

Stabilność oligonukleotydów antysensowych — możliwości ich degradacji enzymatycznej

Maria Koziółkiewicz
Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych PAN
Łódź

Na niestabilność antysensowych oligonukleotydów jako pierwszy zwrócił uwagę Wickstrom (1), wykazując, że okres półtrwania niemodyfikowanego oligomeru w osoczu jest krótszy niż 1 godzina. Jakkolwiek doniesienia na temat stabilności oligonukleotydów w warunkach *in vivo* nie zawsze są zgodne (2), nie ulega wątpliwości, że różnego rodzaju nukleazy są poważnym zagrożeniem dla stabilności, a tym samym aktywności oligonukleotydów. Produkty ich nukleolitycznej degradacji mogą nawet wywołać efekt toksyczny, ponieważ zdolne są do hybrydyzacji z innymi niż zamierzone sekwencjami DNA lub RNA i w ten sposób mogą prowadzić do blokowania ekspresji zupełnie innych białek.

Eder i współl. (3) wykazali, że za degradację 15-nukleotydowego oligomeru w osoczu ssaków odpowiedzialny jest właściwie tylko jeden enzym, a mianowicie 3'-egzonukleaza. Okres półtrwania tego oligomeru ($t_{1/2}$) wynosi ok. 15 min.

Szybkość degradacji niemodyfikowanych oligonukleotydów zależy m.in. od ich długości i sekwencji.

3'-egzonukleaza z osocza ssaków preferuje pirymidyny, podczas gdy obecność fragmentów purynowych hamuje jej aktywność i obniża szybkość degradacji niemodyfikowanych oligonukleotydów. Toteż ze względu na różną długość i sekwencję oligonukleotydów okres ich półtrwania w osoczu wynosi od 15 min do 1 godz.

Ponieważ pożywki stosowane w hodowlach komórkowych zawierają niewielkie ilości osocza płodów cięących, obecna w takim osoczu 3'-egzonukleaza może stanowić zagrożenie dla oligonukleotydów stosowanych w badaniach *in vitro*. Enzymy zawarte w osoczu są, co prawda, inaktywowane przez ogrzewanie (50 – 65°C przez 30 – 60 min), ale inaktywacja termiczna osocza nie zawsze jest w pełni skuteczna. Pomimo stosowania tej procedury egzonukleazy osocza zachowują niekiedy swą aktywność (2). Stąd też Eder i współl. proponują modyfikowanie jednego lub kilku wiązań internukleotydowych na 3' — końcach oligonukleotydów, jako skuteczny sposób zwiększania ich od-

porności na działanie 3'-egzonukleaz zarówno w hodowlach komórkowych jak i w warunkach *in vivo* (3).

Jednakże w ekstraktach z komórek różnych ssaków występują nie tylko 3'-egzonukleazy. Towarzyszą im 5'-egzonukleazy oraz endonukleazy. Enzymy zawarte w ekstraktach komórek HeLa powodują degradację niemodyfikowanych oligonukleotydów w czasie 15 – 30 min. Z tego względu modyfikowanie pojedynczych wiązań internukleotydydowych na 3'- i 5'-końcach oligonukleotydów nie stanowi na ogół dostatecznego zabezpieczenia przed degradacją nukleolityczną (2). Całkowitą odporność oligonukleotydów na działanie nukleaz zapewnia jedynie modyfikowanie wszystkich wiązań internukleotydydowych. Najczęściej stosowane modyfikacje to podstawienie jednego z nieestrowych atomów tlenu wiązania internukleotydydowego atomem siarki (tiofosforany) lub grupą metylową (metanofosfoniany). Ostatnio duże zainteresowanie wzbudzają także ditiofosforanowe analogi oligonukleotydów (4).

Przeprowadzone dotychczas badania świadczą o ich całkowitej odporności na działanie nukleaz. Doniesienie Cohena o degradowaniu ditiofosforanów przez DNazę I (5) nie zostało potwierdzone (6). Warto podkreślić, że hybrydy RNA-DNA utworzone z udziałem tiofosforanowych i ditiofosforanowych analogów oligonukleotydów wykazują zdolność do aktywowania RNazy H w przeciwieństwie do dupleksów powstających z udziałem analogów metanofosfonianowych. RNaza H degraduje mRNA w rejonie występowania takiego dupleksu i uniemożliwia w ten sposób syntezę określonego białka (7). W związku z tym, że aktywacja RNazy H jest jednym z lepiej udokumentowanych mechanizmów działania „antysensowych” oligonukleotydów, zdolność do takiej aktywacji stanowi poważną zaletę modyfikowanych oligomerów.

