaanilistes solventides lahustuvatest lisanditest vabanemiseks ekstraheeriti peptiidilahust 3x jääkülma eetriga. Seejärel külmutati peptiidilahus -80 °C juures ning kuivatati lüofilisaatoris. Kõik reaktsioonid viidi läbi loksutil.

Kuivatatud produkt oli valge pulbri kujul. Pulber lahustati 20% AcN (Scharlau) / H<sub>2</sub>O (0,1% TFA) ning puhastati seejärel semipreparatiivse RP-HPLC (Agilent) abil 30-minutilise gradiendiga 20%-80% AcN / H<sub>2</sub>O (0,1% TFA). Pöördfaasikolonnina kasutati C3 kolonni parameetritega (250 mm x 10 mm, osakeste suurus 5  $\mu$ m) ning voolukiirus oli 5 ml/min. Süstimisruumalaks oli 1000  $\mu$ l. Kogutud fraktsioonid analüüsiti MALDI-TOF massispektromeetril (Applied Biosystems, Voyager DE Pro), külmutati -80 °C juures ning kuivatati lüofilisaatoris.



**Joonis 2. PF14-PEG<sub>12</sub> sünteesiskeem.**

**Tabel 1. Töös kasutatud peptiidid.**

| Nimetus  | Struktuur  | Molekulmass |
|--|--|-------------|
| PF14-PEG <sub>12</sub>                                       | Stearoüül-AGYLLGKLLLOOLAAAALLOLL(=O)NH-PEG <sub>12</sub> -<br>CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C(=O)NH <sub>2</sub>                             | 3000        |
| PF14-PEG1000   | Stearoüül-AGYLLGKLLLOOLAAAALLOLL(=O)NH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -PEG1000-<br>CH <sub>2</sub> C(=O)NH <sub>2</sub>                       |             |
| PF14-PEG2000   | Stearoüül-AGYLLGKLLLOOLAAAALLOLL(=O)NH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -PEG1000-<br>CH <sub>2</sub> C(=O)NH <sub>2</sub>                       |             |
| PF6  |  <p>Stearoüül-AGYLLGKINLKALAALAKKIL – NH<sub>2</sub> [44]</p> | 4409        |
| Steariinhape   |    | 284,5       |
| Suksinüleeritud<br>triflorometüül-<br>kvinoliini<br>derivaat |  <p>[44]</p>  | 496,4       |

### 2.3. Komplekside moodustamine ning visualiseerimine

Geelektrofooresiks ning *in vitro* katseteks kasutatud peptiid/siRNA kompleksid moodustati MQ vees erinevatel molaarsuhetel (MR - *molar ratio*) 20:1-40:1 ning erinevatel teoreetilistel PEGüleeritusastmetel (vt valem 1). PEGüleeritusaste väljendab protsentides, kui palju on kogu komplekside valmistamiseks vajalikust peptiidihulgast PEGüleeritud peptiid (vt tabel 2). Kasutatud siRNA ja peptiidilahuste kontsentratsioonid olid vastavalt 10 µM ning 100 µM. Kompleksid moodustati lõpruumalas 105 µl ning sama protokolliga kasutati korratavuse huvides ka kõigi teiste katsete puhul. Komplekside moodustamiseks lisati esmalt 1,5 ml eppendorfi tuubi 10,5 µl siRNA, millele lisati MQ, segati ning lisati PF14-PEG. Seejärel lasti

kompleksidel moodustuda 15 min ning lisati PF6, segati ja lasti kompleksidel moodustuda 1 tund.

Komplekside moodustumise kinnitamiseks kasutati agarooosi geelelektroforeesi, mille abil visualiseeriti vaba siRNA migreerumist elektrivälja rakendamisel. Selleks valmistati 1%-ne agarooosi geel (BioTop) 1-kordses TAE puhvis. 100 ml geelile lisati 10 µl EtBr (10mg/ml, Sigma Aldrich). Elektroforeesiks kasutati 10 µl proovi, misjärel segati proovid parafilmil 2 µl värvainega (6x Loading Dye, Fermentas), mis aitab proovil püsida geelis oleva süvendi põhjas ning lisaks muudab proovi nähtavaks. Edasi pipeteeriti 10 µl värvitud proovi läbi elektroforeesikambris oleva puhvrikihi igasse geeli süvendisse ning rakendati proovidele 30 min elektrivälja, peale mida pildistati geeli UV transilluminaatoril tulemuste visualiseerimiseks.

**Tabel 2. Mittekovalentne komplekside moodustamine koformulatsiooni meetodil.** Koformuleeritud peptiid/siRNA komplekside PEGüleerituse defineerimiseks kasutati teoreetilist PEGüleeritusastet, mis väljendab PEGüleeritud peptiidi hulka kogu siRNA-le lisatud peptiidi hulgast.

| MR30                            |             |          |                |           |
|---------------------------------|-------------|----------|----------------|-----------|
| Teoreetiline PEGüleeritusaste % | siRNA V(µl) | MQ V(µl) | PF14-PEG V(µl) | PF6 V(µl) |
| 0%                              | 10,5        | 63,0     | -              | 31,5      |
| 5%                              | 10,5        | 63,0     | 1,58           | 29,9      |
| 10%                             | 10,5        | 63,0     | 3,15           | 28,4      |
| 20%                             | 10,5        | 63,0     | 6,30           | 25,2      |
| 40%                             | 10,5        | 63,0     | 12,6           | 18,9      |
| 60%                             | 10,5        | 63,0     | 18,9           | 12,6      |
| 80%                             | 10,5        | 63,0     | 25,2           | 6,30      |
| 100%                            | 10,5        | 63,0     | 31,5           | -         |

$$\text{Teoreetiline PEGüleeritusaste \%} = \frac{n(\text{PF14-PEG})}{n(\text{kogu peptiid})} \times 100\%$$

Valem 1

#### 2.4. Komplekside füüsikokeemiliste omaduste uurimine

PEGüleerimise mõju hindamiseks peptiid/siRNA komplekside hüdrodünaamilisele diameetrile kasutati footonkorrelatsioon spektroskoopia aparatuuri (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). Kõik mõõtmised tehti madalaruumalalistes ühekordsetes küvettides

100 µl-s 25 °C juures ning mõõtmised viidi läbi 10 järjestikkuse kordusena, kus iga mõõtmise kestus oli 10 sekundit. Programm keskmistas tulemused ning keskmine hüdrodünaamiline diameeter loeti suhtelise intensiivsuse graafikutelt. Sama mõõtmise käigus arvutas programm ka osakeste polüdisperssusindeksi (Pdl), mis väljendab osakeste suurusjaotust. Kompleksid moodustati MR30 juures erinevatel PEGüleeritusastmetel 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 %. *In vivo* administreerimiseks kasutatavate lahuste mõju uurimiseks kompleksidele, moodustati kompleksid esmalt pooles ruumalas ning seejärel lahjendati MQ, 10% glükoosi või 10% glükoosi lahusega 40mM Hepes puhvril pH=7,4 (*HBG-Hepes buffered glucose*), nii et, glükoosi ja Hepes puhvri lõpp-kontsentratsioonideks olid vastavalt 5% ja 20mM.

ζ-potentsiaali mõõtmiseks moodustati kompleksid sarnaselt eelnevalt kirjeldatule, aga pärast komplekside valmimist lahjendati neid esmalt MQ veega 500 µl-ni, peale mida lisati täiendavad 500 µl MQ vett, 10%-list glükoosilahust, või HBG puhvrit ning kompleksidel lasti seista 20 min. Mõõtmised viidi läbi samal aparatuuril ning samadel tingimustel, kuid kasutati spetsiaalseid küvette ning programm seadistati ümber ζ-potentsiaali mõõtmiseks automaatses töörežiimis.

## 2.5. Geeni vaigistamine rakukultuuris

Hindamaks PEGüleerimise mõju siRNA transpordi efektiivsusele rakkude tsütoplasmasse, kasutati stabiilselt lutsiferaasi ensüümi ekspresseerivat inimese glioblastoomi rakuliini U87.

U87 rakke kasvatati L-glutamiiniga DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) söötmes, millele lisati 10% veise looteserumit (FBS), 1,0 mmol/l naatriumpüruvaati, 0,1 mmol/l asendatavaid aminohappeid, 100 U/ml penitsilliini ning 100 µg/ml streptomütsiini. Rakke kasvatati veeauruga küllastatud atmosfääris 37 °C juures, mis sisaldas 5% CO<sub>2</sub>, ning neid külvati ümber 2-3 päeva järel.

PEGüleeritud nanopartiklite reportergeeni vaigistamise efektiivsuse määramiseks külvati stabiilselt lutsiferaasi geeni ekspresseerivad U87 rakud ööpäev enne eksperimendi algust 24-kaevulistele koekultuuri plaatidele. Igasse kaevu pipeteeriti 50 000 rakku. Pärast komplekside moodustamist vahetati koelultuuril olev sööde 450 µl värskesse seerumit sisaldava söötme vastu. Pärast 0,5 tundi värskesse söötme inkubeerimist lisati igasse kaevu 50 µl PF14-PEG/PF6/siRNA komplekse. Positiivse kontrollina kasutati võrdluseks kommertsiaalset transfektsioonireagenti LF2000 (*Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Transfection Reagent, Invitrogen*) ning lisaks jäeti igale plaadile 4-6 ainult söötmeaga töödeldud rakkudega kaevu, mille suhtes

reportergeeni vaigistamist arvatati. LF2000/siRNA kompleksid moodustati ja kasutati vastavalt tootja prokollile. Ühte 1,5 ml eppendorfi tuubi pipeteeriti 97,8  $\mu$ l Opti-MEM (*Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium, Invitrogen*) rakukultuuri meediat ja 7,2  $\mu$ l LF2000, teise tuubi 94,5  $\mu$ l meediat ning 10,5  $\mu$ l siLuc2 siRNAd (Microsynth AG, Šveits). Lahuseid inkubeeriti 15 minutit, misjärel need segati kokku ning inkubeeriti täiendavalt enne rakkudele lisamist 30 minutit. Kõik mõõtmised viidi läbi duplikaatidena.

Järgnevalt hoiti 4 h rakke kultiveerimiseks vajaliku atmosfääriga inkubaatoris, misjärel lisati igasse kaevu 1 ml söödet. Rakke inkubeeriti üleöö peale mida eemaldati rakkudele ja lisati 100  $\mu$ l rakkude lüüsimiseks vajalikku 0,1% Triton X-100 lahust HKR (HEPES-puhverdatud Krebs Ringer) puhvis ning lasti lüüsimisel toimuda 15 minuti 4 °C juures

Lutsiferaasi ensüümi aktiivsuse mõõtmiseks pipeteeriti 20  $\mu$ l rakulüsaati ning 80  $\mu$ l lutsiferaasi substraati lutsiferiini (Promega) valgele 96-kaevulisele plaadile. Seejärel mõõdeti eraldunud valguse hulk kvantitatiivselt luminomeetriga (GLOMAX, Promega). Saadud väärtused normaliseeriti vastavalt 24-kaevulises plaadis olnud proteiini hulga ning arvatati suhtelistesse ühikutesse RLU/mg (*Relative Light Unit* proteiini massiühiku kohta). Tulemuste saamiseks jagati saadud väärtused läbi ainult söötmega töödeldud kaevude keskmise väärtusega ning esitati protsentides, nii et, 100% näitab, et geeni pole vaigistatud ning 0%, et geen on täielikult vaigistatud.

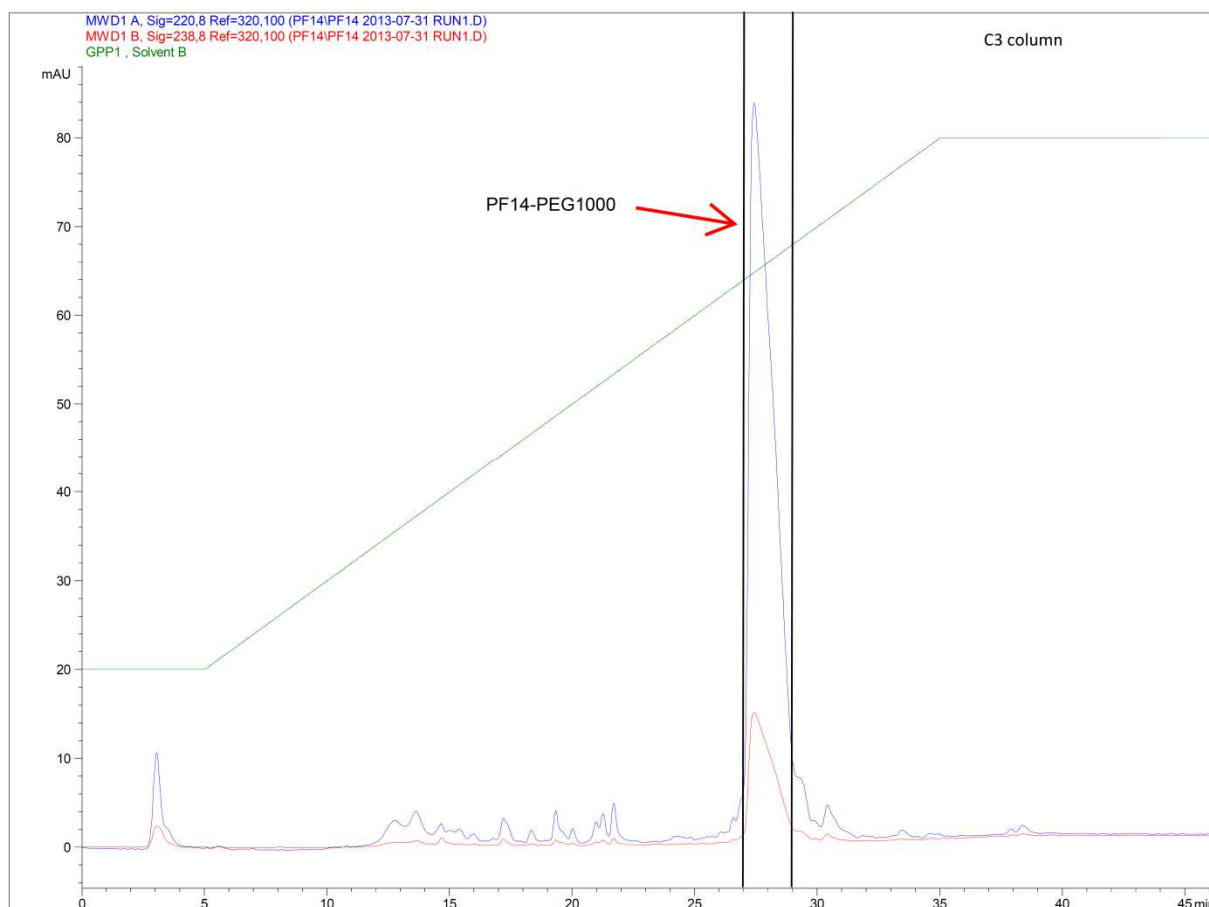
### 3. Tulemused ja arutelu

#### Süntees

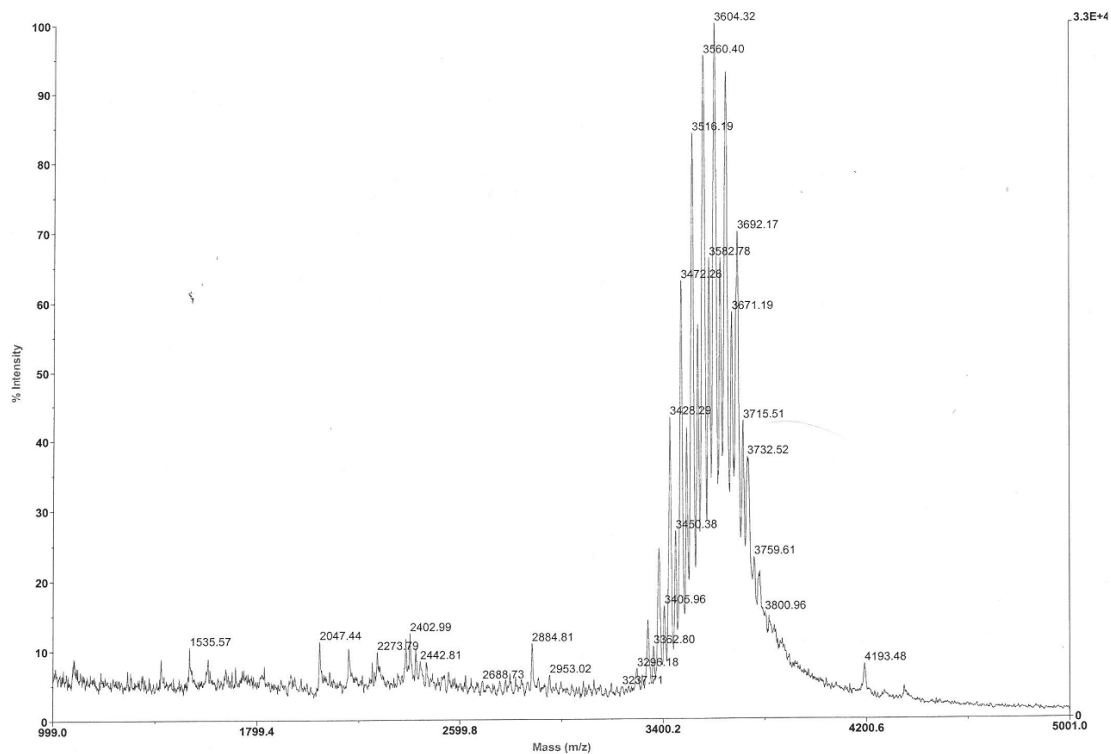
Antud töö eemärk oli uurida RSP, PF14, modifitseerimisvõimalusi erineva pikkuse ja disperssusega PEG-dega ja nende mõju siRNA-ga nanopartiklite moodustumisele, stabiilsusele ja bioloogilisele aktiivsusele glioblastoomse vähi rakukultuurses mudelis. Selleks disainiti ning sünteesiti C-terminaalselt PEGüleeritud rakku sisenevat peptiidi PF14. Eeldades, et nii suurte molekulide lisamine RSP võib oluliselt mõjutada partiklite moodustumise ning rakutranspordi võimekust, valiti modifitseeritavaks peptiidiks PF14. PF14 puhul on eelnevalt meie rühma poolt näidatud, et see on äärmiselt efektiivne nii pikkade kui lühikeste nukleiinhapete transpordil rakukultuuri mudelites. Lisaks komplekseerib PF14 nukleiinhappeid tugevamalt kui teised meie poolt disainitud peptiidid [62]. Antud PEG-modifikatsiooni kasutamise peamine eesmärk on parandada peptiid/siRNA komplekside *in vivo* biosaadavust. Kuid on teada, et suure hulga PEG-i molekulide lisamine mõjutab negatiivselt nii efektiivset nanopartiklite moodustumist, kui ka nende võimet rakkudega seostuda ning nendesse siseneda. Seega on oluline, et PEG-i molekulide kataksid vaid optimaalse osa partiklite pinnast. Antud töös kasutati peptiid/siRNA komplekside moodustamiseks koformulatsiooni meetodit, kus PF14-PEG komponenti võimaldab PEG-i funktsionaalsust ning teise komponendina kasutatav RSP PF6 (mille puhul on eelnevalt näidatud, et ta on võimeline transportima siRNAsid *in vivo*) võimaldab stabiilsete nanopartiklite moodustumist.

PF14-PEG1000 ning PF14-PEG2000 sünteesiti eespool kirjeldatud meetodil tahkel kandjal. Selleks seoti tahekele kandjale eelnevalt polüdispersed PEGi polümeerid keskmiste molekulmassidega 1000 ja 2000, misjärel eemaldati kandjalt ajutine kaitserühm ning jätkati peptiidiahela sünteesi, mida on täpsemalt kirjeldatud meetodite osas. Sünteesiproduktid eemaldati kandjalt, ekstraheeriti, kuivatati lüofilisatoris, mille tulemusena saadi PF14-PEG1000 puhul umbes 70mg ning PF14-PEG2000 puhul umbes 90 mg valget pulbrit. Sünteesitud peptiid puhastati kõrvalproduktidest pöördfaasi vedelikkromatograafia abil AcN gradiendiga 20-80% 30 minutiga (vt joonis 3 ja lisa 2). Õige koguti automatiseeritud kollektori abil ning lüofiliseeriti. Saadud peptiidi analüüsiti massispektromeetriselt (vt joonis 4 ja lisa 3). Samuti võrreldi saadud massispektreid vaba polümeeri maasispektri (vt lisa 6 ja 7) ning PF14 molekulmassiga. Lüofiliseerimise tulemusena saadi ligikaudu 15-20 mg mõlemat peptiidi.

Kuna PF14-PEG1000 ja PF14-PEG2000 on tänu polüdisperssele PEG-le samuti polüdispersed ning koosnevad paljudest erinevate molekulmassidega molekulidest, on nende formulatsioonide omadusi siRNA-dega ja käitumist *in vitro* ja *in vivo* raske täpselt hinnata. Selleks, et luua täpsemini defineeritud RSP-PEG kandjad, otsustati sarnaselt eelpool kirjeldatuga sünteesida PF14-PEG molekulid, kuid kasutades selleks hiljuti kommertsiaalselt kättesaadavaks muutunud monodispersse PEG-ga analoogi, PF14-PEG<sub>12</sub>. Sünteesi produktiks saadi umbes 20 mg valget pulbrit, mille kromatogrammi ja massispektri leiab lisadest 4 ja 5. Lisaks neile kolmele peptiidile sünteesiti veel rakku sisenevat peptiidi PF6 (vt lisa 8).



**Joonis 3. PF14-PEG1000 RP-HPLC kromatogramm**



**Joonis 4. PF14-PEG1000 massispekter peale puhastamist RP-HPLC-ga**

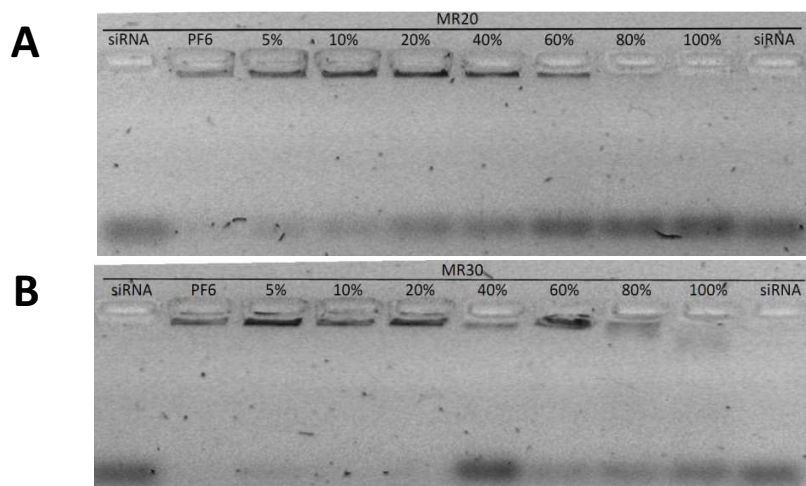
### **PEGüleerimise mõju hindamine peptiid/siRNA komplekside moodustamisele**

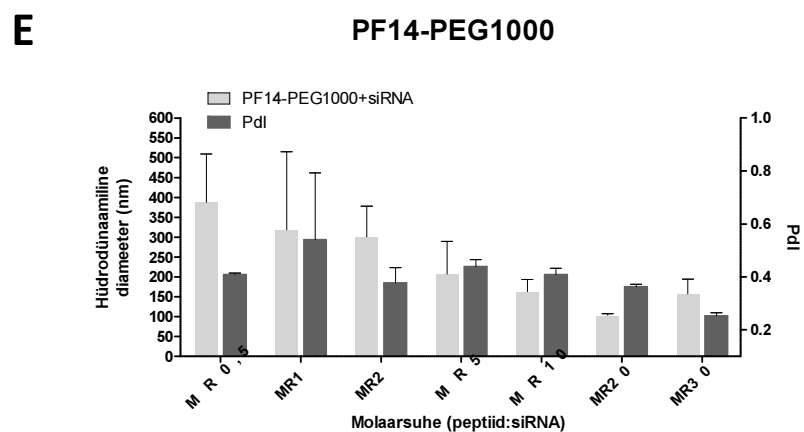
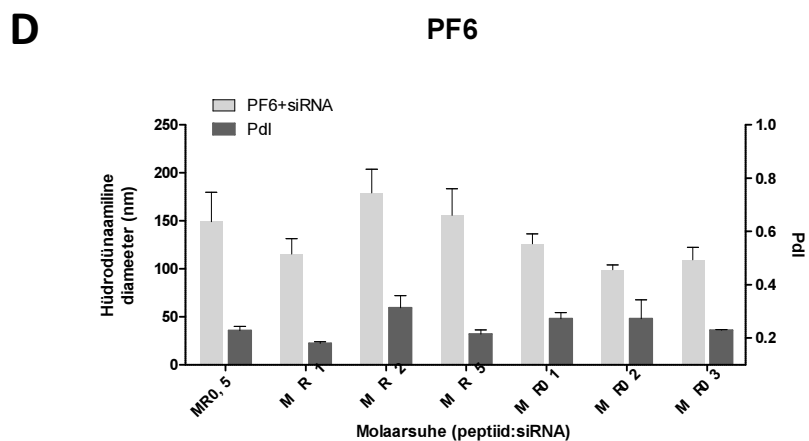
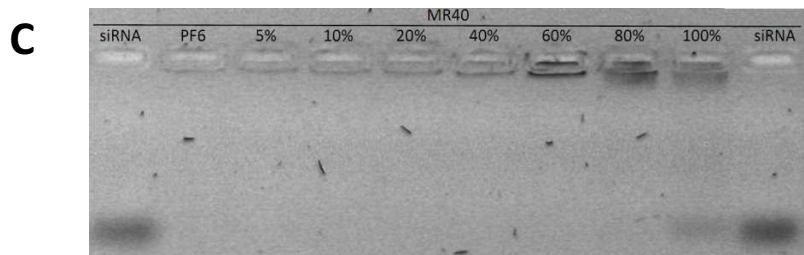
Selleks, et kindlaks teha kuidas PEGüleerimine mõjutab komplekside moodustumist siRNAga, moodustati kompleksid erinevatel peptiid/siRNA molaarsuhtel 20-40. Lisaks sellele moodustati igal molaarsuhtel (MR) kompleksid erinevatel teoreetilistel PEGüleeritusastmetel, mida on väljendatud protsentides. Komplekside moodustamist on täpsemalt kirjeldatud tabelis 2. Komplekside moodustumise kinnitamiseks viidi esmalt läbi geelelektroforeesanalüüs. Antud eksperimendiks kasutati PEGüleerimise mõju hindamiseks kekskmise pikkuse PEGi polümeeriga peptiidi PF14-PEG1000.

Geelektroforeesi tulemustest on näha, et juba MR20 (vt joonis 5A) juures komplekseerib PF6 siRNA täielikult, samas kui 100% PF14-PEG1000 puhul on siRNA täielikult migreerunud. Lisaks on näha, et PF14-PEG1000 protsendi suurenedes kasvab migreerunud siRNA hulk lineaarselt. MR30 (vt joonis 5B) puhul on PEGüleerimise mõju siRNA migreerumisele tunduvalt vähenenud, sest positiivselt laetud peptiidide hulk kompleksides on kasvanud 1,5x. Seega on kompleksid tugevamini seostunud ning värvaine siRNA-le seostumine on rohkem steeriliselt takistatud. Teoreetilise PEGüleeritusastme juures 0-20% on siRNA geelis täielikult migreerumata ning alates 40% hakkab migreerunud ehk vaba siRNA

hulk kasvama. Seejuures tuleb ära mainida, et 40% juures olev vaba siRNA fraktsioon on põhjustatud juhuslikust katse korratavusega seonduvast veast. MR40 (vt joonis 5C) puhul enam vaba siRNA fraktsiooni praktiliselt ei teki, erandiks on vaid 100% PF14-PEG1000, mis näitab veelkord, et PEG segab oluliselt efektiivset siRNA komplekseerimist. See viitab vajadusele kasutada täiendavat RSP-d, mis võimaldaks efektiivset siRNA komplekseerimist. Seega võib esiteks järeldada, et PF14-PEG1000 seostub siRNAga nõrgemini kui PF6. Teiseks, suuremate peptiid/siRNA molaarsuhete puhul on siRNA tugevamini kompleksidesse seotud.

Selleks, et detailsemalt hinnata PF14-PEG1000 võimet moodustada siRNA-dega nanopartikleid, kasutati footonkorrelatsiooni spektroskoopiat, millega mõõdeti komplekside hüdrodünaamilist diameetrit. Võrdluseks kasutati positiivse kontrollina PF6/siRNA komplekse samadel laengusuhetel. Kompleksid moodustati saranselt eelpool kirjeldatule, aga molaarsuhetega mindi tunduvalt allapoole MR0,5; 1; 2; 3; 5; 10; 20; 30, et täpsemalt aru saada, millistest molaarsuhetest alates kompleksid moodustuma hakkavad. Tulemustest on näha, et PF6 on võimeline komplekseerima siRNAd juba MR0,5 juures alla 200 nm diameetriga osakestesse (joonis 5D). Samas kui PF14-PEG1000/siRNA kompleksid kondenseeruvad alla 200 nm alles MR10 juures (joonis 5E). Seejuures antud kompleksid heterogeense iseloomuga, kuna nende suurusjaotus on kõrge ( $PdI > 0,4$ ) ja nad võivad teoreetiliselt sisaldada erineva suurusega fraktsioone. See võib olla *in vivo* transpordi vaatenurgast ebasoodne, kuna erineva suuruse ning parameetritega partiklite fraktsioonid võivad muuta nende *in vivo* biodistributsiooni dünaamikat.





**Joonis 5. Komplekside moodustumise iseloomustamine.** Koformuleeritud komplekside moodustumist hinnati geelelektroforeesi abil erinevatel teoreetilistel PEGüleeritusastmetel 0% kuni 100% ning molaarsuhel (A) MR20, (B) MR30, (C) MR40. PF14-PEG1000/siRNA komplekside moodustumist hinnati lähemalt footonkorrelatsiooni spektroskoopia abil, mõõtes molaarsuhel MR0,5-MR30 moodustatud komplekside hüdrodünaamilist diameetrit (D), võrreldes seda vastavate (E) PF6/siRNA kompleksidega.

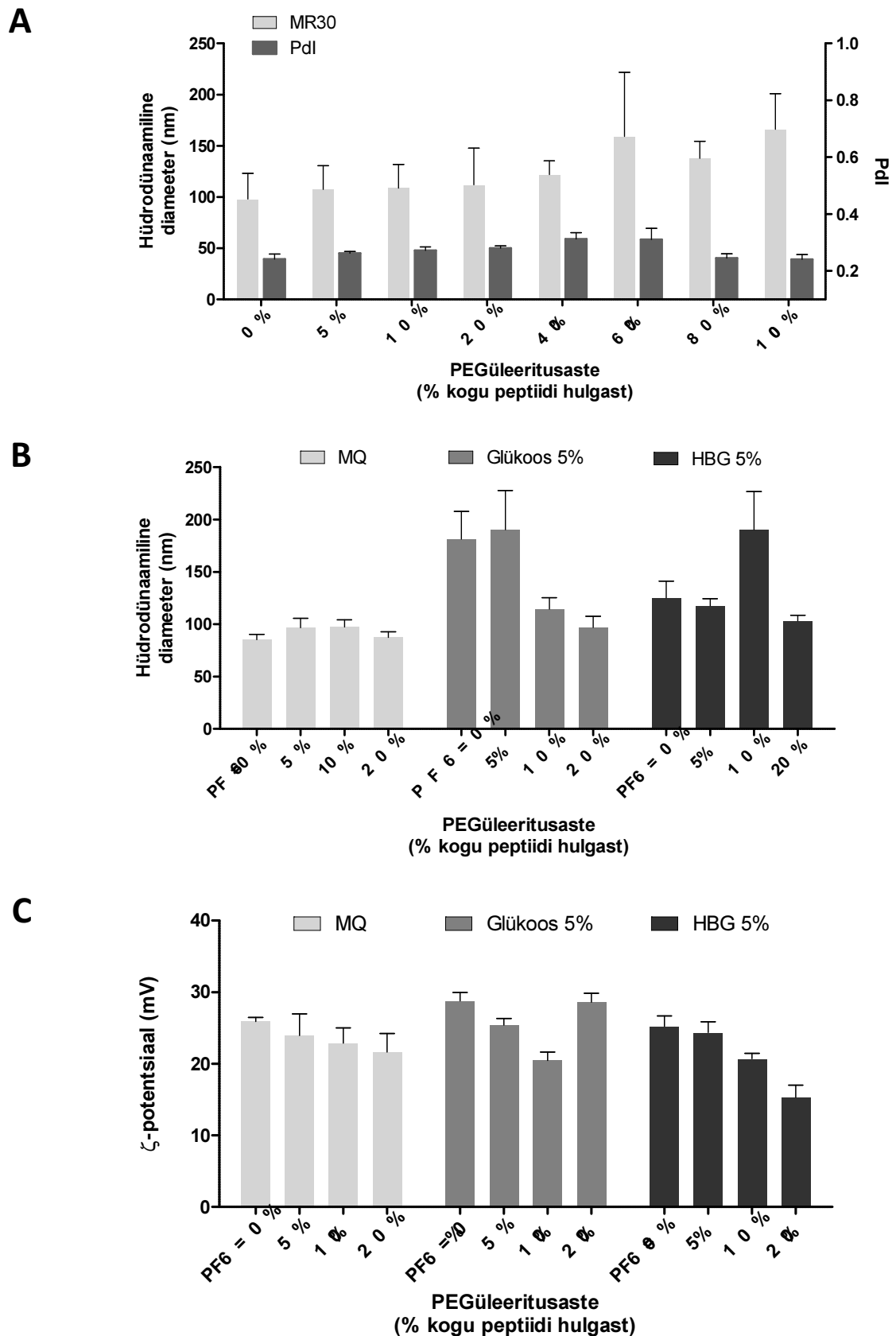
## **Koformuleeritud nanopartiklite füsikokeemiliste omaduste hindamine erinevates tingimustes**

