

# 修飾型センスと天然型アンチセンスからなる二本鎖オリゴデオキシヌクレオチドの安定性と生体内動態

川口健夫・浅川浩樹・從二和彦・末石俊彦<sup>\*1)</sup>、太田尚志・実吉峯郎<sup>\*2)</sup>

*Enzymatic stability and plasma concentration of double-stranded oligodeoxynucleotides (ODNs) composed of unmodified antisense ODN and chemically modified sense ODNs*

Novel stabilizing method for unmodified oligodeoxynucleotides (ODNs) has been investigated. Chemically modified ODNs, which carry complementary sequences of unmodified antisense ODN, can form a double-stranded complex with the ability to stabilize the unmodified oligomer. The modifications were made on phosphodiester backbone (phosphorothioate, SO), thymine base (5-phenylethyl substitution), 5'-terminal (introduction of poly(ethylene glycol)). To determine the potential of this method, the *in vitro* stability in human plasma and *in vivo* retention in mouse after iv injection of the hemi-modified double-stranded ODNs were evaluated. Dissociation of unmodified antisense ODN from the hemi-modified double-strand and reconstitution of the double-strand with an unmodified sense ODN were also recognized.

Takeo Kawaguchi · Kohki Asakawa · Kazuhiko Juni · Toshihiko Sueishi<sup>\*1)</sup>, Yasushi Ohta · Mineo Saneyoshi<sup>\*2)</sup>

**key words :** oligodeoxynucleotides, antisense, stability, human plasma

オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)のアンチセンス効果によって、真核細胞やウイルスの遺伝子発現を制御し、癌、エイズなどの疾患を治療する試みが広く行われている<sup>1)</sup>。しかしながら、*in vivo*で ODN がアンチセンス効果をあらわすためには、① 細胞内あるいは核内の標的遺伝子(センス)への到達性、② その過程における化学的ならびに酵素的安定性、③ 標的センスとの水素結合能、④

センス-アンチセンスハイブリッドの RNase H 感受性など多くの条件が要求される。ヌクレオチド間をリン酸ジエステル結合で結んだ天然型 ODN では、③④については本来の機能が期待できるが、①②特に各種ヌクレアーゼに対する安定性の低さが問題となる<sup>2)</sup>。

一方、ヌクレアーゼ抵抗性の獲得を主な目的として、リン酸ジエステル構造への種々の化学修飾<sup>3-5)</sup>が行われているが、リンと結合する酸素あるいは水酸基のいずれかを他の置換基でおきかえると、そのリン原子は不斉となる<sup>6)</sup>。したがって、15 ヌクレオチドからなるオリゴマーでは  $2^{(15-1)} = 16,384$  個の立体異性体を生じることになり、異性体の混合物では上記③の水素結合能に影響する<sup>7)</sup>とともに、医薬品としては活性物質の純度が特定できることになる。

そこで本研究では、アンチセンスとして作用する分子は修飾を施さない天然型 ODN を用いることを前提として、この天然型 ODN に酵素分解に対する抵抗性を与えるために、化学修飾を施した相補的 ODN と 2 本鎖を形成させる方法<sup>8)</sup>(図 1)について検討した。

この方法では、アンチセンス ODN がヌクレアーゼ抵抗性や標的部位移行性を付加した(修飾型)センス ODN と水素結合による二本鎖を形成した状態で、標的部位まで安定かつ効率的に送達されることが期待される。さらに標的(センス)遺伝子の存在下では、相補的水素結合能の弱い修飾型センスとの二本鎖から標的のセンスとの天然型二本鎖への巻き替えが起こると予想される。ここでは、この方法が機能するための主要課題である、① 酵素安定性、② 水素結合能、③ 二本鎖の巻き替え、および④ *in vivo* での動態について 15~21 mer の二本鎖 ODN について検討した結果を報告

\*1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University  
城西大学薬学部薬剤学教室

\*2) Department of Biological Sciences, The Nishi-Tokyo University 西東京科学大学理工学部バイオサイエンス学科