Tiofosforanowe analogi oligonukleotydów są znacznie bardziej stabilne w osoczu oraz w ekstraktach komórkowych niż ich niemodyfikowane prekursorzy. Okres półtrwania tiofosforanów w warunkach *in vivo* wynosi zwykle 12–24 godz. (8). Znacznie większą trwałość wykazują w analogicznych warunkach metanofosfonianowe analogi oligonukleotydów (9). Z metodologicznego punktu widzenia obecnie jednak za najbardziej obiecujące uważane są antysensowe analogi tiofosforanowe (Oligo S). Istotne jest to, że w przypadku Oligo S stosunkowo dobrze poznany jest zarówno mechanizm działania, jak i transport komórkowy, farmakokinetyka oraz toksyczność tych połączeń (2). Niebagatelne znaczenie ma także fakt, że jak dotąd, najlepiej opracowane zostały metody chemicznej syntezy właśnie analogów tiofosforanowych.

W związku z tym, że tiofosforanowe wiązanie internukleotydydowe stanowi — ze względu na stereogenność atomu fosforu — element chiralny, oligonukleotyd zawierający n modyfikowanych w ten sposób wiązań internukleotydydowych jest mieszaniną 2^n diastereoizomerów (10).

Fakt ten może w istotny sposób wpływać na fizykochemiczne właściwości tych analogów (m.in. na trwałość dupleksów DNA-DNA lub DNA-RNA powstających z ich udziałem), jak również na ich właściwości biologiczne, np. możliwości interakcji z białkami i podatność na działanie różnych nukleaz. Dotychczas nie wiadomo, np. czy aktywność RNazy H jest zróżnicowana w za-

leżności od konfiguracji absolutnej wiązań internukleotydydowych diastereoizomerycznie czystych analogów tiofosforanowych (tzw. „all- R_p ”- oraz „all- S_p ”-izomerów).

Stereospecyficzność niektórych białek enzymatycznych wobec tiofosforanowych analogów oligonukleotydów jest już dobrze udokumentowana. Wiadomo, że fosfodiesteraza z jadu węża rozpoznaje i degraduje jedynie wiązania tiofosforanowe o konfiguracji absolutnej R_p (R_p -specyficzna nukleaza) (11), podczas gdy nukleaza P1 z *Penicillium citricum* jest S_p -specyficzna, tzn. rozpoznaje i degraduje jedynie wiązania tiofosforanowe o konfiguracji S_p (12). Taką samą stereospecyficzność wykazują nukleaza S1 oraz nukleaza z *Phaseolus aureus* (nukleaza Mung bean). Fosfodiesteraza z jadu węża o aktywności 3'-egzonukleazy oraz nukleaza P1, która wykazuje aktywność zarówno endo- jak i egzozonukleazy, są niekiedy stosowane do oznaczania składu nukleozydowego syntetycznych oligonukleotydów, w tym także analogów tiofosforanowych. W tym celu oligonukleotydy są poddawane działaniu mieszaniny zawierającej fosfodiesterazę, nukleazę P1 oraz alkaliczną fosfatazę. Produktem wyczerpującej degradacji jest mieszanina nukleozydów, analizowana następnie metodą chromatografii wysokociśnieniowej (15).

Fakt, że istnieją enzymy nukleolityczne, aktywne wobec analogów tiofosforanowych i posiadające jednocześnie określoną stereospecyficzność, umożliwia kontrolę czystości diastereoizomerycznej stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów syntetyzowanych przy użyciu pochodnych 5'-DMT nukleozydulo-3'-O-(2-tiono-1,3,2-oksatiaofofolanowych) (13). Dla przeprowadzenia tego rodzaju analiz stosowane są obecnie: S_p -specyficzna nukleaza P1 oraz dwa enzymy R_p specyficzne: fosfodiesteraza z jadu węża oraz endonukleaza z *Serratia marcescens*. Pierwszy z tych enzymów, degradując wiązania S_p umożliwia ocenę stopnia czystości izomerów (all- R_p), podczas gdy dwa następne enzymy degradując wiązania R_p pozwalają ocenić czystość izomerów (all- S_p) (14).

Stereospecyficzność wobec tiofosforanowych analogów oligonukleotydów wykazuje także restrykcyjna endonukleaza EcoRI. Jej aktywność zależy od konfiguracji absolutnej na chiralnych atomach fosforu tiofosforanowych analogów substratu (15,16).

