

Koniugaty oligonukleotydowe

Konrad Misiura
Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych PAN
Łódź

Koncepcja antysensu (1) wykorzystywana w terapii chorób wirusowych (2) jest ograniczona nietrwałością naturalnych oligonukleotydów (3). W warunkach *in vivo* prowadzone badania przedkliniczne i kliniczne koncentrują się na wykorzystaniu ich analogów tiofosforanowych. Ciągłe jednak terapeutyczne zastosowanie oligonukleotydów podlega istotnym ograniczeniom, z których podstawowe to: poziom efektywności oddziaływania z docelowym informacyjnym kwasem rybonukleinowym (mRNA), stabilność wobec wewnątrzkomórkowych nukleaz oraz zdolność do przechodzenia przez błony komórkowe. Jedną z dróg poprawy właściwości farmakologicznych oligonukleotydów jest łączenie ich z resztami różnych cząsteczek (ligandami) prowadzącymi do otrzymania koniugatów (4). Łańcuch oligonukleotydowy w koniugacie może być naturalny, jednolicie zmodyfikowany, np. tiofosforanowy, bądź mieć strukturę mieszaną czyli chimeryczną. Przyłączony poprzez łącznik ligand może znajdować się na 5'-, 3'-końcu, lub w środku oligonukleotydu. Ligand może być przyłączany bezpośrednio podczas chemicznej syntezy oligomeru lub postsyntetycznie w reakcji z odpowiednim reaktywnym łącznikiem. Pierwsza metoda wymaga otrzymania odpowiednio zablokowanego monomeru odpornego na warunki chemicznej syntezy oligonukleotydów. Przyłączanie ligandu postsyntetycznie jest zwykle chemicznie prostsze, ale wymaga za to dokładnego oddzielenia otrzymanego koniugatu od nadmiaru użytego w tej reakcji ligandu.

W procesie blokowania translacji istotne znaczenie mają właściwości hybrydyzacyjne oligonukleotydów. Już w połowie lat osiemdziesiątych przeprowadzono badania nad wpływem ligandów interkalujących na hybrydyzację odpowiednich koniugatów (5). Cząsteczka interkalująca „wślizguje się” pomiędzy sąsiednie zasady dostarczając w ten sposób dodatkowej energii podczas tworzenia się dupleksu. Użyte w tym celu policykliczne, aromatyczne związki, takie jak: akrydyna (6,7) czy benzofenantrydyna (8), przyłączano na 5'- lub 3'-końcu oligonukleotydu za pośrednictwem grup fosforanowych. Helene i współ. (6) wykazali, że akrydyna przyłączona do 3'-końca (dT)₁₂ podwyższa temperaturę mięknięcia dupleksu z 34 do 47°C.

Inną możliwością oddziaływania koniugatu z mRNA jest tworzenie wiązań kowalencyjnych. Zespół kierowany przez Knorre i Zarytową (9) prowadził in-

tensywne badania nad wykorzystaniem koniugatów zawierających resztę 2-chloroetyloaminy, która posiada zdolność alkilowania zasad nukleinowych w komplementarnej nici. Ligand alkilujący przyłączono do 3'- lub 5'-końca oligonukleotydu za pośrednictwem grup fosforanowych i wykazano (10), że dla 5'-pochodnych alkilowanie zachodzi głównie na nukleotydzie sąsiednim do komplementarnego, natomiast dla 3'-pochodnych preferencyjne miejsce ataku jest oddalone o dwa nukleotydy. Badacze rosyjscy (11) wykazali również w badaniach *in vitro* wobec wirusa HIV, że koniugaty alkilujące są bardziej efektywne niż niezmodyfikowane oligonukleotydy. Proces kowalencyjnego wiązania koniugatu do komplementarnej nici może być również indukowany za pomocą czynników zewnętrznych. Typowym przykładem tego typu połączeń są koniugaty zawierające psoralen. Ligand ten interkaluje z zasadami nukleinowymi (preferencyjne z tyminą) i następnie przy naświetlaniu próbki światłem o długości fali ok. 360 nm tworzy się kowalencyjne wiązanie typu cyklobutanu. Miller i współ. (12) otrzymali koniugaty zawierające psoralen przyłączony poprzez resztę fosforanową do oligonukleozydometanofosfonianu. Wykazali oni (13), że w systemie bezkomórkowym 40% inhibicja translacji mRNA40 zachodzi przy 100 μ M stężeniu oligonukleotydu, a 37% inhibicję osiągnięto przy inkubacji połączonej z naświetlaniem wobec 5 μ M roztworu koniugatu. Do fotoaktywowanego tworzenia wiązań kowalencyjnych z komplementarną nicią używano również azydoproflawinę (14) i azydofenacyl (15).

Z punktu widzenia efektywności blokowania translacji równie atrakcyjne jak tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy koniugatem a docelowym mRNA, jest możliwość specyficznego rozcinania atakowanego kwasu nukleinowego. Koniugaty użyte do tego celu zawierały jako ligandy kompleksy metali (3) takie jak: EDTA-Fe(II), porfiryne-Fe(II) i fenantrolina-Cu(I). Ligandy te przyłączono do oligonukleotydów głównie za pośrednictwem grupy 5'-fosforanowej. Dervan (16) związał EDTA z oligonukleotydem poprzez łącznik połączony z tyminą w pozycji 5. Otrzymał w ten sposób 19-merowy koniugat, który był komplementarny do plazmidu pBR 322. Po inkubacji zdenaturowanego fragmentu pBR 322 z otrzymanym koniugatem prowadzonej w obecności jonów Fe^{2+} , ditiotretolu i tlenu analizowano miejsca cięcia tego fragmentu. Wykazano, że rozszczepienie zachodzi w obrębie 16 zasad. Miejsca najbardziej intensywnej degradacji oddalone były o kilka zasad od miejsca położenia ligandu. Natomiast Schultz (17) przeprowadził selektywną hydrolizę M1 RNA za pomocą koniugatu zawierającego nukleazę ze *Staphylococcus aureus* połączoną wiązaniem disiarczkowym z łącznikiem położonym na 3'-końcu oligonukleotydu.

Istotny wpływ na antysensowy efekt wprowadzonego oligonukleotydu mogą mieć jego właściwości transportu przez błony komórkowe. W wielu badaniach wykazano (3), że grupy o charakterze lipofilowym, takie jak: długołańcuchowe alkohole, fosfolipidy i cholesterol ułatwiają przenikanie odpowiednich koniugatów do komórek. Shea i współ. (18) stwierdzili, że oligonukleotydy zawierające na 5'-końcu resztę 1,2-distearylglicerolo-3-fosforanu wnikają do komórek L929 w 10-krotnie większym stopniu niż oligonukleotydy niezmody-

fikowane. Letsinger (19) wykazał, że związanie cholesterolu z oligonukleotydem ma wpływ na jego antysensową inhibicję wirusa HIV. Badania prowadzono na linii komórkowej MOLT-3 i badano poziom ekspresji wirusowych białek p17, p24 oraz odwrotnej transkryptazy. Przy inkubacji w obecności 20-merowego koniugatu tiofosforanowego obserwowano inhibicję przy stężeniu 0,2 μM . Stwierdzono również spadek specyficzności działania, gdyż niekomplementarne sekwencje także wykazywały antywirusową aktywność. Aby polepszyć właściwości transportowe oligonukleotydów Lebleu i współ. (20) zsyntetyzowali koniugaty oligonukleotyd-polilizyna. Oligonukleotyd zawierający na 3'-końcu resztę rybozy utleniano nadjodanem do ugrupowania dialdehydowego, które to kondensowano z jedną z grup aminowych polilizyny. W kulturach komórkowych zainfekowanych wirusem VSV 19-merowy oligonukleotyd oraz mieszanina oligonukleotydu i polilizyny nie hamowały rozwoju tego wirusa, natomiast odpowiedni koniugat wykazywał aktywność przeciwwirusową już w stężeniu 0,1 μM . Okazało się jednak, że polilizyna *per se* jest silnie cytotoksyczna. Również wysoka aktywność koniugatów wobec komórek L929 nie potwierdziła się, wówczas gdy zarażone wirusem VSV były komórki HeLa i LM fibroblasty.

Koniugaty oligonukleotydydowe można uznać za trzecią generację antysensowych oligonukleotydów. Pierwsza generacja, czyli niemodyfikowane oligonukleotydy wymaga do osiągnięcia inhibicji biosyntezy białka w układach *in vitro* stężeń rzędu 10^{-4} - 10^{-5} M. Druga natomiast, czyli tiofosforanowe analogi oligonukleotydów, stosowana jest w stężeniach 10^{-6} - 10^{-7} M. Jeżeli przez zastosowanie koniugatów oligonukleotydydowych, a w szczególności posiadających szkielet tiofosforanowy, można by obniżyć stężenia koniugatu potrzebne do zahamowania translacji o następne dwa rzędy wielkości, to byłby to duży krok na drodze praktycznego wykorzystania koncepcji antysensu. Jednocześnie badania nad koniugatami oligonukleotydydowymi wnoszą istotny wkład w poznanie antysensowego sposobu działania, procesów enzymatycznej degradacji oligonukleotydów oraz transportu przez błony komórkowe.

Literatura

1. Zamecnik P.C., Stephenson M. L., (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 280.
2. Zon G., (1988), Pharmacol. Res., 5, 539.
3. Wickstrom E., (1986), J. Biochem. Biophys. Methods, 13, 97.
4. Manoharan M., (1993), *Antisense Research and Applications*, Eds. Croke S.T., Lebleu B., 303, CRC Press, Boca Raton.
5. Helene C., (1987), *DNA-ligand Interactions*, Eds. Gueschelbauer W., Sanger W., 127, Plenum Press, New York.
6. Asseline U., Delaure M., Lancelot G., Toulme F., Thuong N.T., Montenay-Garestier T., Helene C., (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3297.
7. Stein C.A., Mori K., Loke S.L., Subaringhe C., Shinozuka K., Cohen J. S., Nackers L. M., (1988), Gene, 72, 333.
8. Chen J.-K., Carlson D.V., Weith H. L., O'Brien J.A., Goldman M.E., Cushman M., (1992), Tetrahedron Lett., 33, 2275.
9. Knorre D.G., Zarytowa V.F., *Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS*, Ed. Wickstrom E., 195, Wiley-Liss, New York.

10. Vlassov V.V., Zarytova V.F., Kutiavin J.V., Mamaev S.V., Podymingin M.A., (1986), *Nucleic Acids Res.*, 14, 4065.
11. Abramowa T.V., Blinov V.M., Vlassov V.V., Gorn V.V., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Konevets D.A., Plyasunova O.A., Pokrovsky A.G., Sandahchiev L.S., Svinarchuk F.P., Starostin V.P., Chaplygina S.R., (1991), *Nucleosides & Nucleotides*, 10, 419.
12. Lec B. L., Murakami A., Blake K.R., Liu S.-B., Miller P.S., (1988), *Biochemistry*, 27, 3197.
13. Miller P.S., Bhan P., Cushman C.D., Kean J.M., Levis J.T., (1991), *Nucleosides & Nucleotides*, 10, 37.
14. LeDoan T., Perronoult L., Pracenth D., Habhoub N., Decout J.-L., Thuong N.T., Lhomme J., Helene C., (1987), *Nucleic Acids Res.*, 15, 10507.
15. Prasenth D., Chassignol M., Takasugi M., LeDoan T.L., Thuong N.T., Helene C., (1987), *J. Mol. Biol.*, 196, 939.
16. Dreyer G.B., Dervan P.B., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 968.
17. Zuckermann R.N., Coney D.R., Schultz P.G., (1988), *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 1614.
18. Shea R.G., Marsters J.C., Bishofberger N., (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 3777.
19. Letsinger R.L., Zhang G., Sun D.K., Ikeuchi T., Sarin P.S., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6553.
20. Leonetti J.P., Raymer B., Lemaitre M., Gagnor C., Milhand P.G., Imbach J.-L., Lebleu B., (1988), *Gene*, 72, 323.

Oligonucleotide conjugates

Summary

Various molecules are attached to oligonucleotides to make conjugates. Conjugates are specially designed to increase antisense activity by better interaction with target mRNA, better stability against nucleases, and/or permeability to the cells.

Key words:

antisense, labels, oligonucleotide.

Adres dla korespondencji:

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