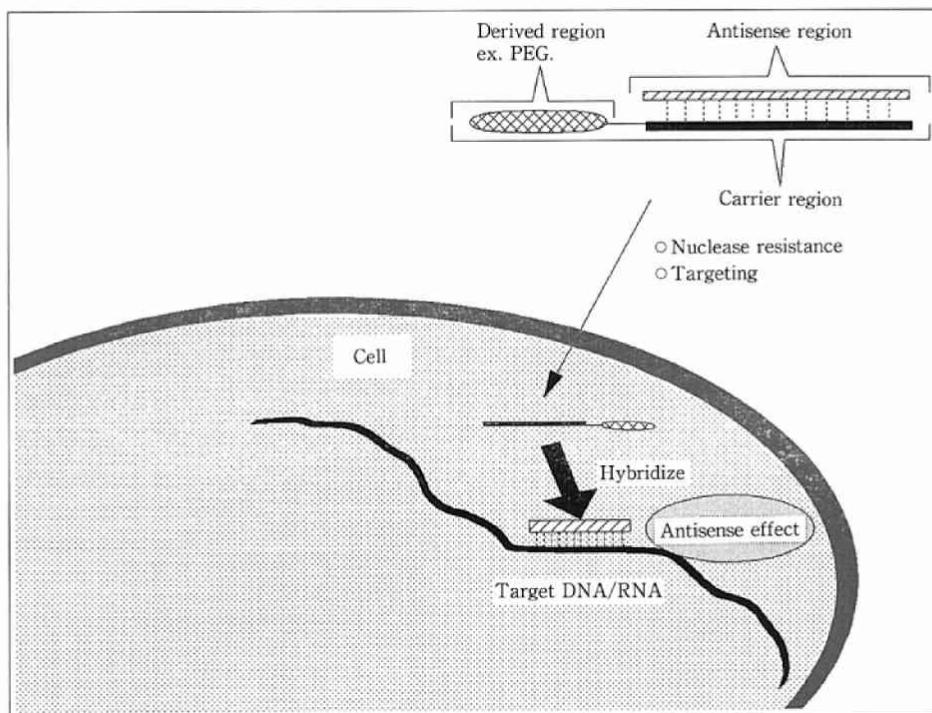


図 1 Conceptual figure of hemi-modified double-stranded oligodexynucleotides as a novel stabilizing and delivery method for antisense ODNs

する。

## 方法

### (1) 分離定量

HPLC システム(LC-9A, SPD-6A, CR-6A 島津社および 490 UV, ウォータース社)にイオン交換カラム(リクロスフェアー 4000 DMAE, メルク社)を接続し, 20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 9.0)-NaCl(0.1→1.0 M/60 min)を移動相として用いて, 260 nm における UV 吸収強度を検出, 測定した。

### (2) ODN の合成

ターゲットセンスとして chloramphenicol acetyltransferase 遺伝子の開始コドンを含む下流 15~21 塩基配列(ATG GAG AAA AAA ATC ACT GGA)を選択し, 図 2 に示す 3 種の修飾型センス ODN と, これと相補的な天然型アンチセンス ODN を合成した。ODN は DNA 合成機(Cyclone Plus, ミリポア社)を使用して,  $\beta$ -シアノエチルホスフォアミダイト法で合成した。S 置換

体(phosphorothioate, SO)の合成には Beaucage 試薬<sup>9)</sup>を用いた。5'位ポリエチレングリコール修飾体(PEG-PO)は5'末端修飾試薬(ミリポア社)を用いてヘキシルアミンリンカーを導入後, 活性化ポリエチレングリコール試薬(生化学工業)を用いて 1 ODN 分子当り分子量 5,000 の PEG 2 本を結合させた。チミジン 5 位のメチル基をフェニルエチル基に変換した修飾 ODN は, 先に報告した方法<sup>10)</sup>により合成した 5-フェニルエチル-2'-デオキシリジル酸をシアノエチルアミダイト化し, DNA 合成機を用いて ODN 中に組み込むことで合成した。

ODN の精製は, ゲル濾過カラム(Sephadex G-100, ファルマシア社)さらにカートリッジ型カラム(Oligo-Pack, ミリポア社)を用いて行い, 上記 HPLC による分析で 98%以上の純度のサンプルを得た。

### (3) Hybridization および Tm の測定

相補的な 2 種の一本鎖 ODN を等モル濃度(7.5  $\mu$ M)に 70 mM リン酸緩衝液(pH 7.4, 70 mM

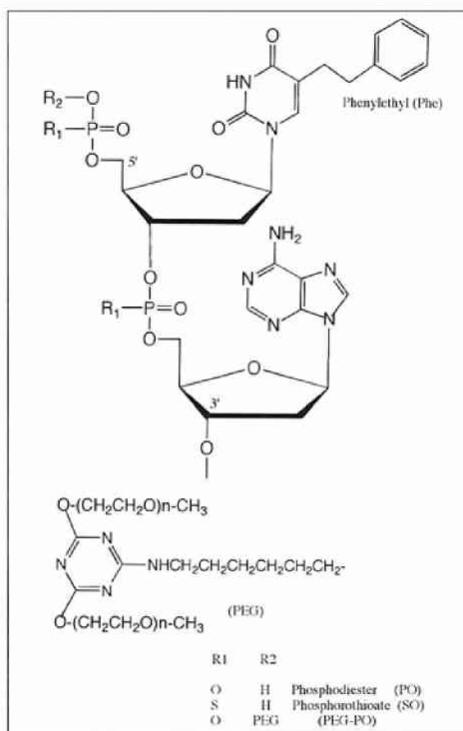


図 2 Chemical structures of modified oligodeoxynucleotides

NaCl 含有)に溶解し、70°Cに過熱後約2時間かけて徐々に15°Cまで冷却し、二本鎖を形成させた。TmはODN濃度1.0 OD(260 nm)のリン酸緩衝液の260 nmにおける吸光度を、15°Cより毎分1°Cの速度で昇温させて記録し、その吸光度変化の変曲点より求めた。

#### (4) 酵素安定性

40%ヒト血漿中37°CにおけるODN濃度(初濃度15 μM)を経時的にHPLCで測定して分解速度を求めた。

#### (5) マウス血漿中濃度

ODN 5.0 OD unitsを0.125 mlのリン酸緩衝液に溶解し、ddY系マウス(48~49 g)の頸静脈より投与した。採血は投与と反対側の頸静脈より行い、脱蛋白後HPLCにより定量した。

### 結果と考察

#### (1) ヒト血漿中での安定性

図3にヒト血漿中37°CにおけるODN(15 mer)の分解に伴う濃度減少を示す。一本鎖の天然型

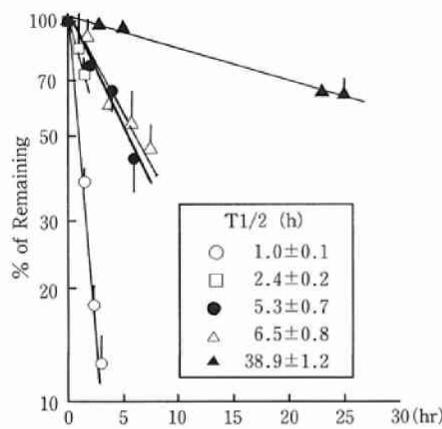


図3 Enzymatic degradation of 15 mer ODNs in 40% human plasma at 37°C (n=3, ±SD)

○ PO, □ PO-PEG, ● SO, △ PO:PO, ▲ PO:SO

表1 Tm values of double-stranded ODNs

Double-stranded ODN (mer)	Tm(°C)
PO-anti : PO-sense	15 50.7±0.1
PO-anti : PO-sense	21 62.6±0.8
PO-anti : SO-sense	15 42.1±0.7
PO-anti : PO-PEG-sense	15 52.9±1.3
PO-anti : PO-Phe-sense	21 65.8±2.0

ODO(PO)がおよそ1時間の分解半減期であるのに対して、同じく一本鎖のS置換体(SO)の半減期は5.3時間に延長し、天然型どうしの二本鎖(PO:PO)は6.5時間を示した。これに対して天然型アンチセンスをS置換センスと水素結合させた二本鎖ODN(PO:SO)は約40時間の半減期を示し、修飾型センスODNによる天然型アンチセンスの安定化効果が優れていることが示された。

#### (2) 塩基対形成能

表1に示すように、塩基対を形成する水素結合の強さを表すTm(°C)の値は、天然型同士の二本鎖(PO:PO)の値にくらべて、S置換体(PO:SO)の15 merでは8.6°Cの低下が観察され、S置換体では塩基対形成能が減弱していることが確認された。一方、PEG修飾体(PO:PEG-PO)の15 merでは2.2°C、フェニルエチル置換体(PO:Phe-PO)の21 merでは3.2°Cの上昇が観察された。

PEG-POおよびPhe-POにおけるTmの上昇

表 2 Dissociation of hemi-modified double-stranded ODNs and reconstitution of unmodified double-stranded ODNs

Double-ODN	Single-ODN, incubation	Tm* (°C)	
		before	after
PO-anti : PO-sense	—	50.7	—
PO-anti : SO-sense	PO-sense, equimolar	43.1	48.1
PO-anti : SO-sense	PO-sense, doublemolar	43.1	50.1
PO-anti : SO-sense	PO-nonsense, equimolar	43.1	43.0

\* Tms of before and after the incubation with single ODN.

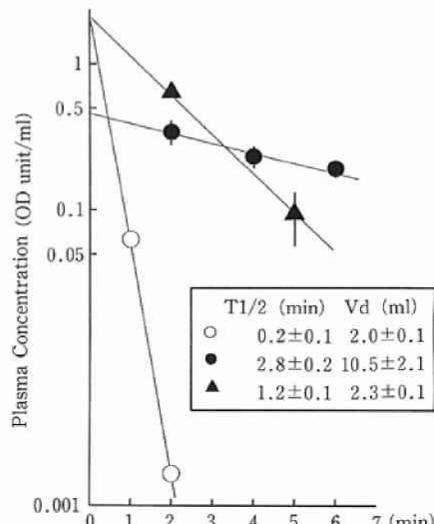


図 4 Plasma concentration-time profiles of ODNs after i.v. administration in mice ( $n=3, \pm SD$ )  
○ PO. ● SO. ▲ PO:SO

は、これらの修飾がその化学構造上、ODN 間の水素結合力に直接影響するとは考えにくいことから、修飾 ODN 側の一本鎖構造の安定化、たとえば stacking 効果によるものではないかと推測している。

### (3) 二本鎖の解離と再会合

最初にも述べたが、天然型のアンチセンス ODN が修飾型センス ODN との二本鎖として標的遺伝子まで送達された場合、天然型：修飾型二本鎖が解離して、天然型：天然型(標的遺伝子)二本鎖への再会合(巻き替え)が起こらなければならぬ。

そこで、ここでは、水素結合能の低下が観察された S 置換センス ODN と天然型アンチセンス ODN からなる二本鎖(PO:SO)が、天然型センス

ODN の存在下に巻き替えを起こすかどうかを検討した。表 2 に示すように、PO:SO の Tm は等モルのセンス PO とともにインキュベートすることで 5.0°C 上昇し、2 倍モルのセンス PO 存在下にはさらに 1.9°C 上昇して天然型二本鎖の Tm とほぼ同じ値を示した。一方、アンチセンス ODN と塩基配列の相補性を有しないナンセンス ODN の添加では PO:SO の Tm 上昇は観察されず、天然型二本鎖への巻き替えが塩基配列特異的に起こることが示された。

### (4) マウス *in vivo* での血中濃度

マウス頸静脈に各種 ODN(5.0 OD units)を投与後の血中濃度変化を図 4 に示す。一本鎖 ODN では、天然型(PO)と S 置換型(SO)を比較すると、PO が半減期およそ 0.2 分で急速に消失するのに対して、SO の消失半減期は 2~6 分の測定結果からは 2.8 分と計算された。また、測定点を外挿して求めた分布容積は、PO が 2.0 ml に対し、SO が 10.5 ml と 5 倍以上も大きかった。Phosphorothioate(SO)は蛋白結合能が大きいことが報告されており<sup>11)</sup>、今回観察された大きな分布容積と長い消失半減期は、いずれも蛋白結合が部分的に影響していると考えられる。

一方、天然型と S 置換型からなる二本鎖(PO:SO)は消失半減期が 1.2 分に延長した。また、PO:SO の分布容積は 2.3 ml で、天然型一本鎖 ODN とほぼ同じ値を示し、一本鎖 SO の蛋白結合能は天然型と二本鎖を形成することで減弱されることが示唆された。

本研究では、天然型のアンチセンス ODN の安定化のために修飾型 ODN を用いる可能性について検討した。今回の検討により、天然型(PO)と S 置換(phosphorothioate, SO)からなる二本鎖

ODN によって、酵素安定性の獲得と標的遺伝子の存在下に二本鎖の巻き替えが起こることが示唆され、体内動態については天然型と同様の分布が期待できる結果を得た。ポリエチレングリコール基の導入やチミジン 5 位のフェニルエチル基への置換では、水素結合能が天然型よりもむしろ増強することが観察され、今回の二本鎖 ODN への応用には適さないと考えられるが、これらの修飾方法では立体異性体を生じないことから、アンチセンス ODN 自身の修飾方法として有望と思われる。

### 文 献

- 1) Uhlmann, E., Peyman, A.: Antisense oligonucleotides : A new therapeutic principle. *Chem. Rev.* 90 : 544-584, 1990.
- 2) Plesner, P., Goodchild, J., Kalckar, H. M., Zamecnik, P. C. : Oligonucleotides with rapid turnover of the phosphate groups occur endogenously in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 1936-1939, 1987.
- 3) Eckstein, F. : Investigation of enzyme mechanisms with nucleoside phosphorothioates. *Annu. Rev. Biochem.* 54 : 367-402, 1985.
- 4) Ts' O, P. O. P., Miller, P. S., Aurelian, L., Murakami, A., Agris, C. et al. : An approach to chemotherapy based on base sequence information and nucleic acid chemistry. *Ann. NY. Acad. Sci.* 507 : 220-241, 1988.
- 5) Nielsen, J., Brill, W. K.-D., Caruthers, M. H. : Synthesis and characterization of dinucleoside phosphorothioates. *Tetrahed. Lett.* 29 : 2911-2914, 1988.
- 6) Summers, M. F., Powell, C., Egan, W., Byrd, R. A., Willson, W. D. et al. : Alkyl phosphotriester modified oligodeoxynucleotides. VI. NMR and UV spectroscopic studies of ethyl phosphotriester (Et) modified Rp-Rp and Sp-Sp duplexes. *Nucl. Acid Res.* 14 : 7421-7436, 1986.
- 7) Bower, M., Summers, M. F., Powell, C. : Oligodeoxynucleotide methylphosphonates. NMR and UV spectroscopic studies of Rp-Rp and Sp-Sp methylphosphonates modified duplexes of d(GGAATT-CC). *Nucl. Acid Res.* 14 : 9081-9093, 1986.
- 8) Sueishi, T., Seki, T., Juni, K., Hasegawa, T., Saneyoshi, M. et al. : Novel stabilizing method for antisense oligodeoxynucleotides. *Pharm. Res.* 11 : 455-457, 1994.
- 9) Iyer, R. P., Philips, L. R., Egan, W., Reagan, J. B., Beaucage, S. L. : The automated synthesis of sulfur-containing oligodeoxynucleotides using 3H-1,2-benzodithiol-3-one 1,1-dioxide as a sulfur-transfer reagent. *J. Org. Chem.* 55 : 4693-4699, 1990.
- 10) Yamaguchi, T., Saneyoshi, M. : Synthetic nucleosides and nucleotides. XXX. Synthesis and antiviral activity of 3'-azido, 2',3'-unsaturated and 2',3'-dideoxy derivatives of E-5-styryl-2'-deoxyuridine on human immunodeficiency virus. *Nucleosides and Nucleotides* 11 : 373-382, 1992.
- 11) Ghosh, M. K., Ghosh, K., Dahl, O., Cohen, J. S. : Evaluation of some properties of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide for antisense application. *Nucl. Acid Res.* 21 : 5761-5766, 1993.