PEGüleeritud komplekside füsikokeemiliste omaduste uurimiseks kasutati samuti footonkorrelatsiooni spektroskoopiat. Kõikide katsete jaoks kasutati MR30, kuna see on PF6 puhul efektiivne/aktiivne ka *in vivo* tingimustes [44]. Kompleksid moodustati eelnevalt tabelis 2 kirjeldatud meetodil. PEGüleeritud peptiidina kasutati katsetevahelise korreleeruvuse huvides ka nendes katsetes PF14-PEG1000. Jooniselt 6A on näha, et PF14-PEG1000 hulga suurenedes muutub komplekside hüdrodünaamiline diameeter 100 nanomeetrist 0% juures kuni 150 nanomeetrini 100% juures. Kuni 60%-ni võib täheldada ka mõningast PDI kasvu, mis väheneb märgatavalt 80% ja 100% juures.

Kuna PEGüleermise eesmärgiks oli parandada RSP/siRNA komplekside biosaadavust *in vivo*, siis uuriti lähemalt erinevate *in vivo* administreerimiseks kasutatavate lahuste nagu glükoosi ja Hepes puhverdatud glükoosi (*HBG-Hepes buffered glucose ingl.k*) mõju komplekside suurusele ning  $\zeta$ -potentsiaalile. Glükoosi kasutati kuna see on 5% juures isoosmootne verega ning seega sobiv süstimiseks vereringesse. HBG puhvrit kasutati, et näha, kuidas muutuvad komplekside füsikokeemilised omadused füsioloogilise pH juures. Lisaks esinevad töös kasutatavad peptiidid peale puhastamist TFA sooladena, mis võivad avaldada komplekside lahuse pH-le tugevat mõju, sest MQ vee pH on tänu ionide vähesusele ja sellest tulenevalt madalale puhverdamisvõimele väga kergesti mõjutatav. Puhvri kasutamine aitab vältida TFA poolt põhjustatud madalast pH-st või selle kõikumisest tulenevaid efekte nagu peptiidide või siRNAde laengujaotus.

Katse tulemustest on näha (joonis 6B), et MQs on komplekside suurused stabiilselt 100 nm juures, samas kui glükoosi või HBG kasutamisel formulatsioonimeediumis võivad nanopartiklite suurused kasvada kuni 2 korda, kuigi enamasti olid suurused sarnased nanopartiklitega MQs, jäädes vahemikku 100-125 nm.

Tulemused joonisel 6C korreleeruvad kirjanduses toodutega [63], et PEGüleerimine neutraliseerib osakeste  $\zeta$ -potentsiaali, välja arvatud ühe erandiga glükoosis 20% juures. Lisaks on näha, et neutralisatsioon avaldub glükoosis (29 kuni 20 mV, va 20% juures) ja HBGs (27 kuni 17 mV) tugevamini kui MQs (26 kuni 22 mV).

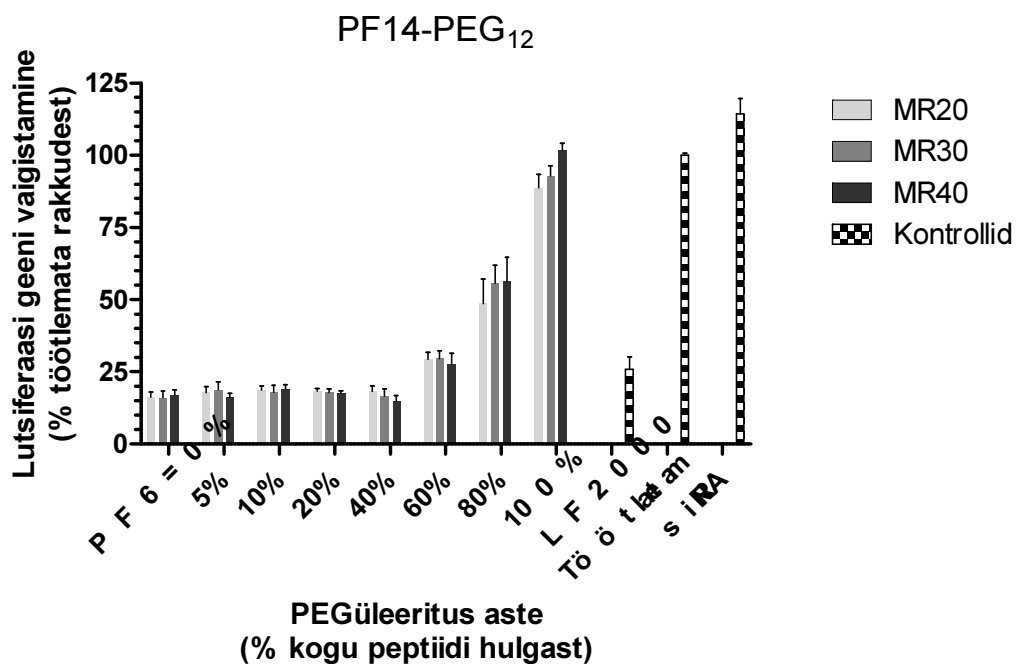


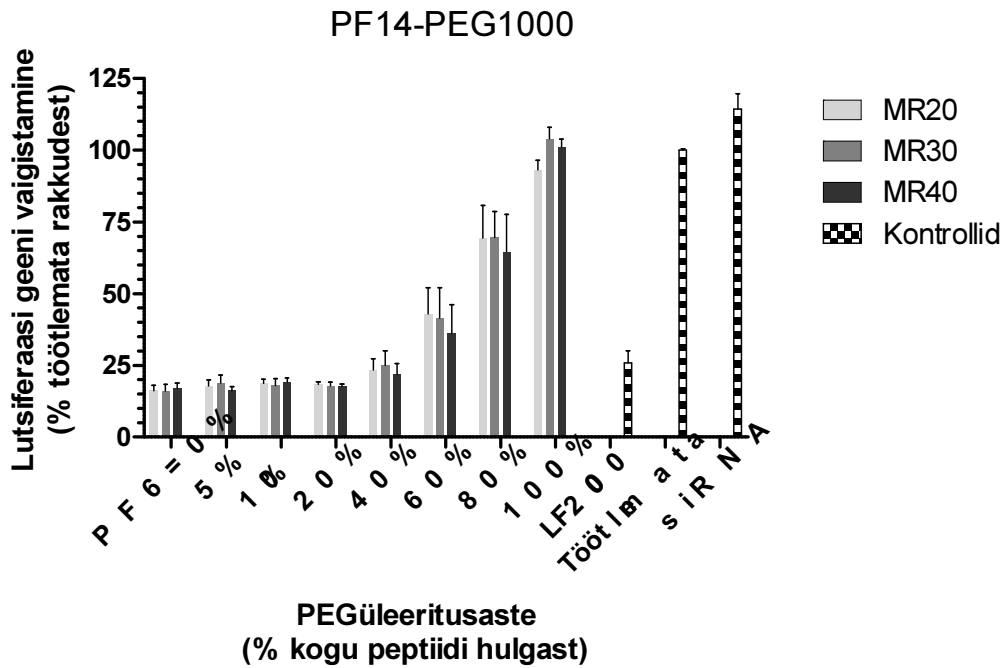
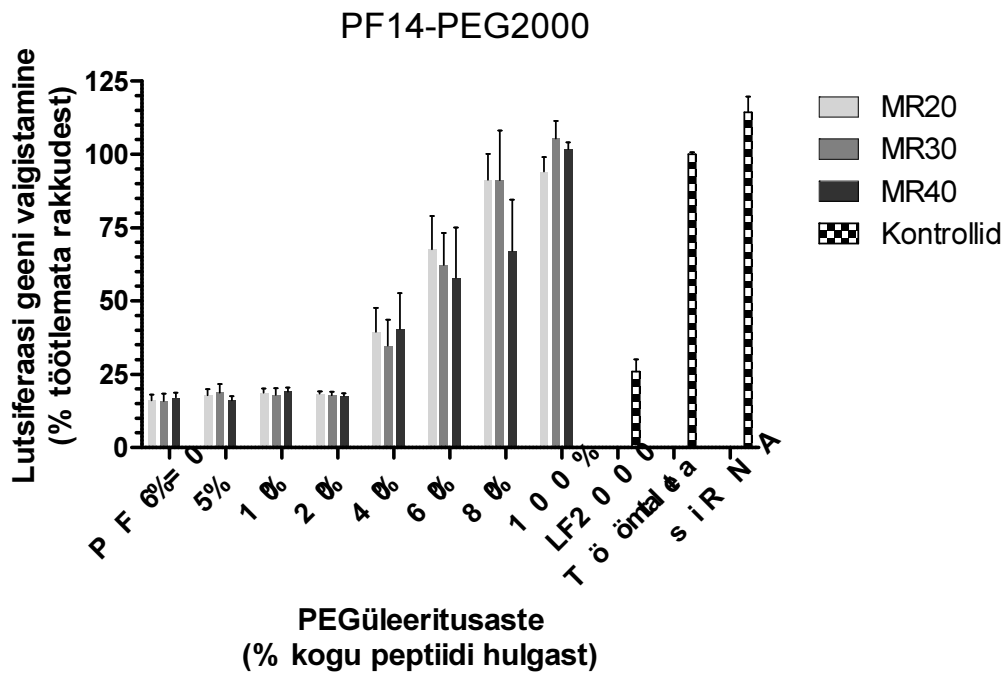
**Joonis 6. PF14-PEG1000 ja PF6-ga koformuleeritud siRNA nanopartiklite füsikokeemilised omadused erinevates tingimustes MR30 juures. Nanopartiklite suurus erinevatel PEGüleeritusastmetel MQ vees (A). Füsioloogilise osmootsus ja pH (vastavalt Glükoos 5% ja HBG5%) mõju nanopartiklite suursele (B) ning ζ-potentsiaalile (C).**

## Geeni vaigistamine rakukultuuris

Selleks, et näha kuidas PEGüleerimine mõjutab RSP/siRNA komplekside bioloogilist efekti rakkude sisemuses kasutati stabiilselt lutsiferaasi geeni ekspresseerivat inimese glioomi rakuliini. Vastava geeni vaigistamiseks moodustati kompleksid siRNA-ga, mille seostumisel komplementaarse mRNA-le toimub mRNA lõikamine ning vastavat lutsiferaasi valku ei sünteesita. Katse tulemustes avaldub see lutsiferaasi substraadi lutsiferiini lisamisel luminesentsi vähenemisena, mida on väljendatud protsentides töötlemata rakkude (100%) luminesentsist. Kompleksid moodustati kolme erineva MR juures sarnaselt tabelis 2 toodud protokollile kõigi kolme PEGüleeritud peptiidiga: PF14-PEG<sub>12</sub>, PF14-PEG1000, PF14-PEG2000. Tulemused näitavad, et PEGüleeritud peptiidid ise (joonisel märgitud 100%) pole võimelised siRNA-sid rakkude tsütoplasmasse transportima (vt joonis 7A-C). See on ka loogiline, kuna täielik PEGüleeritus blokeerib RSP-dega moodustatud partiklite võimet seostuda ning siseneda rakkudesse ning vähendab endosoomidest vabanemise efektiivsust. Teiseks, kuni pegüleeritusastmeni 20% PEGüleeritud peptiidid siRNA transpordi efektiivsust ei mõjuta (vt joonis 7B,C), PF14-PEG<sub>12</sub> puhul (vt joonis 7A) püsib efekt isegi 40% juures samal platool ainult PF6-ga (joonisel märgitud PF6=0%). Pikemate PEGi ahelate korral hakkab bioloogiline efekt vähenema 40% juures ning on märgata trendi, et pikematel PEGi ahelatel on bioloogilise aktiivsusele tugevam negatiivne mõju.

**A**



**B****C**

**Joonis 7. Geenivaigistamine rakukultuuris.** PEGüleerimise mõju hindamiseks nanopartiklite võimele transportida geneetilist materjali raku sisse moodustati kompleksid PEGüleeritusastmetel 0%-100% ning molaarsuhetel MR20-MR30 koformulatsioonis erinevate PEGüleeritud peptiididega: (A) PF14-PEG<sub>12</sub>, (B) PF14-PEG1000 ning (C) PF14-PEG2000.

## Kokkuvõte

Nukleiinhapped (NH-d) ja nende sünteetilised oligonukleotiidsed analoogid (ON-d) on väga perspektiivikad ravimolekulid, mis võimaldavad ligipääsu erinevate haiguste tekkepõhjustele molekulaarsel tasandil ning sellised geeniterapeutilised meetodid on pälvinud viimasel ajal suurt tähelepanu. NH-de ja ON-de füsikokeemilistest omadustest tingituna on nende jõudmine oma toimekohale rakkude sisemuses oluliselt piiratud ning seega vajavad nad enamjaolt sinna jõudmiseks transportvektorite abi. Rakku sisenevad peptiidid (RSP-d) on üks grupp mitteviraalseid transportvektoreid, mis suudavad moodustada NH-dega nanomõõtmelised osakesi (nanopartikleid), mis võimaldavad nende efektiivset transporti *in vitro* rakukultuuri mudelites. Selliste nanopartiklite omadused, näiteks pinnalaeng, aga mõjutavad nende käitumist *in vivo* tingimustes ning tihti vähendavad nende biosaadavust. Üheks võimaluseks nende biosaadavust parandada on transportvektorite polüetüleen glükooliga (PEG-ga) modifitseerimine ehk PEGüleerimine.

Käesolevas töös on ON-de *in vivo* biosaadavuse parandamise eesmärgil PEGüleeritud RSP-d, PepFect14, mille puhul on eelnevalt näidatud, et see on väga efektiivne nii lühikeste kui pikkade NH-de transpordil *in vitro*. Saadud tulemused näitavad, et PEGüleeritud peptiidid vajavad ON-de bioloogiliselt aktiivsetesse nanopartiklitesse komplekseerimiseks teiste transportvektorite abi. Selleks me kasutasime antud töös RSP-d PepFect6-te, mille nii *in vitro* kui *in vivo* ON-de transpordipotentsiaal on eelnevalt kirjeldatud. Tulemused näitavad, et osaliselt PEGüleeritud nanopartiklid on sobivamate füsikokeemiliste omadustega kui ainult PepFect6/ON nanopartiklid, neutraliseerides nende pinnalaengut ka füsioloogilise pH ja osmootsuse juures, mis on olulised parameetrid *in vivo* manustamise juures. Seejuures jäävad osaliselt PEGüleeritud nanopartiklid 100-200 nm suurusteks ning võimaldavad kuni 80%-list geenivaigistamist inimese ajuvähi rakkudes. Kokkuvõtteks tuleb selle PEGüleerimismeetodi reaalse potentsiaali mõistmiseks hinnata seda *in vivo* tingimustes.

## **Synthesis of PEGylated CPP, PepFect14, and evaluation of its delivery efficiency of oligonucleotides together with PepFect6**

Tõnis Lehto

### **Summary**

Nucleic acids (NA-s) and synthetic oligonucleotides (ON-s) are very promising therapeutic molecules, which allow the access to the causes of different diseases on molecular level. Hence they have gained a lot of attention lately. However, due to their physicochemical properties, they are not able to reach to their site of action inside the cell by themselves and therefore they need the help of delivery vectors. Cell-penetrating peptides are one group of non-viral delivery vectors that form nano-sized particles with NA-s (nanoparticles), which facilitate their efficient delivery in cell culture models *in vitro*. Physicochemical properties of these nanoparticles such as surface charge influence their behavior in *in vivo* conditions and therefore might decrease their bioavailability. One of the most exploited methods to increase the *in vivo* bioavailability of gene therapeutic carriers is to modify them with polyethylene glycol (PEG), termed PEGylation.

In this study, PepFect14, previously shown as very efficient delivery vector for short and long NA-s *in vitro*, was PEGylated with the aim to increase the *in vivo* bioavailability of its payload. The results show that PEGylated peptides need the help of additional delivery vectors to facilitate efficient complexation of ON-s into bioactive nanoparticles. Therefore, second CPP, PepFect6, with previously well described delivery potential for ONs in both *in vitro* and *in vivo* conditions, was introduced. The results show partially PEGylated nanoparticles have more favourable physicochemical properties, as their addition of PEG helped to neutralize the surface charge also at physiological pH and osmolarity, while the size of the nanoparticles remained between 100-200 nm, which is important from the *in vivo* administration point-of-view. Also these partially PEGylated nanoparticles facilitated upto 80% gene knock-down in human glioma cell line. Conclusively, to understand the true potential of this PEGylation method it has to be tested in relevant *in vivo* conditions.

## Kasutatud kirjanduse loetelu

- [1] P. de Jong, J.J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y.J. Chen, C. Int Human Genome Sequencing, Initial sequencing and analysis of the human genome (vol 409, pg 860, 2001), *Nature* 412 (2001) 565-6.
- [2] T. Wirth, N. Parker, S. Yla-Herttuala, History of gene therapy, *Gene* 525 (2013) 162-9.
- [3] S. Nayak, R.W. Herzog, Progress and prospects: immune responses to viral vectors, *Gene Therapy* 17 (2010) 295-304.
- [4] C.E. Thomas, A. Ehrhardt, M.A. Kay, Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy, *Nature Reviews Genetics* 4 (2003) 346-58.
- [5] R.W. Herzog, O. Cao, A. Srivastava, Two decades of clinical gene therapy--success is finally mounting, *Discovery medicine* 9 (2010) 105-11.
- [6] T. Wang, J.R. Upponi, V.P. Torchilin, Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: Dilemmas and strategies, *International Journal of Pharmaceutics* 427 (2012) 3-20.
- [7] J.M. Lee, T.J. Yoon, Y.S. Cho, Recent Developments in Nanoparticle-Based siRNA Delivery for Cancer Therapy, *Biomed Research International* (2013).
- [8] E.D. Karagiannis, A.M. Urbanska, G. Sahay, J.M. Pelet, S. Jhunjhunwala, R. Langer, D.G. Anderson, Rational Design of a Biomimetic Cell Penetrating Peptide Library, *Acs Nano* 7 (2013) 8616-26.
- [9] K. Sen, M. Mandal, Second generation liposomal cancer therapeutics: Transition from laboratory to clinic, *International Journal of Pharmaceutics* 448 (2013) 28-43.
- [10] K. Lappalainen, I. Jaaskelainen, K. Syrjanen, A. Urtili, S. Syrjanen, COMPARISON OF CELL-PROLIFERATION AND TOXICITY ASSAYS USING 2 CATIONIC LIPOSOMES, *Pharmaceutical Research* 11 (1994) 1127-31.
- [11] I. Chemin, D. Moradpour, S. Wieland, W.B. Offensperger, E. Walter, J.P. Behr, H.E. Blum, Liver-directed gene transfer: a linear polyethylenimine derivative mediates highly efficient DNA delivery to primary hepatocytes in vitro and in vivo, *Journal of Viral Hepatitis* 5 (1998) 369-75.
- [12] C.W. Pouton, P. Lucas, B.J. Thomas, A.N. Uduehi, D.A. Milroy, S.H. Moss, Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids, *Journal of Controlled Release* 53 (1998) 289-99.
- [13] R.Q. Huang, Y.H. Qu, W.L. Ke, J.H. Zhu, Y.Y. Pei, C. Jiang, Efficient gene delivery targeted to the brain using a transferrin-conjugated polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer, *Faseb Journal* 21 (2007) 1117-25.
- [14] M.E. Davis, J.E. Zuckerman, C.H.J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C.A. Alabi, Y. Yen, J.D. Heidel, A. Ribas, Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles, *Nature* 464 (2010) 1067-U140.
- [15] K.A. Howard, U.L. Rahbek, X.D. Liu, C.K. Damgaard, S.Z. Glud, M.O. Andersen, M.B. Hovgaard, A. Schmitz, J.R. Nyengaard, F. Besenbacher, J. Kjems, RNA interference in vitro and in vivo using a chitosan/siRNA nanoparticle system, *Molecular Therapy* 14 (2006) 476-84.
- [16] Z.H. Zhang, X.Y. Yang, Y. Zhang, B. Zeng, Z.J. Wang, T.H. Zhu, R.B.S. Roden, Y.S. Chen, R.C. Yang, Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled carbon nanotubes suppresses tumor growth, *Clinical Cancer Research* 12 (2006) 4933-9.
- [17] Z. Medarova, W. Pham, C. Farrar, V. Petkova, A. Moore, In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors, *Nature Medicine* 13 (2007) 372-7.

- [18] P. Subramaniam, S.J. Lee, S. Shah, S. Patel, V. Starovoytov, K.B. Lee, Generation of a Library of Non-Toxic Quantum Dots for Cellular Imaging and siRNA Delivery, *Advanced Materials* 24 (2012) 4014-9.
- [19] A.C. Bonoiu, S.D. Mahajan, H. Ding, I. Roy, K.T. Yong, R. Kumar, R. Hu, E.J. Bergey, S.A. Schwartz, P.N. Prasad, Nanotechnology approach for drug addiction therapy: Gene silencing using delivery of gold nanorod-siRNA nanoplex in dopaminergic neurons, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009) 5546-50.
- [20] M. Roser, D. Fischer, T. Kissel, Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 46 (1998) 255-63.
- [21] F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, O.C. Farokhzad, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics* 5 (2008) 505-15.
- [22] J.R. Viola, S. El-Andaloussi, Oprea, II, C.I.E. Smith, Non-viral nanovectors for gene delivery: factors that govern successful therapeutics, *Expert Opinion on Drug Delivery* 7 (2010) 721-35.
- [23] F. Braet, E. Wisse, P. Bomans, P. Frederik, W. Geerts, A. Koster, L. Soon, S. Ringer, Contribution of high-resolution correlative imaging techniques in the study of the liver sieve in three-dimensions, *Microscopy Research and Technique* 70 (2007) 230-42.
- [24] S.K. Hobbs, W.L. Monsky, F. Yuan, W.G. Roberts, L. Griffith, V.P. Torchilin, R.K. Jain, Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998) 4607-12.
- [25] H. Maeda, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Advances in Enzyme Regulation*, Vol 41 41 (2001) 189-207.
- [26] K. Greish, Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: A royal gate for targeted anticancer nanomedicines, *Journal of Drug Targeting* 15 (2007) 457-64.
- [27] R. Gref, Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, BIODEGRADABLE LONG-CIRCULATING POLYMERIC NANOSPHERES, *Science* 263 (1994) 1600-3.
- [28] C. Kojima, C. Regino, Y. Umeda, H. Kobayashi, K. Kono, Influence of dendrimer generation and polyethylene glycol length on the biodistribution of PEGylated dendrimers, *International Journal of Pharmaceutics* 383 (2010) 293-6.
- [29] H. Hatakeyama, H. Akita, K. Kogure, M. Oishi, Y. Nagasaki, Y. Kihira, M. Ueno, H. Kobayashi, H. Kikuchi, H. Harashima, Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid, *Gene Therapy* 14 (2007) 68-77.
- [30] M. Morille, T. Montier, P. Legras, N. Carmoy, P. Brodin, B. Pitard, J.P. Benoit, C. Passirani, Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting, *Biomaterials* 31 (2010) 321-9.
- [31] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, P. Simard, J.C. Leroux, J.P. Benoit, Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 78A (2006) 620-8.
- [32] H. Hatakeyama, H. Akita, H. Harashima, A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: A strategy for overcoming the PEG dilemma, *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 152-60.

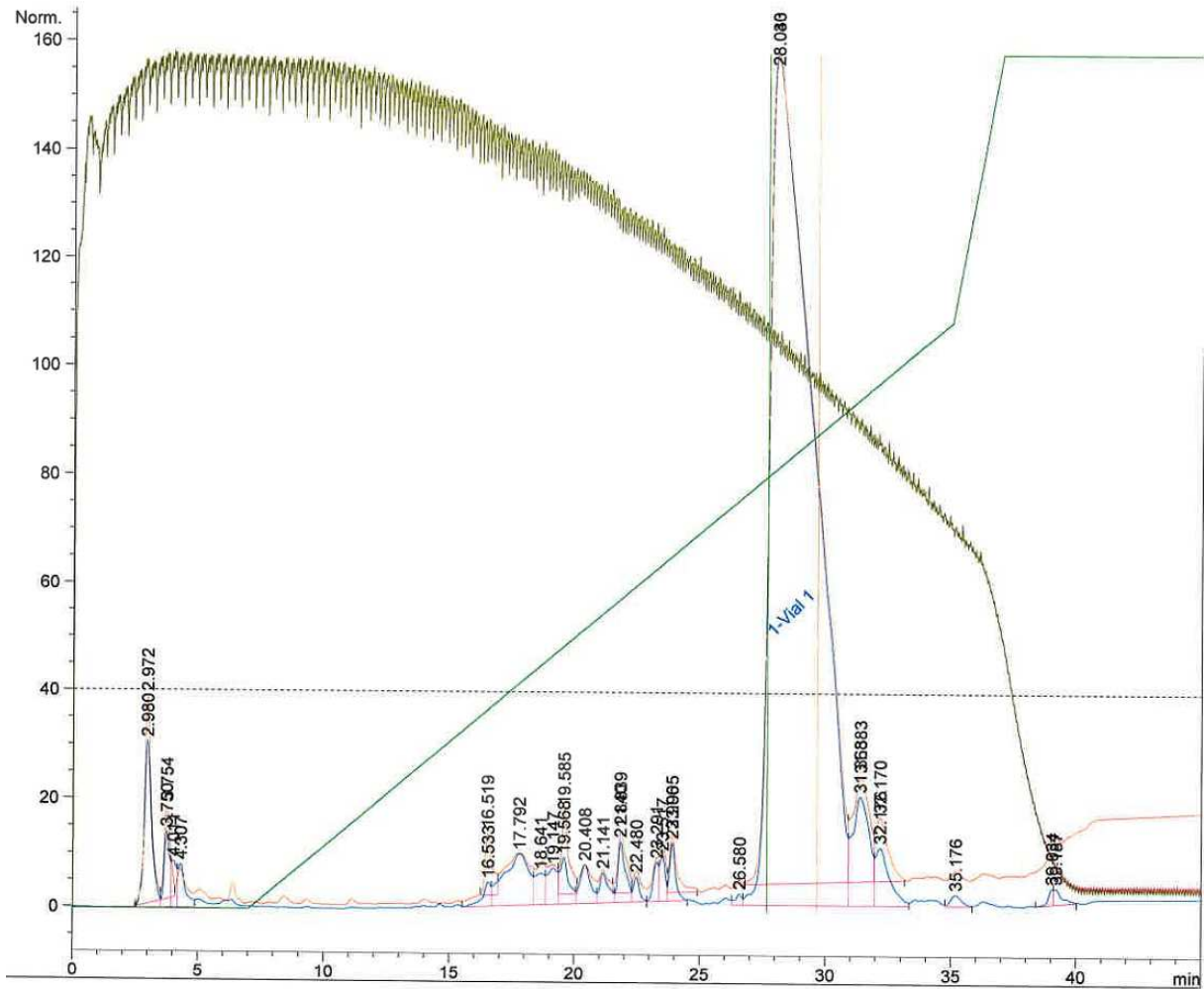
- [33] R.V. Benjaminsen, M.A. Matthebjerg, J.R. Henriksen, S.M. Moghimi, T.L. Andresen, The Possible "Proton Sponge" Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal pH, *Molecular Therapy* 21 (2013) 149-57.
- [34] M. Mae, S. El Andaloussi, P. Lundin, N. Oskolkov, H.J. Johansson, P. Guterstam, U. Langel, A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy, *Journal of Controlled Release* 134 (2009) 221-7.
- [35] T. Lehto, O.E. Simonson, I. Mager, K. Ezzat, H. Sork, D.M. Copolovici, J.R. Viola, E.M. Zaghoul, P. Lundin, P.M.D. Moreno, M. Mae, N. Oskolkov, J. Suhorutsenko, C.I.E. Smith, S.E.L. Andaloussi, A Peptide-based Vector for Efficient Gene Transfer In Vitro and In Vivo, *Molecular Therapy* 19 (2011) 1457-67.
- [36] I.A. Khalil, S. Futaki, M. Niwa, Y. Baba, N. Kaji, H. Kamiya, H. Harashima, Mechanism of improved gene transfer by the N-terminal stearylation of octaarginine: enhanced cellular association by hydrophobic core formation, *Gene Therapy* 11 (2004) 636-44.
- [37] K.M. Stewart, K.L. Horton, S.O. Kelley, Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine, *Organic & Biomolecular Chemistry* 6 (2008) 2242-55.
- [38] P. Jarver, U. Langel, The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation, *Drug Discovery Today* 9 (2004) 395-402.
- [39] A.D. Frankel, C.O. Pabo, CELLULAR UPTAKE OF THE TAT PROTEIN FROM HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS, *Cell* 55 (1988) 1189-93.
- [40] M. Green, P.M. Loewenstein, AUTONOMOUS FUNCTIONAL DOMAINS OF CHEMICALLY SYNTHESIZED HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TAT TRANS-ACTIVATOR PROTEIN, *Cell* 55 (1988) 1179-88.
- [41] A.H. Joliot, A. Triller, M. Volovitch, C. Pernelle, A. Prochiantz, ALPHA-2,8-POLYSIALIC ACID IS THE NEURONAL SURFACE-RECEPTOR OF ANTENNAPEDIA HOMEODOMAIN PEPTIDE, *New Biologist* 3 (1991) 1121-34.
- [42] D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, THE 3RD HELIX OF THE ANTENNAPEDIA HOMEODOMAIN TRANSLOCATES THROUGH BIOLOGICAL-MEMBRANES, *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 10444-50.
- [43] S. El-Andaloussi, H.J. Johansson, P. Lundberg, U. Langel, Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids, *Journal of Gene Medicine* 8 (2006) 1262-73.
- [44] S.E.L. Andaloussi, T. Lehto, I. Mager, K. Rosenthal-Aizman, Oprea, II, O.E. Simonson, H. Sork, K. Ezzat, D.M. Copolovici, K. Kurrikoff, J.R. Viola, E.M. Zaghoul, R. Sillard, H.J. Johansson, F.S. Hassane, P. Guterstam, J. Suhorutsenko, P.M.D. Moreno, N. Oskolkov, J. Halldin, U. Tedebark, A. Metspalu, B. Lebleu, J. Lehtio, C.I.E. Smith, U. Langel, Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo, *Nucleic Acids Research* 39 (2011) 3972-87.
- [45] K. Ezzat, H. Helmfors, O. Tudoran, C. Juks, S. Lindberg, K. Padari, S. El-Andaloussi, M. Pooga, U. Langel, Scavenger receptor-mediated uptake of cell-penetrating peptide nanocomplexes with oligonucleotides, *Faseb Journal* 26 (2012) 1172-80.
- [46] S. Deshayes, K. Konate, G. Aldrian, L. Crombez, F. Heitz, G. Divita, Structural polymorphism of non-covalent peptide-based delivery systems: Highway to cellular uptake, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1798 (2010) 2304-14.
- [47] M.C. Morris, P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz, G. Divita, A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells, *Nucleic Acids Research* 25 (1997) 2730-6.
- [48] M. Pooga, M. Hallbrink, M. Zorko, U. Langel, Cell penetration by transportan, *Faseb Journal* 12 (1998) 67-77.
- [49] U. Soomets, M. Lindgren, X. Gallet, M. Hallbrink, A. Elmquist, L. Balaspiri, M. Zorko, M. Pooga, R. Bresseur, U. Langel, Deletion analogues of transportan, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1467 (2000) 165-76.

- [50] V.C. Bond, B. Wold, POLY-L-ORNITHINE-MEDIATED TRANSFORMATION OF MAMMALIAN-CELLS, *Molecular and Cellular Biology* 7 (1987) 2286-93.
- [51] K. Ezzat, S. El Andaloussi, E.M. Zaghloul, T. Lehto, S. Lindberg, P.M.D. Moreno, J.R. Viola, T. Magdy, R. Abdo, P. Guterstam, R. Sillard, S.M. Hammond, M.J.A. Wood, A.A. Arzumanov, M.J. Gait, C.I.E. Smith, M. Hallbrink, U. Langel, PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation, *Nucleic Acids Research* 39 (2011) 5284-98.
- [52] K.L. Veiman, I. Mager, K. Ezzat, H. Margus, T. Lehto, K. Langel, K. Kurrikoff, P. Arukuusk, J. Suhorutsenko, K. Padari, M. Pooga, U. Langel, PepFect14 Peptide Vector for Efficient Gene Delivery in Cell Cultures, *Molecular Pharmaceutics* 10 (2013) 199-210.
- [53] R.B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *Journal of the American Chemical Society* 85 (1963) 2149-54.
- [54] U. Soomets, M. Zilmer, I. Langel, *Manual Solid Phase Synthesis of Glutathione Analogs, Peptide Synthesis and Applications*, 2005, pp. 241-57.
- [55] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2 (1988) 151-3.
- [56] R.C. Beavis, T. Chaudhary, B.T. Chait, ALPHA-CYANO-4-HYDROXYCINNAMIC ACID AS A MATRIX FOR MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION MASS-SPECTROMETRY, *Organic Mass Spectrometry* 27 (1992) 156-8.
- [57] R. Pecora, Doppler Shifts in Light Scattering from Pure Liquids and Polymer Solutions, *The Journal of Chemical Physics* 40 (1964) 1604-14.
- [58] W. Tscharnuter, *Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing*, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [59] V.A. Hackley, J.D. Clogston, Measuring the Hydrodynamic Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering, *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, 2009, pp. 35-52.
- [60] A. Fire, S.Q. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 391 (1998) 806-11.
- [61] K.A. Whitehead, R. Langer, D.G. Anderson, Knocking down barriers: advances in siRNA delivery, *Nature Reviews Drug Discovery* 8 (2009) 129-38.
- [62] A.H. van Asbeck, A. Beyerle, H. McNeill, P.H.M. Bovee-Geurts, S. Lindberg, W.P.R. Verdurmen, M. Hallbrink, U. Lange, O. Heidenreich, R. Brock, Molecular Parameters of siRNA-Cell Penetrating Peptide Nanocomplexes for Efficient Cellular Delivery, *Acs Nano* 7 (2013) 3797-807.
- [63] M. Glodde, S.R. Sirsi, G.J. Lutz, Physicochemical properties of low and high molecular weight poly(ethylene glycol)-grafted poly(ethylene imine) copolymers and their complexes with oligonucleotides, *Biomacromolecules* 7 (2006) 347-56.

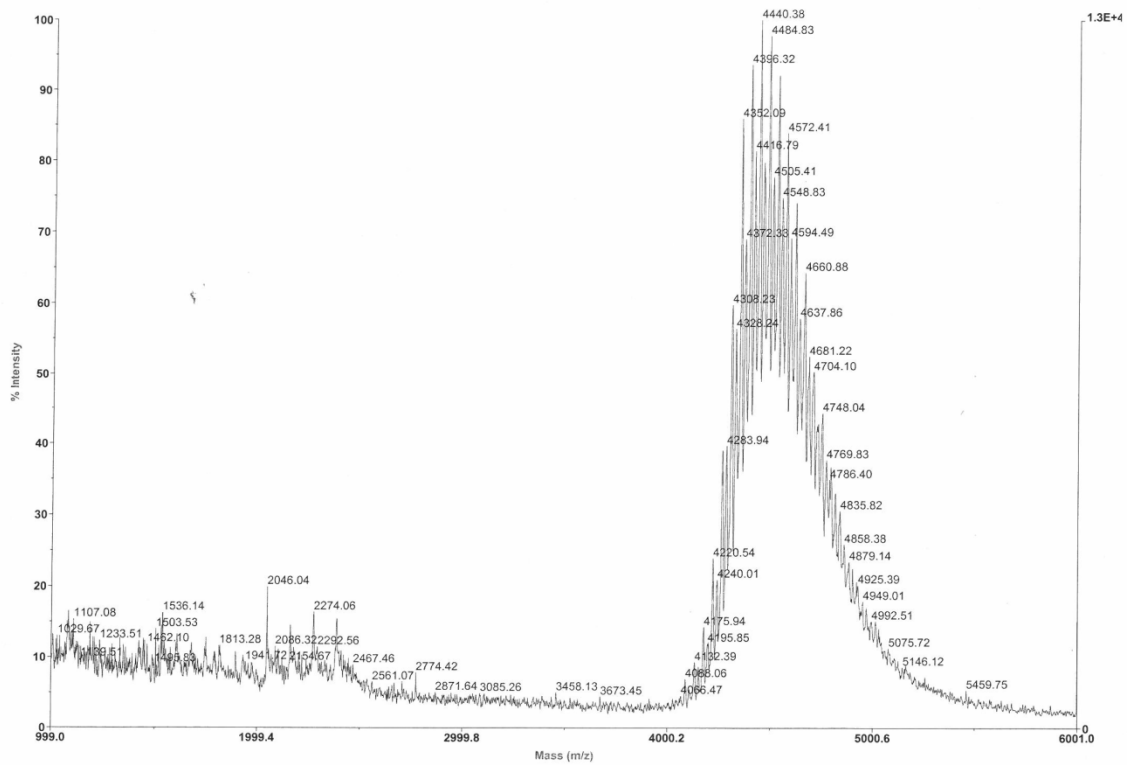
# Lisad

## Lisa 1

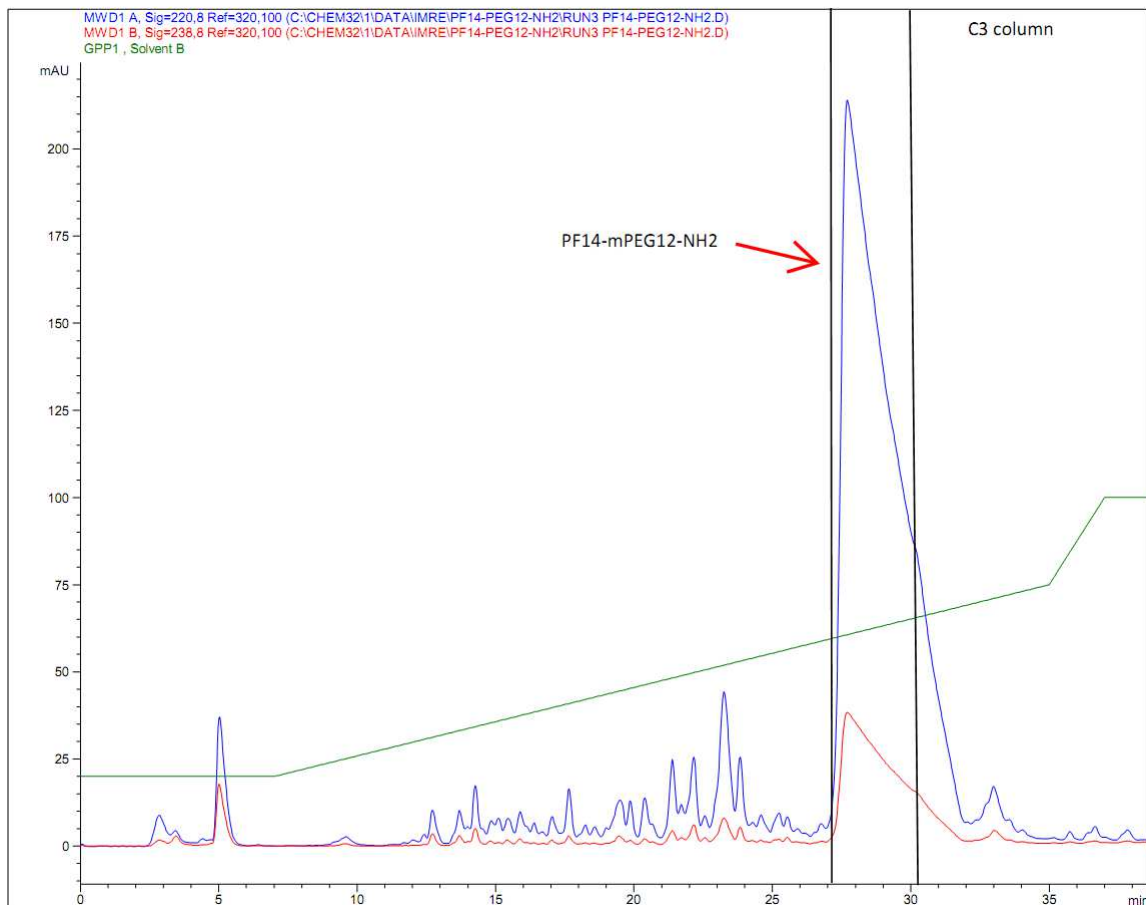
Kasutatud siRNA järjestus: antisense ahel 5'-GAAGUGCUCGUCCUCGUCC-UU ja sense ahel 5'-GGACGAGGACGAGCACUUC-UU.



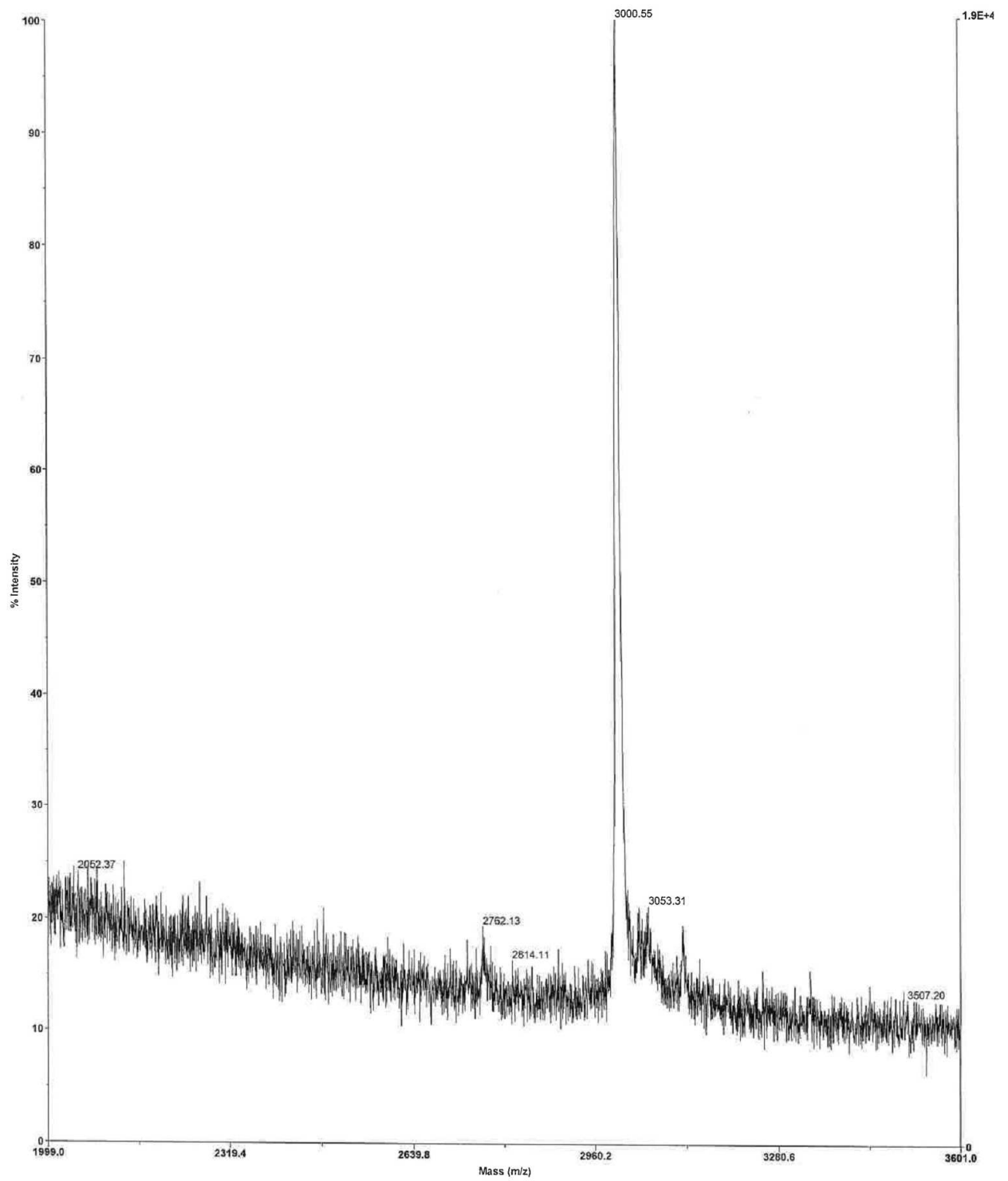
Lisa 2. PF14-PEG2000 RP-HPLC kromatogramm