Stereospecyficzność niektórych enzymów nukleolitycznych może być przyczyną wyraźnie zróżnicowanej stabilności diastereoizomerycznie czystych oligonukleotydów tiofosforanowych. Pierwsze eksperymenty enzymatyczne przeprowadzone z wykorzystaniem stereoregularnych, tiofosforanowych analogów oligonukleotydów (13) potwierdziły te przypuszczenia. Inkubacja izomerów R_p dodekamerów $d[(A_{PS})_{11}A]$ i $d[(T_{PS})_{11}T]$ w 50% osoczu ludzkim spowodowała ich częściową degradację (czas półtrwania $d[(T_{PS})_{11}T]$ wynosi ok. 4 godz.), podczas gdy izomery S_p tych oligomerów okazały się całkowicie odporne na działanie 3'-egzonukleazy. Trudno jednak na tej podstawie uznać S_p izomery za generalnie bardziej stabilne, nie wiadomo bowiem, czy wewnątrzkomórkowe nukleazy są, podobnie jak 3'-egzonukleaza z osocza, R_p -specyficzne. Wstępne wyniki badań nad 3'-egzonukleazą z osocza ludzkiego

świadczą o zróżnicowanej aktywności tego enzymu w zależności od rodzaju nukleotydów znajdujących się na 3'-końcu substratu. Podczas gdy obecność pirymidyn w cząsteczkach niemodyfikowanych oligonukleotydów powodowała wzrost aktywności 3'-egzonukleazy (3), obecność trimeru CCC na 3'-końcu analogów tiofosforanowych zdecydowanie hamuje aktywność enzymu (17). Obecność jednej lub kilku reszt cytydyny hamowała aktywność 3'-egzonukleazy także wobec α -oligonukleotydów (18). Zdecydowanie hamujący wpływ reszt cytydynowych w analogach tiofosforanowych, jak i odporność wiązań S_p na działanie 3'-egzonukleazy, mogą stanowić podstawę do poszukiwania sposobów zabezpieczenia oligonukleotydów przed działaniem tego enzymu.

Jednakże to, że stereoregularne analogi tiofosforanowe są w warunkach *in vivo* degradowane przez pewne enzymy nukleolityczne, może obniżać ich wartość jako potencjalnych terapeutyków.

Nie znana jest, jak dotychczas, stereospecyficzność enzymów nukleolitycznych pochodzących z różnych frakcji komórkowych. Stąd konieczność badań nad stabilnością stereoregularnych tiofosforanowych analogów oligonukleotydów wobec tych enzymów.

Literatura

1. Wickstrom E., (1986), *J. Biochem. Biophys. Methods*, 13, 97 - 101.
2. Dan Cook P., (1993), in: *Antisense Research and Applications*, Eds. Lebleu B., and Crooke S. T., 150 - 186.
3. Eder P.S., DeVine R.J., Dagle J. M., Walder J.A., (1991), *Antisense Res. Dev.*, 1, 141 - 151.
4. Marshall W.S., Caruthers M.H., (1993), *Science*, 259, 1564 - 1570.
5. Ghosh M.K., Ghosh K., Dahl O., Cohen J.S., (1993), *Nucleic Acids Res.*, 21, 5761 - 5766.
6. Sierzchała A., Koziółkiewicz M., dane nie publikowane.
7. Marabelli Ch.K., Crooke S. T., (1993), in: *Antisense Research and Applications*, Eds. Lebleu B., and Crooke S. T., 8 - 35.
8. Matsukura M., Shinozuka K., Zon G., Mitsuya H., Reitz M., Cohen J.S., Broder S., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7706 - 7711.
9. Agrawal S., Goodchild J., (1987), *Tetrahedron Lett.*, 28, 3539 - 3542.
10. Stec W.J., Wilk A., (1994), *Angew. Chem.*, 33, 709 - 722.
11. Bryant R.F., Benkovic S.J., (1979), *Biochemistry*, 18, 2825 - 2830.
12. Potter B.V.L., Connolly B.A., Eckstein F., (1983), *Biochemistry*, 22, 1369 - 1374.
13. Stec W. J., Grajkowski A., Koziółkiewicz M., Uznański B., (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19, 5883 - 5888.
14. Koziółkiewicz M., dane nie publikowane.
15. Koziółkiewicz M., Stec W.J., (1992), *Biochemistry*, 31, 9460 - 9466.
16. Lesser D. R., Grajkowski A., Kurpiewski M. R., Koziółkiewicz M., Stec W.J., Jen-Jacobson L., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 24810 - 24818.
17. Wójcik M., Koziółkiewicz M., dane nie publikowane.
18. Vichier-Guerre S., Pompon A., Lefebvre I., Imbach J.-L., (1994), *Antisense Res. Dev.*, 4, 9 - 19.

Stability of antisense oligonucleotides — the possibilities of their enzymatic digestion

Summary

Nucleolytic enzymes (5'- and 3'-nucleases, exo- and endonucleases) can degrade short unmodified oligonucleotides applied as potential antisense agents. Better stability of oligonucleotides against nucleolytic enzymes can be achieved by chemical modification of internucleotide bonds. Stability of the phosphorothioate, phosphorodithioate and methylphosphonate analogues of oligonucleotides against nuclease P1, 3'-exonuclease, snake venom phosphodiesterase and other nucleases is discussed.

Key words:

antisense oligonucleotides, phosphorothioates, nucleolytic digestion.

Adres dla korespondencji:

Maria Koziółkiewicz, Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź.