

CNIC-01992

CAEP-0255

# 基因靶向肽核酸的合成及放射性核素 标记研究进展

宋宏涛 张华明 高 晖

(中国工程物理研究院核物理与化学研究所, 绵阳, 621900)

## 摘 要

肽核酸(PNA)作为一种反义核酸类化合物,是DNA模拟物,能与DNA和RNA以序列特异性方式结合,在分子水平的基因研究和基因治疗方面有其独特的优越性和广泛的应用前景。为了优化肽核酸的性质,许多PNA类似物也被合成出来,以改良PNA性能、拓宽DNA应用。对具有特异基因靶向亲和性的长链PNA分子进行修饰后,用放射性核素标记,可达到在放射性肿瘤治疗上靶向明确和对非靶组织最小损伤的目的,对于基因水平的肿瘤治疗具有十分重要的应用研究意义。文章综述了PNA及其类化合物的基本合成思路和主要合成路线,同时对放射性核素标记PNA类物质的相关研究进行了评述和展望。

**关键词:** 肽核酸 单体 核苷酸 基因靶向

# Summarization on the Synthesis and Radionuclide-labeling of Peptide Nucleic Acid for An Oligonucleotide Analogue

*(In Chinese)*

SONG Hongtao ZHANG Huaming GAO Hui

(Institute of Nuclear Physics and Chemistry, CAEP, Mianyang, 621900)

## ABSTRACT

Peptide nucleic acid (PNA), which is one kind of antisense nucleic acid compounds and an oligonucleotide analogue that binds strongly to DNA and RNA in a sequence specific manner, has its unique advantages in the field of molecular diagnostics and treatment of diseases. Now, people gradually attach more importance to PNA. To optimize the application of PNA in genetic research and therapy, a great number of backbone modifications on the newly-type structures of PNA were synthesized to improve its physicochemical properties, such as hybridization speciality, solubility in biofluid, or cell permeability. The modified PNA labeled with radionuclides, which can obtain the aim at specific target and minimal non-target trauma, has important role in research and application of tumorous genitherapy. Here a review on the basic synthesis idea and several primary synthetic methods of PNA analogs was given, and also correlative studies and expectation on the compounds belonging to PNA series labeled with radionuclides were included.

**Key words:** Peptide nucleic acid, Monomer, Oligonucleotide, Gene-target

# 引言

肽核酸因其结构介于多肽和核酸之间而被命名为 Peptide Nucleic Acid, 简称为 PNA, 是由丹麦哥本哈根大学 Riso 实验室的有机化学家 O Buchardt 和生物化学家 P E Nielsen 于 20 世纪 80 年代开始潜心研究的一种新的核酸序列特异性试剂, 是在第一、第二代反义试剂的基础上, 通过计算机设计构建并最终人工合成的第三代反义试剂<sup>[1]</sup>。

PNA 是由酰胺键连接的 N-(2-氨基乙基)-甘氨酸结构置换核酸分子中带电荷的磷酸戊糖骨架, 形成了电中性、非手性、类似多肽的主体骨架, 碱基经亚甲基羰基与氨基氮原子相连<sup>[2]</sup>。PNA 是一种全新的 DNA 类似物, 可序列特异地靶向作用于 DNA 的大沟槽, 与互补的 DNA、RNA 杂交; 同时, 由于其结构的特殊性决定了它具有一些特有的性质, 克服了寡核苷酸及其修饰物的一些缺点与不足, 使其不易受核酸酶或蛋白酶降解, 与互补的 DNA 或 RNA 序列杂交有极强的特异性、热稳定性和很好的生物稳定性, 可以与配基相连进入细胞等。

PNA 是较为成功的 DNA 和 RNA 的类似物, 势必成为一类新的以基因为靶的制剂而得到开发应用。同时, 它与反义、杂交等技术相结合有望成为取代寡核苷酸进行临床医疗和生物检测的有效试剂<sup>[3]</sup>。目前, PNA 已经在基因诊断<sup>[4]</sup>、基因治疗药物开发<sup>[5]</sup>、生物传感器<sup>[6]</sup>以及作为分子生物学和生物技术的分子工具<sup>[7]</sup>等方面得到较为广泛的应用。

## 1 PNA 的结构特点

PNA 的结构如图 1 所示<sup>[8]</sup>。

由于肽核酸和 DNA 除了核碱基外, 没有共同的功能团, 所以 PNA 的化学稳定性与 DNA 存在明显差异。用强酸处理, 可引起 DNA 的嘌呤脱落, 而 PNA 对酸则相当稳定。不过, 在氨基端的游离氨基可能是化学不稳定的, 特别是在碱性条件下, 通过环闭合可发生核碱基乙酸的 N-酰化转移或氨基端 PNA 的切割。由于 PNA 的电中性, 因此与 DNA 相比水溶性较差。根据 PNA 寡聚物的序列不同, PNA 分子有发生不同程度聚集的趋势。PNA 的溶解也与寡聚物的长度以及嘌呤/嘧啶的比例有关。一些修饰包括嵌入带正电荷的赖氨酸残基(羧基端或骨架修饰), 可以改善 PNA 的溶解度。也可引入负电荷, 尤其是对 PNA-DNA 嵌合物, 会增加其水溶解度。PNA 单体的消光系数与 DNA 或 RNA 单体的不同, 这是因为不同的骨架结构

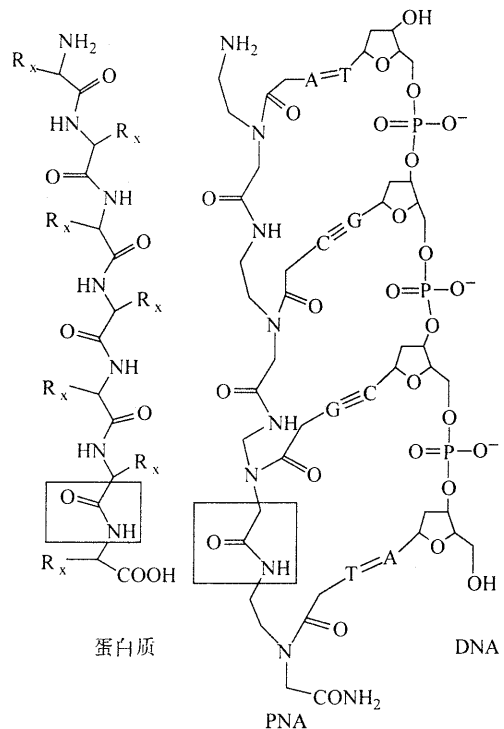


图 1 PNA 的化学结构与蛋白质和 DNA 的比较

会对核碱基的  $\pi$  体系产生不同的影响。由于不同的 PNA 单体的消光系数还没有确定, 而且肽骨架对核碱基  $\pi$  体系的影响大小还是未知的, 这样在实际应用当中, PNA 寡聚物的浓

度是通过测定在 80 °C 时 260 nm 处的吸收来进行的。在该温度下,核碱基的堆积得到完全解除,而且来自有序骨架的贡献可以忽略。

在一定条件下,PNA 可与靶基因形成极为稳定的 PNA<sub>2</sub>-DNA 分子,10 个碱基长度的 PNA 与 DNA 形成的三螺旋的  $T_m$  值可达 60~90 °C。PNA 以一种序列依赖的方式与互补的 DNA 和 RNA 序列杂交,遵从 Watson-Crick 氢键结合准则,也可形成既包含 Watson-Crick 又包含 Hoogsteen 碱基配对的三链体结构<sup>[9]</sup>。PNA 靶向作用于双链 DNA 时有以下 4 种结合方式,如图 2 所示<sup>[10]</sup>。

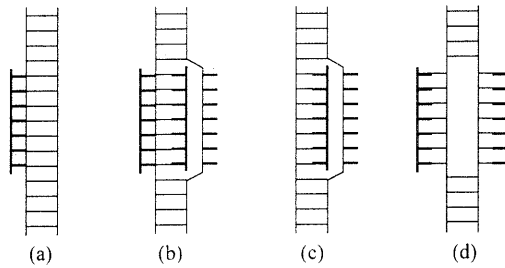


图 2 PNA 靶向作用于双链 DNA 的结合方式

(a)传统的三链体结构,由多聚嘧啶 PNA 与互补的多聚嘌呤 DNA 靶标结合;(b)稳定的三链体入侵复合物,导致右侧被取代的 DNA 单链形成 D 环结构;(c)标准的多聚嘌呤 PNA 入侵双链 DNA;(d) PNA 双重双链入侵,形成稳定的复合物,但只发生在含有修饰碱基的 PNA 分子上

其中,一条全嘧啶的 DNA 或 RNA 链与两条序列互补的 PNA 链间形成杂交复合体时,不是常规的(PNA)<sub>2</sub>-DNA 三链体,而是形成一种三链侵入复合物(其中 DNA 双链体被一内部的(PNA)<sub>2</sub>-DNA 三链体所侵入)。另外,对混合嘌呤-嘧啶序列的靶标来说,只要其有适量的 A/T 含量(约 50%),就能形成十分稳定的双重双链体复合物,因此双重双链体侵入方式被认为是非常重要的。

PNA-DNA 杂交严格地受碱基错配的影响,PNA 具有对单个碱基错配的分辨能力。相反,碱基错配对相应的 DNA-DNA 杂交的影响则没有这样严重。

由于 PNA 的骨架是不带电的,因此当结合到靶核酸链上没有静电排斥现象。PNA-DNA 或 PNA-RNA 双链的稳定性比天然的同源或异源双链稳定性更强。这样强的稳定性使其热解链温度  $T_m$  值比观察到的 DNA-DNA 和 DNA-RNA 的  $T_m$  值高。另外,PNA 杂交不受盐效应的影响,这就大大便利了 PNA 的杂交。PNA 的非天然骨架也意味着 PNA 可以抵挡蛋白酶和核酸酶的降解。由于对酶解作用的抗性,PNA 的寿命无论在体外还是生物体中都被延长了。同时,由于 PNA 不能被聚合酶识别,所以不能直接用作引物进行复制和转录。

PNA 对 DNA 和 RNA 的特异识别性、非常好的生物稳定性、化学合成的灵活性,使得 PNA 具有无以比拟的基因调控功能和作为分子探针的检测功能,在分子生物学等相关领域发挥优势作用。

## 2 PNA 的合成

作为一种具有特殊肽链骨架的多聚物,目前,有相当一部分合成 PNA 的方法是受多肽

合成的影响,即通过含有氨基端和羧基端的小模块(也即 PNA 的单体)之间的连接来合成。也可以借助一些较为简单灵巧的反应,如 Ugi 多组分缩合反应等。

## 2.1 PNA 单体的合成

典型的 PNA 骨架由 N-(2-氨基乙基)甘氨酸组成,它的第二个氨基被核酸碱基乙酸衍生物酰化。依照结构来看,PNA 单体中的两个肽键是合成的关键,并且其中主要的氨基官能团通常都需要使用保护基团(Protect Group, PG)进行临时保护。因此,通常的合成思路是将其拆成端基 N 带有保护基的氨基乙基甘氨酸酯即主链骨架块和核酸碱基乙酸衍生物即侧链碱基块两个基本建筑块的合成,然后再将两个建筑块以肽键进行连接(如图 3 所示)。

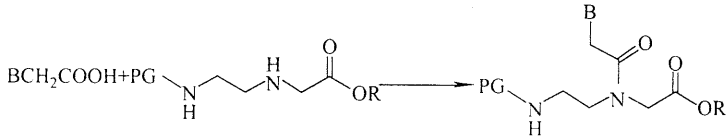


图 3 PNA 单体的合成思路示意图

### 2.1.1 侧链碱基块的合成

核酸碱基乙酸衍生物的合成方法视侧链碱基的不同而不同:

尿嘧啶及胸腺嘧啶乙酸的合成不需要加碱基保护基团就可以直接和溴乙酸甲酯等反应得到 1-位氮被烷化的产物,然后进行无机酸或碱条件下酯的水解。

胞嘧啶乙酸的合成一般先采用苄氧酰基(Cbz-)或取代的苯甲酰基保护环外 4-位伯氨基。

腺嘌呤乙酸的合成,同样可以采用氯代甲酸苯甲酯或取代的苯甲酰氯来保护环外 6-位伯氨基,同时也可以采用 4-甲氧基苯二苯甲基氯(Mmt-Cl)。

鸟嘌呤乙酸的合成,2-位伯氨基保护起来比较困难,一般采用酰基如邻叔丁基苯甲酰氯来进行。

### 2.1.2 主链骨架块的合成

主链骨架的合成是 PNA 合成的重点,依照反应原料和合成路线,主要可以为 4 类:

(1) 以乙二胺或氨基乙腈(氰基可由瑞利 Ni 还原为氨基)为起始原料,与卤代乙酸衍生物进行 N-烷基化取代反应(如图 4 所示),适宜的氨基保护基有苄氧酰基(Fmoc-)、4-甲氧基苯二苯甲基(Mmt-)、叔丁氧羰基(Boc-)等。

(2) 此类反应合成路线中涉及希夫碱的还原,它可以是由氨基丙二醇转化的氨基乙醛与氨基酸形成的希夫碱,可以是乙二胺与乙醛酸形成的希夫碱,也可以是由甘氨酸还原成保护的氨基乙醛与甘氨酸酯形成的希夫碱(如图 5 所示),保护基多采用 Boc-。

(3) 利用保护的氨基乙醇与对硝基苯基甲磺酰基(o-NBS)保护的甘氨酸酯进行 Mitsunobu 反应(如图 6 所示)<sup>[11]</sup>。

(4) 以 Ugi 多组分缩合反应为基础进行的合成。原型反应以胺、羧酸、异腈、醛酮为原料,四组分经由一步缩合生成  $\alpha$ -氨基酰基酰胺类化合物,其中的酸可以是硫酸或磷酸,并且第一步缩合产物在脱去氨基保护基后同样可作为胺组分来进行下一轮的 Ugi 反应<sup>[12]</sup>(如图 7 所示)。

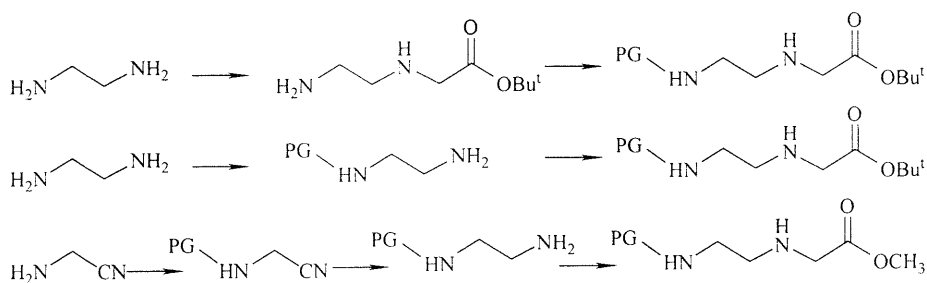


图 4 由 N-烷基化反应合成 PNA 单体骨架

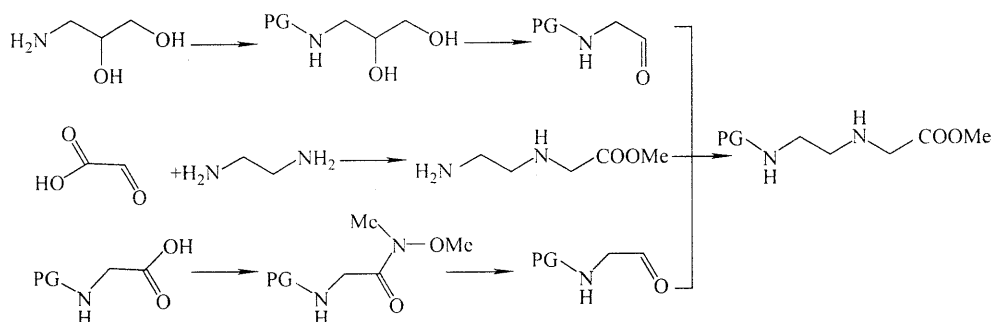


图 5 经由希夫碱中间体的合成 PNA 单体骨架

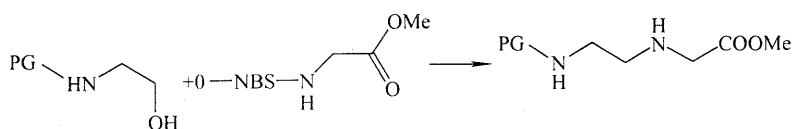


图 6 由氨基乙醇和甘氨酸酯合成 PNA 单体骨架

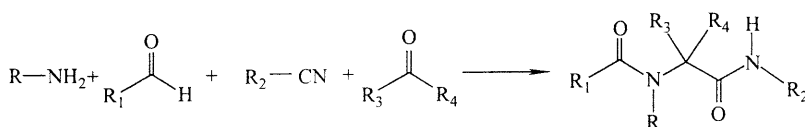


图 7 利用 Ugi 反应合成 PNA 单体骨架

## 2.2 PNA 寡聚体的合成

Merrifield 于 20 世纪中期提出的固相合成方法在多肽合成上的广泛应用,以及它不断显现出的合成方法简便、合成效率高等优点,越来越多地被应用到了 PNA 的合成上来,并充分显示出了这种方法的优越性。

P E Nielsen 等发现并报道的第一个 PNA 即为 T10 寡聚体<sup>[1]</sup>,就是由 Boc-保护单体并结合固相合成方法组装成的。今天,在已有的合成工作基础上,发展并优化了合成 PNA 所用的肽固相合成方法,从而建立了适合 PNA 本身结构的标准固相合成方法,并使之应用于自动合成之中,该合成方法可总结为如图 8 和图 9 所示。

随着固相合成化学、肽合成和组合化学的发展,PNA 的固相合成得到了不断的发展;