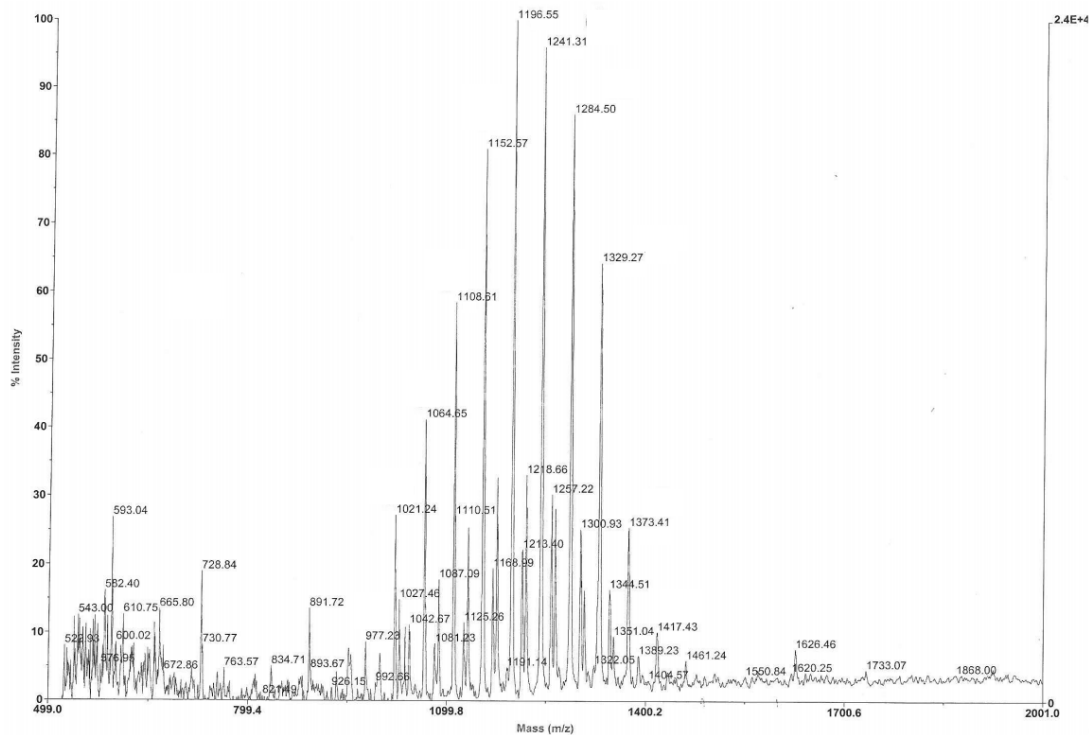
Lisa 3. PF14-PEG2000 massispekter peale puhastamist RP-HPLC-ga



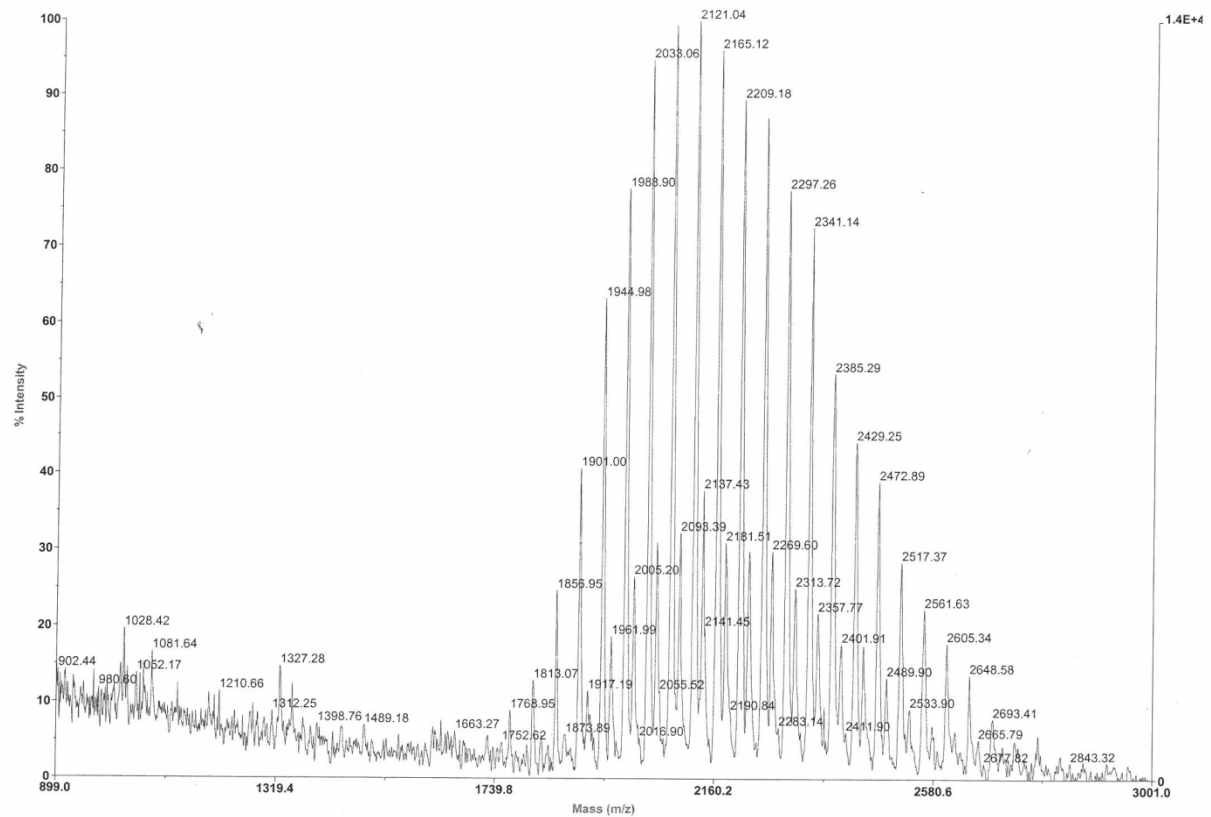
Lisa 4. PF14-PEG<sub>12</sub> RP-HPLC kromatogramm



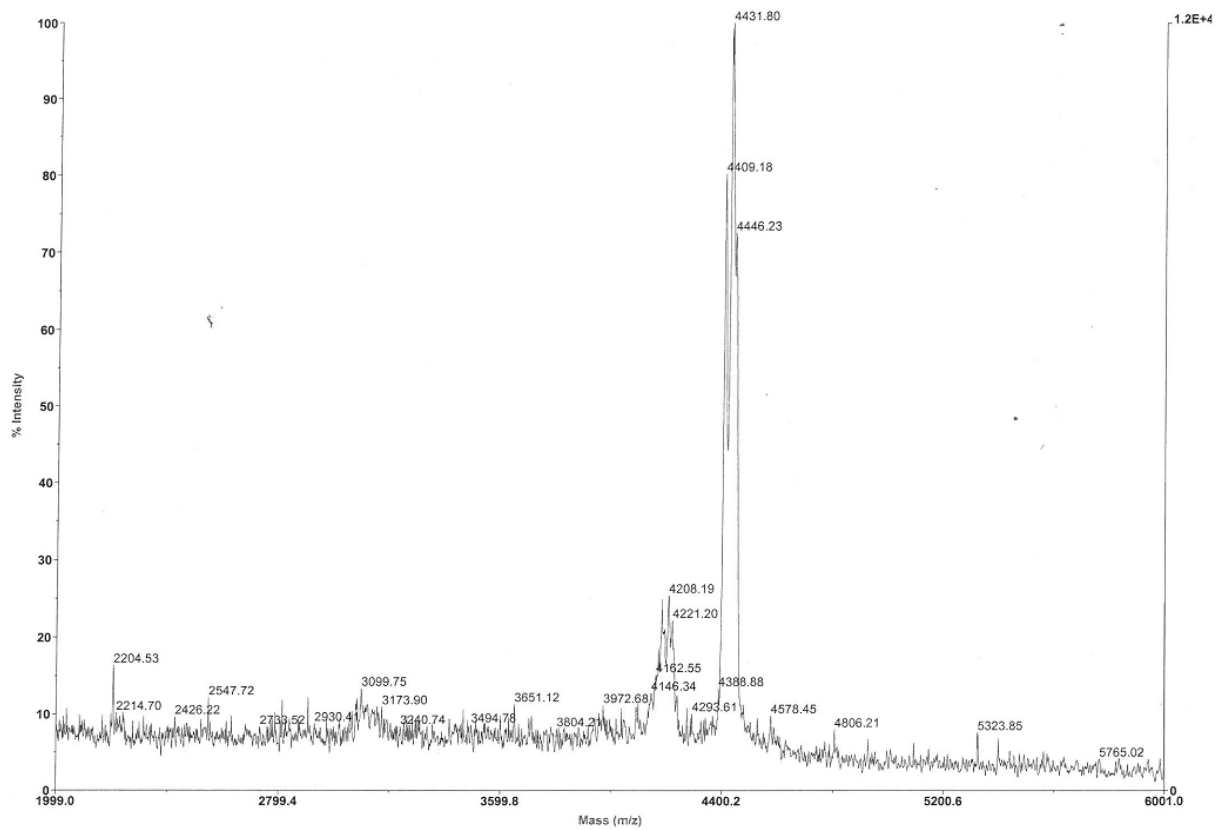
Lisa 5. PF14-PEG<sub>12</sub> massispekter peale puhastamist RP-HPLC-ga



Lisa 6. Kasutatud Fmoc-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-PEG1000-CH<sub>2</sub>COOH polümeeri massispekter peale Fmoc rühma eemaldamist piperidiiniga



Lisa 7. Kasutatud Fmoc-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-PEG2000-CH<sub>2</sub>COOH polümeeri massispekter peale Fmoc rühma eemaldamist piperidiiniga



Lisa 8. PF6 massispekter peale puhastamist RP-HPLC-ga

## Lihlitsents

### Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Tõnis Lehto

*(autori nimi)*

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose  
Rakku siseneva peptiidi, PepFect14, funktsionaliseerimine PEG polümeeriga ning tema  
rakendamine oligonukleotiidide transpordiks koos PepFect6-ga

*(lõputöö pealkiri)*

mille juhendaja on Ülo Langel,  
*(juhendaja nimi)*

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
  3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **29.05.2014**