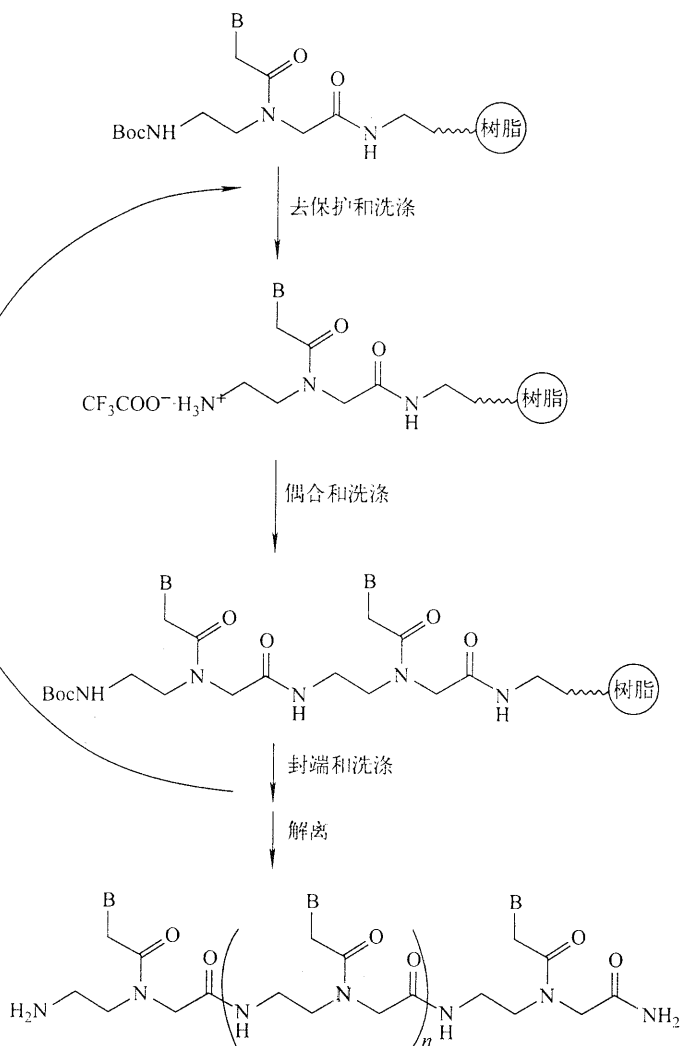


图 8 PNA 寡聚体的 Boc-固相合成示意图

Ugi 四组分缩合反应也有望开创 PNA 固相合成的新天地,为 PNA 的高效和多样化合成提供很好的方法。新建立起的 PNA 的其他合成方法,主要焦点集中在使其合成与其他生物聚合物如 DNA 完全相容。总的说来,采用这些策略不仅可以合成出 PNA-DNA 嵌合体,而且也可以合成其他酸敏感的 PNA 共轭体<sup>[13]</sup>。

### 2.2.1 固相载体

装载有 MBHA(4-甲基-二苯甲基氨基基团)树脂的聚苯乙烯球是在 PNA 合成中经常使用的固相载体。在 PEPS 膜上的膜合成和在氨基功能化膜上的阵列合成已经见诸报道,但偶联产量均低于在聚苯乙烯球上的合成。对于 PNA 合成来说,聚苯乙烯球上的氨基量通常是很高的,因此在合成之前,必须进行卸载,即降低固相载体的氨基取代量;否则,直接使用高氨基载量的树脂,会出现寡聚体的聚集,造成合成失败。

此外,PAL 或 XAL 手柄适用于很宽范围的树脂载体,根据所得到的 PNA 产率和纯度,可以表明 PEG-PS 很容易溶胀,可为合成化学提供“类似于溶液”的环境,是优良的载体树

脂。同时,过高的载量也会引起延伸的寡聚物发生凝聚而导致 PNA 质量的下降。

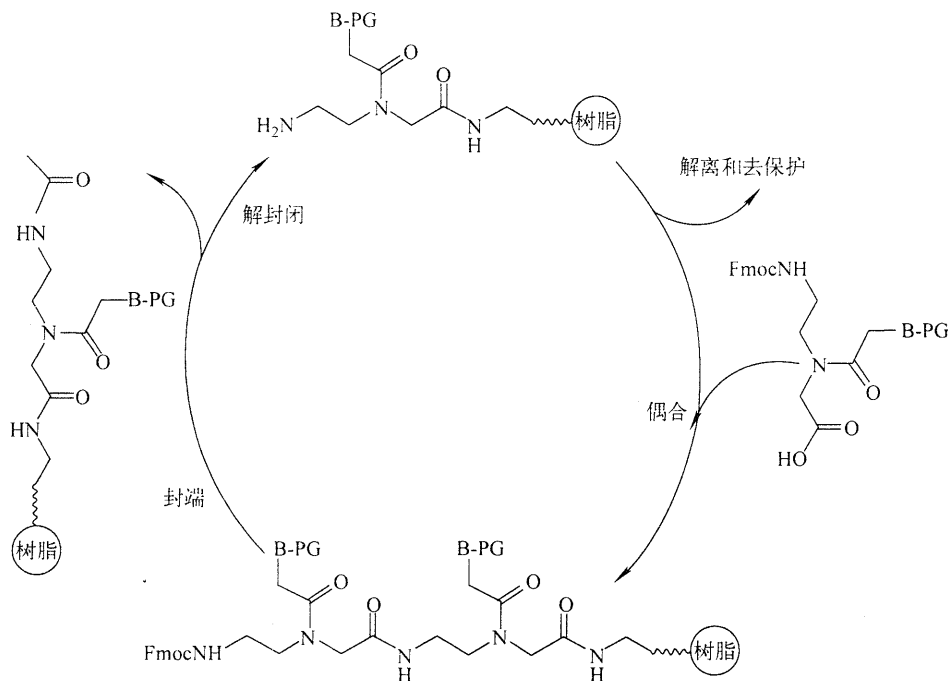


图9 PNA 寡聚体的 Fmoc-固相合成示意图

### 2.2.2 洗涤

最有效的洗涤效果,一般经由不同性质的溶剂组合使用达到。因此,二氯甲烷(DCM)和极性质子溶剂如 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砜(DMSO)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)等之间的组合是比较理想的。DCM 可以使 MBHA 树脂非常有效地溶胀,与此相反,极性质子溶剂却可使树脂收缩。这样的溶胀/收缩作用有助于有效地除去残留物。

气体冲洗步骤放在 Fmoc-固相合成循环的每个阶段的末尾进行,可以更有效地冲洗 PEG-PS 载体上的残留试剂,改善合成效率。使用 DMF 作为洗涤溶剂,可用 DCM 或甲醇漂洗树脂,以便它能迅速干燥并更容易地从柱上除去,且不影响实际合成。

### 2.2.3 去保护

Boc-基团一般用三氟乙酸(TFA)除去,加入净化剂与在去保护过程中释放出来的正丁基阳离子反应,在此步骤中所用的净化剂间甲酚可明显地降低对核酸碱基的正丁基烷基化作用。TFA 去保护过程很快,约在 5 min 内即可完成。树脂在用其处理之后,用 DCM 和 DMF 的组合溶剂进行洗涤。如果寡聚体和树脂被预先调节至中性,那么也用含有少量二异丙基乙胺(DIEA)的 DCM 溶液进行洗涤。

由于 Fmoc-更容易被去除,因此在合成 PNA 单体的实际实验过程中,需要小心选择溶剂。通常使用高纯度的 NMP,因为 DMF 一般会残留少量的氨甚至会缩短单体的寿命。

### 2.2.4 偶合

最初的 PNA 合成方案中,用羰基二咪唑或五氟苯进行 PNA 单体的活化。后来的方案优化中,常采用六氟磷酸化 O-(7-氮杂苯并三氮唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲(HATU)等脲



盐作为 PNA 合成的活化试剂,以得到最高的平均偶合产率。在偶合反应中所使用的溶剂对于合成来说至关重要,具有高电子供给容量的各种质子性溶剂的组合是 PNA 寡聚体合成的最佳选择;吡啶或 DCM 与 NMP 的组合可获得高于 99% 的平均偶合产率。同时,对单体进行简短的预先活化,并在自动合成方案中使用稍微过量的碱进行原位中和,都是很有裨益的。偶合反应之后的洗涤模式是依次采用 DMF 和 DCM。

在 Fmoc-固相合成路线中,由于 Fmoc-的不稳定性,所以不能选择碱性的储存液,这就要求单体、碱液和活化剂在偶合时联合使用。采用 HATU 作为活化剂时,碱液是由适宜比例的 DIEA 和二甲基吡啶组成的。几分钟的预活化和使用稍微过量的单体,在偶合步骤中都是需要的。

### 2.2.5 封端

未偶合寡聚物的乙酰化、封端是在分步合成的每个循环过程中进行的。乙酸酐是较好的封端试剂,对于 PNA 寡聚体序列的封端非常快,可在很短的时间内完成。同时,乙酸酐也是很强的酰化试剂,同吡啶的组合可以使其与核酸碱基中的环氮发生反应。封端期间形成的乙酰化核酸碱基片段在乙酸介质中很稳定,因此这些片段也就能够在去保护过程中稳定存在。封端可以简化对全长 PNA 的纯化,可以在乙酸酐和二甲基吡啶的 DMF 溶液中进行。由于在 PNA 合成的中和阶段,存在着增长的 PNA 链的自身封端现象,通常需要在封端之后加入哌啶进行洗涤,这在 Boc-固相合成路线中很有用,可以消除核酸碱基的环外和环上氨基的酰化产物,也可在 Fmoc-固相合成路线中的随后去保护过程中发挥作用。

### 2.2.6 解离

将 Boc-或 Z-保护的寡聚体从树脂上解离下来,氢氟酸(HF)因其具有高的解离效果和最小的副反应而一直是优选的试剂。P E Nielsen 等在首次合成 PNA 的过程中也使用了 HF,但由于它具有很高的毒性,因此在一般情况下可用三氟甲烷碳酸(TFMSA)来代替。

将 Fmoc-保护的 PNA 从合成载体上释放,通常用 TFA 进行处理。PAL 合成手柄需要用混有约 20% 间甲酚的 TFA 处理几小时才能解离;对于 XAL,可使用低浓度 TFA 通过延长处理时间完成;若纯 TFA 或含有约 5% 间甲酚的 TFA,则只需要几分钟,就可将 PNA 释放出来。

## 2.3 PNA 类似物的合成

由于经典的 PNA 在结构和功能上依然存在以下缺点:(1)电中性的 PNA 化合物具有自聚趋势,水溶性较差,并且其水溶性随着链的增长和嘌呤嘧啶比的增高而降低;(2)除参与形成氢键的官能团外,缺乏具有生化活性的官能团,作为工具分子,也只是局限于序列间互补而产生的选择性,细胞通透性较差,即生物利用度低;(3)与互补 DNA/RNA 结合时的方向可以是平行的或反平行的,具有不确定性。所以,对 PNA 分子进行化学修饰或改造得到 PNA 类似物,调整其理化、生物学特性,是改善和拓宽 PNA 在生物学领域的应用范围、实现其在作为反义试剂乃至实用药物的重要途径。这些类似物的合成是在 PNA 结构中引入功能性基团,包括主链骨架的基团替换修饰或原子顺序调整改变、侧链核酸碱基的修饰改造等。

截至目前,PNA 类似物的合成研究主要集中在对主链骨架的修饰改造上,因为用改造和未改造的 PNA 单体混合制成的寡核苷酸类似物对 DNA 和 RNA 有更好的杂交特性,而且骨架修饰能优化 PNA 的水溶性、生物利用度等。

### 2.3.1 O-PNA

O-PNA(oxy-PNA)是分子主链骨架中含有醚键的一类 PNA 类似物<sup>[14]</sup>,醚键的灵活性使其具有优于普通 PNA 的水溶性,并且对互补的 DNA 呈现特异的杂交形式。

O-PNA 单体合成的起始原料可以为 L-丝氨酸或 L-苏氨酸(如图 10 所示),主链骨架中的醚键经由羧酸酯的还原引入,羟烷基中的 O-位用于连接核酸碱基。

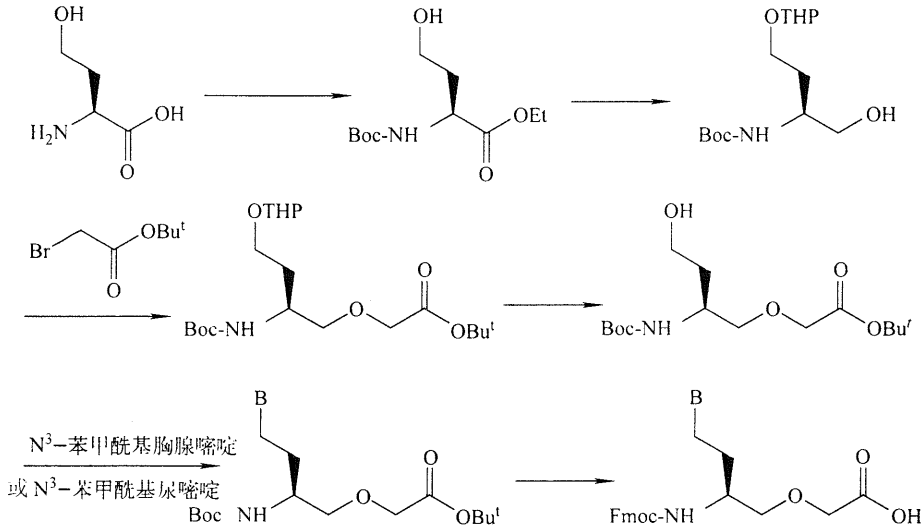


图 10 O-PNA 单体的合成路线

### 2.3.2 P-PNA

P-PNA(phospho-PNA)是主链骨架单元中含有磷酰基团的一类 PNA 类似物<sup>[15]</sup>,它的细胞通透性和水溶性都好于 PNA,而且不易发生自聚,并能与 DNA 形成更稳定的络合物,且不易被核酸酶降解。

P-PNA 单体的合成过程中需要借助于磷酸二苯酯来引入一个磷酰基团(如图 11 所示)。

### 2.3.3 $\alpha$ -PNA

$\alpha$ -PNA 单体是以 L- $\alpha$ -氨基酸为原料合成的<sup>[16]</sup>(如图 12 所示),反应可以在固相或者液相中进行,并且在液相合成中带有碱基的氨基酸可被偶合到甘氨酸乙酯上,得到单体二肽。与 PNA 相比, $\alpha$ -PNA 中碱基与主链骨架间不含羰基。

### 2.3.4 转位 PNA

转位 PNA(retro inverso PNA)是在主链骨架中将酰氨键翻转了的 PNA 类似物<sup>[17]</sup>(如图 13 所示),在对 DNA 序列的识别上,它比 PNA 更加优越,主要是构型的变化还减少了与水溶性介质的相互作用。

### 2.3.5 吡咯烷 PNA

吡咯烷 PNA(pyrrolidine PNA)是主链骨架单元中含有吡咯烷结构的一类 PNA 类似物<sup>[18]</sup>(如图 14 所示),这种结构与 PNA 相比,增加了与互补 DNA 和 RNA 低聚体的亲和能力。

PNA 类似物的种类还有很多,如 2~5A-PNA、PNA-多肽缀合物、PNA-EDTA 等是在

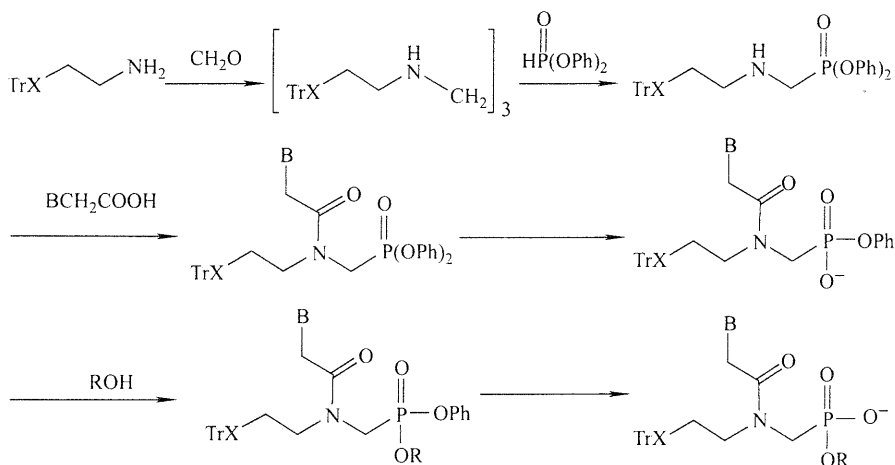


图 11 P-PNA 单体的合成路线

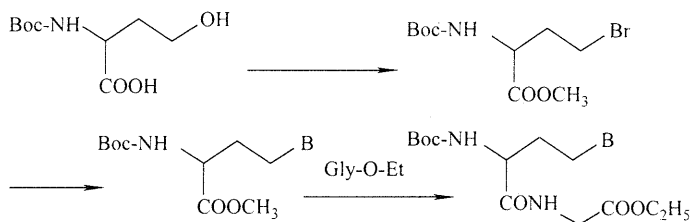


图 12  $\alpha$ -PNA 单体的合成路线

原有 PNA 的尾部,连上磷酸基、核苷酸、多肽、小分子等<sup>[19]</sup>。

目前,国内外许多实验室或研究人员仍在不断探索 PNA 的作用机制,力图修饰改进和优化其结构。随着组合化学等合成手段的兴起,PNA 及其类化合物逐步实现了自动合成,虽然某些合成路线显得比较繁琐,但随着合成思路与辅助技术的不断更新提高,PNA 及其类化合物的合成方法将变得越来越方便。

### 3 放射性核素标记 PNA

放射疗法从开始至今,经历了一个从宏观到微观,从组织水平到细胞水平,再到分子基因水平的发展过程。以基因作为靶位是放射疗法最前沿的研究领域,与其他癌症治疗方法相比,它的最大优点就是目的性强,对正常基因成分的副作用能降至最小。目前,许多药物主要以蛋白质作为靶位进行研究,而将基因作靶位则成为新药研制的又一个重要领域,其中将小片段 DNA 作为药物已被证明是很有前途的研究方向。要达到此目的,携带放射性核素的药物应该在分子水平上具有癌基因靶位特异性,以便能够特异地结合到癌基因序列靶位点上,形成稳定的复合物,从而达到治疗或诊断癌症的目的。反义/抗基因放射性治疗是一项新兴的肿瘤治疗技术,它将反义核酸抑制癌基因与放射性核素靶向损伤癌基因有机结合。

研究表明<sup>[20]</sup>,作为一种生物多聚物,PNA 是一种传送辐射核到癌细胞靶位对其进行分子切割和损伤,或进行分子图像检测的有效工具,在癌症诊断和放射基因治疗的临床应用上

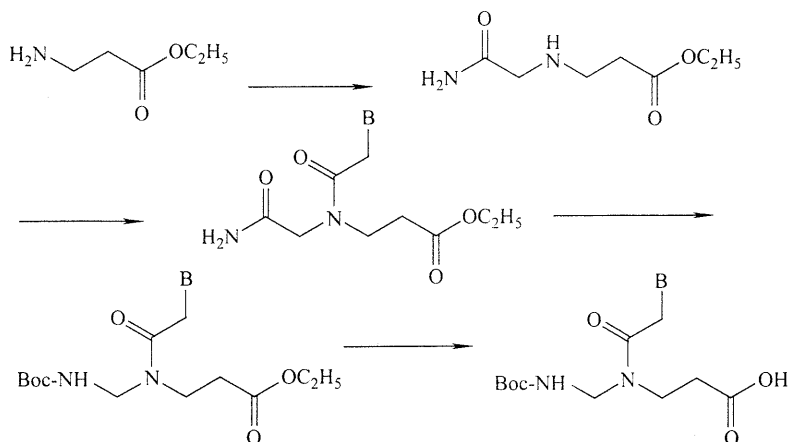


图 13 转位 PNA 单体的合成路线

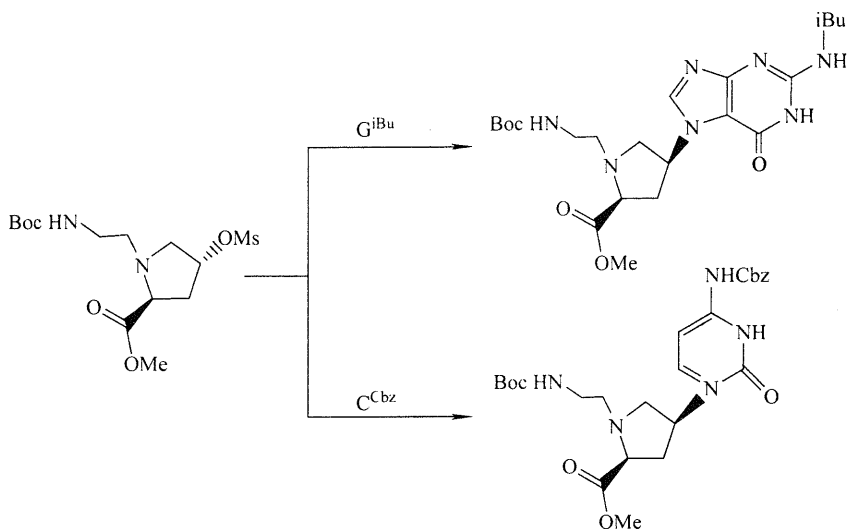


图 14 吡咯烷 PNA 单体的合成路线

具有光明前景。PNA 能够用重复的甘氨酸骨架取代 DNA 的核糖和磷酸,与天然 DNA(或 RNA)一样,PNA 也可合成出各种不同碱基序列的寡聚肽核酸。与对核酸酶和蛋白酶敏感的天然核酸和天然肽相比,PNA 具有很高的化学和生物学稳定性,它不易被核酸酶和蛋白酶酶解,同时易于传输到细胞核中,并且能与基因靶位通过专一性的碱基配对以双链或三链 DNA 的形式稳定地结合在一起。因此,放射核素标记的 PNA 可在分子水平上指导基因靶位的放射性疗法,同时在诊断方面具有重要应用<sup>[21]</sup>。

PNA 标记的一个主要问题是难以形成稳定的配位键,通过酰化反应后可在 PNA 上偶联双功能螯合剂 DTPA<sup>[22]</sup>,这使标记变得容易,标记物更稳定。

迄今,国际上关于放射性核素标记 PNA 分子的文献非常稀少,相关领域的研究人员也刚刚开始关注这一方向。

中国科研人员把 PNA 应用于放射性核素反义治疗当中,进行了一系列的实验研究工

作<sup>[23]</sup>。研究表明,在<sup>125</sup>I-PNAs 与癌基因 DNA 结合后,<sup>125</sup>I 发出的 Auger 电子可以直接破坏癌基因,<sup>125</sup>I 平均衰变一次可产生一个 DNA 断裂,达到基因放射治疗肿瘤的作用。研究发现<sup>125</sup>I-PNA 能增强 PNAs 阻抑肾癌细胞 Ki67 基因表达,抑制增殖,促进凋亡作用,有望用于肾癌治疗。

近期,国外科学家尝试用 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  标记 PNA 单体,研究结果表明形成了高产率且稳定性好的配合物,有可能成为与之 PNA 序列互补的靶向 mRNA 的反义放射性显像探针<sup>[24]</sup>。

## 4 结 论

随着合成方案思路与仪器设备等辅助技术的不断更新改进,应用于 PNA 及其类化化合物的合成方法将变得越来越方便,其应用前景也将随之被进一步拓展;与此同时,随着新型标记体系和标记技术的优化改进,将能够序列特异地与 DNA 或 RNA 结合形成稳定杂交复合物的 PNA 分子进行适当地修饰后,再用适宜的放射性核素标记这些 PNA 分子修饰物,则极有希望利用这些标记物对基因的特异靶向识别作用和放射性核素的诊断治疗作用,达到在放射性肿瘤诊治上靶向性明确、非靶组织最小损伤、基因水平上的肿瘤诊治的目的,进一步拓展 PNA 及其类似物的应用领域。

综上所述,在众多的 PNA 类似物中,由于  $\alpha$ -PNA 单体主要是以简单的 L- $\alpha$ -氨基酸为起始原料进行合成的,并且反应也可以在液相中进行,液相合成中带有碱基的氨基酸可被偶合到甘氨酸乙酯上,这样大大降低了合成条件的选择和合成难度。同时,虽然用于标记 PNA 的放射性核素鲜见于报道,但参考于已有的相关文献资料和 PNA 的结构,开发新的核素标记条件及标记技术是很有希望实现的。

## 致 谢

感谢中国工程物理研究院科学技术发展基金(2007B02004)给予的资助。

## 参 考 文 献

- 1 Nielsen P E, Egholm M, Berg R H, et al. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide[J]. *Science*, 1991, 254:1497-1450.
- 2 Knudsen H, Nielsen P E. Antisense properties of duplex and triplex-forming PNAs[J]. *Nucleic Acid Res*, 1996, 24:494-500.
- 3 Dias N, Stein C A. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2002, 1:347-355.
- 4 Nielsen P E. Peptide nucleic acid as antibacterial agents via the antisense principle[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2001, 10:331-341.
- 5 David A D. Peptide nucleic acids: versatile tools for gene therapy strategies[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000, 44:81-95.
- 6 陈鸣,府伟灵,蔡国儒,等.肽核酸生物传感器直接检测临床标本中提取的病毒基因组 DNA[J]. *中华医院感染学杂志*, 2003, 13(7):616-619.
- 7 Wang GS, XU X X. Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated gene regulation[J]. *Cell Research*, 2004, 24(2):111-116.

- 8 Franck P, Petra P. The peptide nucleic acid (PNAs): introduction to a new class of probes for chromosomal investigation[J]. *Chromosoma*, 2004, 112:375-380.
- 9 Egholm M, Buchardt O, Christensen L, et al. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen bonding rules[J]. *Nature*, 1993, 365:566-568.
- 10 Nielsen P E. Peptide nucleic acid targeting of double-strand DNA[J]. *Methods Enzymol*, 2001, 329-340.
- 11 Falkiewicz B, Kowalska K, Kolodziejczyk A S, et al. Synthesis of new chiral peptide nucleic acid (PNA) monomer by a simplified reductive amination method[J]. *Nucleoside & nucleotide*, 1999, 18(3):353-361.
- 12 Wang W H, Zhou X M, Zhang X, et al. Solid-phase synthesis of PNA monomer by Ugi four-component condensation reaction[J]. *Chinese chemical letters*, 2005, 16(5):585-588.
- 13 Efimov V A, Choop M V, Duryakova A A, et al. Synthesis and evaluation of some properties of chimeric oligomers containing PNA and phosphono-DNA residues[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26: 566-575.
- 14 Kuwahara M, Arimitsu M, Sisido M. Synthesis of  $\delta$ -amino acids with an ether linkage in the main chain and nucleobases on the side chain as monomers units for oxy-peptide nucleic acids[J]. *Tetrahedron*, 1999, 55(33):10067-10078.
- 15 Efimov V A, Choob M V, Buryakova A A, et al. Synthesis and binding study of phosphonate analogues of PNAs and their hybrids with PNAs[J]. *Nucleoside & Nucleotide*, 1998, 17(9-11):1671-1679.
- 16 Howarth N M, Wakelin L P G.  $\alpha$ -PNA: a novel peptide nucleic acid analogue of DNA[J]. *J. Org. Chem.*, 1997, 62(16):5441-5450.
- 17 Krotz A H, Larsen S, Buchardt O, et al. A retro-in-verso PNA: structural implications for DNA and RNA binding[J]. *Bioorg Med. Chem.*, 1998, 6(11):1983-1992.
- 18 Moneesha D C, Vaijayanti A K, Krishna N G. N7-guanine as a C<sup>+</sup> mimic in hairpin aeg/aepPNA-DNA triplex: probing binding selectivity by UV-Tm and kinetics by fluorescence-based strand-invasion assay [J]. *J. Org. Chem.*, 2003, 68:4439-4445.
- 19 Gemma P A, Federico R, Vicenc B, et al. Cyclobutyl-carbonyl substituted PNA: synthesis and study of a novel PNA derivative[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, 17:2499-2503.
- 20 He Y J, Igor G P, Alex K, et al. Sequence-specific DNA strand cleavage by <sup>111</sup>In-labeled peptide nucleic acids[J]. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2004, 31(6):837-845.
- 21 Panyutin I G, Winters T A, Feinendegen L E, et al. Development of DNA-based radiopharmaceuticals carrying Auger-electron emitters for anti-gene radiotherapy[J]. *Q. J. Nucl. Med.*, 2000, 44:256-267.
- 22 Lewis M R, Jia F, Gallazzi F, et al. Radiometal-labeled peptide-PNA conjugates for targeting bcl-2 expression: preparation, characterization, and in vitro mRNA binding [J]. *Bioconjugate Chem.*, 2002, 13:1176-1180.
- 23 郑骏年, 孙晓青, 陈家存, 等. <sup>125</sup>I 标记 Ki67 多肽核酸影响肾癌细胞增殖及凋亡的实验研究[J]. *中华核医学杂志*, 2004, 24(3):139-141.
- 24 Xavier C, Pak J K, Santos I, et al. Evaluation of chelators for labeling a PNA monomer with the fac-[<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> moiety[J]. *Journal of organometallic chemistry*, 2007, 692:1332-1339.