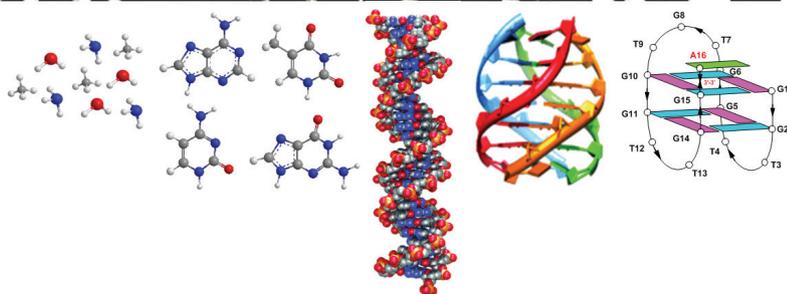
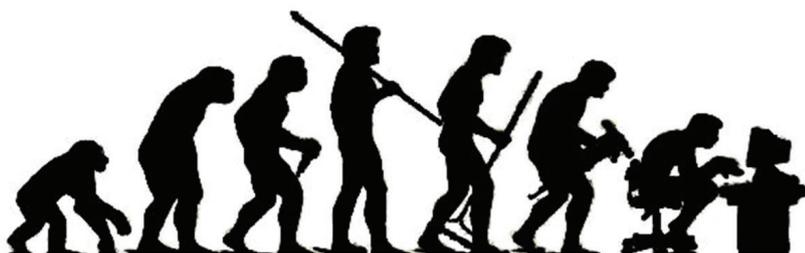


# MODIFICA DELL'APTAMERO ANTITROMBINA PER MIGLIORARNE STABILITÀ, AFFINITÀ VERSO IL TARGET E RESISTENZA ALLE NUCLEASI

L'INTRODUZIONE DI SITI DI INVERSIONE DELLA POLARITÀ ALLE ESTREMITÀ 5' E/O 3' DELLA SEQUENZA DELL'APTAMERO ANTI-TROMBINA (TBA) È UNA SEMPLICE MODIFICA IN GRADO MIGLIORARNE CONTEMPORANEAMENTE LA STABILITÀ TERMODINAMICA, L'AFFINITÀ PER LA TROMBINA E LA RESISTENZA ALLE NUCLEASI IN AMBIENTI BIOLOGICI



Gli aptameri sono ligandi ad elevato peso molecolare (6-40 kDa) composti da filamenti di RNA o DNA che possono essere individuati tramite una tecnica detta SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) [1]. Questa tecnica, a partire da "library" contenenti un elevato numero di oligonucleotidi di sequenza casuale e attraverso cicli ripetuti di selezione ed amplificazione delle sequenze selezionate, consente di individuare molecole dotate di elevata affinità e specificità verso un dato target di interesse terapeutico, diagnostico o analitico, che può essere sia una proteina, sia una piccola molecola come, ad esempio, un metabolita.

Rispetto agli anticorpi, entrati per primi nell'uso terapeutico, gli aptameri presentano alcuni vantaggi:

- 1) sono prodotti chimicamente tramite una strategia facilmente adattabile a scale di sintesi più elevate;
- 2) il processo chimico di produzione non è sensibile a contaminazioni virali o batteriche;
- 3) non sono molecole immunogeniche;
- 4) le loro dimensioni relativamente ridotte permettono un accesso più efficace nei vari compartimenti biologici;



- 5) tramite opportune modifiche della tecnologia SELEX possono essere selezionati anche contro molecole target presenti su superfici cellulari;
- 6) possono essere denaturati reversibilmente e il legame fosfodiesterico è estremamente stabile;
- 7) l'approccio sintetico per la loro preparazione permette la coniugazione con altre molecole funzionali [2].

Tuttavia gli aptameri presentano anche delle limitazioni, in particolare, per quanto riguarda il loro potenziale uso terapeutico:

- 1) la farmacocinetica e le altre proprietà sistemiche sono piuttosto variabili e spesso difficili da prevedere;
- 2) le dimensioni ridotte li rendono facilmente eliminabili tramite filtrazione renale (breve emivita);
- 3) se non opportunamente modificati, sono piuttosto sensibili all'azione delle nucleasi e quindi alla degradazione in siero.

Per questi motivi, dopo il processo di selezione, gli aptameri sono spesso soggetti a modifiche "post-SELEX" con lo scopo di migliorarne le proprietà generali o di dotarli di caratteristiche peculiari per un uso specifico [2]. Da un punto di vista strutturale, tali molecole spesso adottano complesse conformazioni tridimensionali che sono il risultato di una combinazione di interazioni intramolecolari di tipo Watson-Crick e di interazioni non canoniche.

Uno dei primi aptameri ad essere stato individuato è il cosiddetto TBA (Thrombin Binding Aptamer), un ligando caratterizzato da un'elevata affinità verso la trombina, una serina-proteasi coinvolta nella cascata della coagulazione, e quindi dotato di promettenti proprietà anticoagulanti [3]. Il TBA, la cui sequenza oligodeossinucleotidica è 5'-GGT-TGGTGGTGGTGG-3', adotta una particolare conformazione del DNA detta struttura G-quadruplex o quadrupla elica (Fig. 1) [4]. Se per il DNA a doppia elica le unità fondamentali sono le coppie di basi, alla base della costruzione delle strutture G-quadruplex vi sono le tetradi di G o quartetti di G (Fig. 1). La tetraide di G è una struttura macrociclica planare costituita da 4 guanine che interagiscono tra loro mediante una serie di legami idrogeno. Ciascuna base guaninica si comporta allo stesso tempo da donatore e da accettore di due legami idrogeno (legami di tipo Hoogsteen), che coinvolgono rispettivamente gli idrogeni N1-H e N2-H

di una guanina e l'azoto N7 e l'ossigeno O6 del residuo adiacente. In base alla sequenza, più tetradi di G possono sovrapporsi rendendo la struttura particolarmente stabile. La disposizione quadrata planare e la sovrapposizione di più tetradi crea una cavità centrale tra due tetradi adiacenti che è occupata da cationi monovalenti coordinati dagli atomi di ossigeno O6 delle guanine. Lo ione potassio è molto più efficace nello stabilizzare le strutture G-quadruplex rispetto ad altri cationi monovalenti. La struttura del TBA è stata determinata, in soluzione, con l'impiego della spettroscopia NMR [5] e, complessato con la trombina, mediante cristallografia a raggi X [6]. Il TBA in soluzione adotta preferenzialmente una struttura G-quadruplex monomolecolare, detta "a sedia", caratterizzata dalla presenza di due quartetti di G sovrapposti, collegati tra loro da un'ansa (*loop*) centrale di sequenza TGT e da due *loop* laterali più corti di sequenza TT. Ciascuna tetraide è caratterizzata da un'alternanza regolare di G con conformazioni glicosidiche *sin* e *anti* (Fig. 1). Secondo diversi autori, la maggior parte dei contatti DNA-proteina ha luogo a livello dei *loop* piccoli TT ed il TBA lega l'esosito anionico I della trombina, adottando una conformazione che differisce di poco da quella adottata nella forma libera [7]. Come nel caso di molti aptameri, uno dei principali inconvenienti associati all'uso del TBA è la sua breve emivita dovuta all'elevata sensibilità alle nucleasi che lo rende scarsamente

resistente in ambiente biologico. Per ovviare a questo problema in letteratura sono state proposte diverse modifiche riguardanti sia alterazioni dello zucchero che del legame fosfodiesterico. Ad esempio sono stati sintetizzati TBA modificati contenenti in certe posizioni 2'-deossi-2'-fluoroarabinosio [8], invece del naturale 2'-deossiribosio, oppure nucleotidi della serie L [9], invece che i nucleotidi naturali della serie D. Inoltre sono noti TBA modificati contenenti legami internucleotidici tiofosforici [10] o triazolici [11]. Sebbene la maggior parte di questi TBA modificati abbia mostrato una maggiore resistenza alle nucleasi, spesso la modifica introdotta non ha condotto ad un sensibile miglioramento dell'affinità verso la trombina e, talvolta, si è tradotta persino in un suo peggioramento. Questi risultati non dovrebbero sorprendere. Infatti, poiché gli aptameri sono il risultato finale di vari cicli di selezione, la struttura adottata è quella con la maggior affinità possibile per la molecola target ed è abbastanza probabile che una eventuale modifica della sequenza originale possa peggiorare l'interazione aptamero/target.

Nel 2005 la Food and Drug Administration americana ha approvato il primo aptamero in terapia, il pegaptanib, in grado di legare con alta affinità il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) contrastandone l'azione [12]. Per questo motivo il pegaptanib (noto con il nome commerciale di Macugen) è indicato per la degenerazione maculare senile

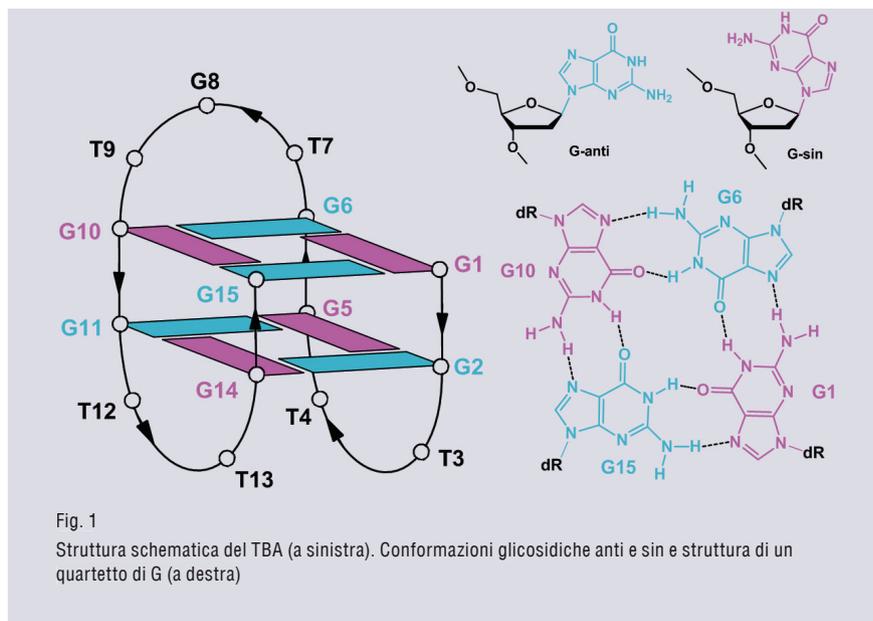


Fig. 1  
Struttura schematica del TBA (a sinistra). Conformazioni glicosidiche anti e sin e struttura di un quartetto di G (a destra)

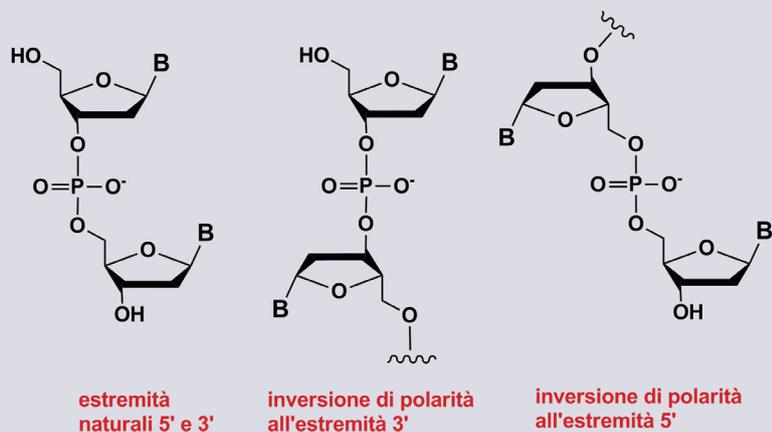


Fig. 2  
 Schema delle estremità naturali 5' e 3', e inversioni di polarità 3'-3' e 5'-5' alle estremità di una sequenza oligonucleotidica

di tipo “neovascolare”, una malattia provocata dalla formazione anomala di capillari al di sotto della retina. La soluzione adottata in questo caso per migliorare la resistenza dell'aptamero in ambiente biologico consiste nell'introdurre all'estremità 3' della sequenza oligodeossinucleotidica un sito di inversione della polarità con l'aggiunta di una timidina alla sequenza originale legata tramite un legame fosfodiesterico 3'-3' (Fig. 2). Grazie a questa strategia il pegaptanib è sufficientemente resistente in ambienti biologici in quanto privo dell'estremità 3' che è quella più suscettibile di degradazione enzimatica per la presenza ubiquitaria di 3'-esonucleasi. Sebbene questa modifica chimica presenti il pregio di poter essere introdotta facilmente dal punto di vista chimico, ed inoltre, non alteri la sequenza e quindi la struttura originale, il suo effetto non è stato testato su altri aptameri con un importante interesse terapeutico, in particolare quelli in grado di adottare una struttura G-quadruplex [13].

Per colmare questa lacuna, recentemente nel nostro laboratorio abbiamo preparato e studiato otto analoghi del TBA contenenti uno o due siti di inversione della polarità alle estremità della sequenza con lo scopo di aumentarne la resistenza alle 3'-esonucleasi o ad entrambe le 3'- e le 5'-esonucleasi (Tab. 1) [14]. Per la serie caratterizzata da un solo sito di inversione 3'-3' sono stati preparati 4 analoghi del TBA, ciascuno contenente un diverso

tipo di nucleotide. Nella serie contenente due siti di inversione è stato aggiunto un ulteriore nucleotide in 5' alle sequenze della serie precedente, scegliendo quello in grado di formare una coppia di basi Watson-Crick col residuo extra all'estremità 3' (Tab. 1).

La prima questione che abbiamo affrontato è se le sequenze modificate del TBA fossero in grado di adottare strutture G-quadruplex simili a quella originale. Da questo punto di vista, la tecnica di indagine più informativa per un primo approccio è il dicroismo circolare (CD) che, nel caso della struttura G-quadruplex adottata dal TBA, dà luogo ad un

profilo caratteristico con due bande positive a 247 e 295 nm ed una negativa a 266 nm. Un confronto immediato dello spettro CD degli aptameri modificati con quello del TBA originale ci ha permesso di concludere che, a parte G-TBA-C, tutte le sequenze modificate adottano strutture G-quadruplex molto simili a quella dell'aptamero originale (Fig. 3). Il profilo CD di G-TBA-C, al contrario, presenta delle differenze significative con quello del TBA originale, che riguardano sia l'ampiezza relativa delle bande che la loro lunghezza d'onda massima. Questo dato può essere spiegato con la presenza di una struttura G-quadruplex non perfettamente somigliante alla struttura “a sedia” originale oppure con l'esistenza in soluzione di più strutture G-quadruplex in equilibrio tra loro. Il CD è una tecnica utile anche per valutare la stabilità termodinamica delle strutture registrando la variazione del segnale CD in funzione della temperatura. Dalla curva sigmoide che si ottiene si può ricavare la temperatura di fusione ( $T_m$ ) corrispondente al valore al quale il 50% delle molecole si trova strutturato (G-quadruplex) e l'altra metà non strutturato (random coil). Dai valori delle  $T_m$  riportati in Tab. 1 è evidente che nella maggior parte dei casi l'introduzione di siti di inversione della polarità aumenta la stabilità termodinamica della struttura. In particolare, un singolo residuo di adenina in 3' (TBA-A) è in grado di aumentare di 12 °C la  $T_m$  della struttura G-quadruplex rispetto a quella del TBA originale, dato notevole, in particolare, se si tiene conto che è stato ottenuto con l'aggiunta di un solo nucleotide. Questo aspetto non è

Tab. 1  
 Sequenze e temperature di fusione ( $T_m$ ) del TBA e dei suoi analoghi

Nome	Sequenza	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$
TBA	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'	33	-
TBA-A	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'-3'-A	45	+12
TBA-T	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'-3'-T	41	+8
TBA-G	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'-3'-G	38.5	+5.5
TBA-C	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'-3'-C	37.5	+4.5
T-TBA-A	T-5'-5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'-3'-A	37	+4
A-TBA-T	A-5'-5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'-3'-T	32	-1
C-TBA-G	C-5'-5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'-3'-G	33	0
G-TBA-C	G-5'-5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'-3'-C	42.5	+9.5

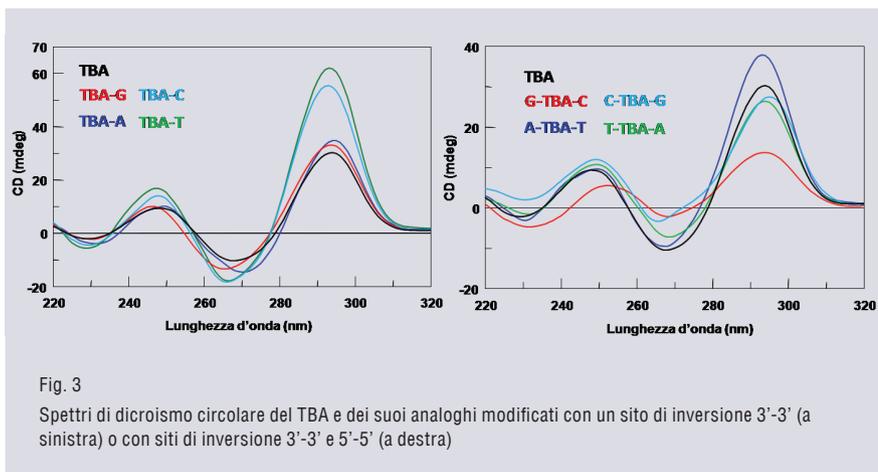


Fig. 3  
Spettri di dicroismo circolare del TBA e dei suoi analoghi modificati con un sito di inversione 3'-3' (a sinistra) o con siti di inversione 3'-3' e 5'-5' (a destra)

da trascurare considerando che, in condizioni fisiologiche di forza ionica (tampone fosfato salino in cui la concentrazione di potassio non è elevata), la  $T_m$  del TBA è di soli 33 °C, una temperatura inferiore a quella del corpo umano in condizioni normali. La Tab. 1 mette anche in evidenza che mentre l'introduzione di un solo nucleotide in 3' risulta sempre in un aumento della stabilità termica, la presenza di un ulteriore nucleotide in 5' non sempre dà luogo ad una temperatura di fusione maggiore del TBA originale.

La presenza di strutture G-quadruplex per i derivati modificati è stata ulteriormente confermata mediante la registrazione di spettri di differenza termica (TDS) [15]. Lo spettro di differenza termica di un oligonucleotide si ottiene sottraendo lo spettro di assorbanza UV della specie strutturata (cioè ad una temperatura inferiore alla  $T_m$ ) da quello della specie non strutturata (cioè ad una temperatura superiore alla  $T_m$ ). Poiché i vari tipi di strutture degli acidi nucleici mostrano degli spettri TDS

caratteristici, questa tecnica è risultata utile per confermare la presenza di G-quadruplex per i TBA modificati. Secondo i dati in letteratura gli spettri TDS delle strutture G-quadruplex sono caratterizzati dalla presenza di una banda positiva a circa 275 nm ed una negativa a circa 295 nm e da differenze maggiori nella regione compresa tra 220 e 270 nm [15]. Coerentemente, gli spettri TDS normalizzati dei TBA modificati mostrano una notevole somiglianza con quello del TBA originale nella regione tra 275 e 320 nm ed apprezzabili differenze nella regione tra 220 e 270 nm (Fig. 4). Quest'ultimo dato, tuttavia, non è particolarmente sorprendente se si tiene conto del fatto che tutte le sequenze modificate contengono una o due basi in più rispetto alla sequenza originale, in grado sia di assorbire di per sé la radiazione UV che di influenzare l'assorbimento UV delle guanine coinvolte nella formazione della tetraed adiacente.

Sebbene il notevole aumento della stabilità termica tramite una modifica così modesta

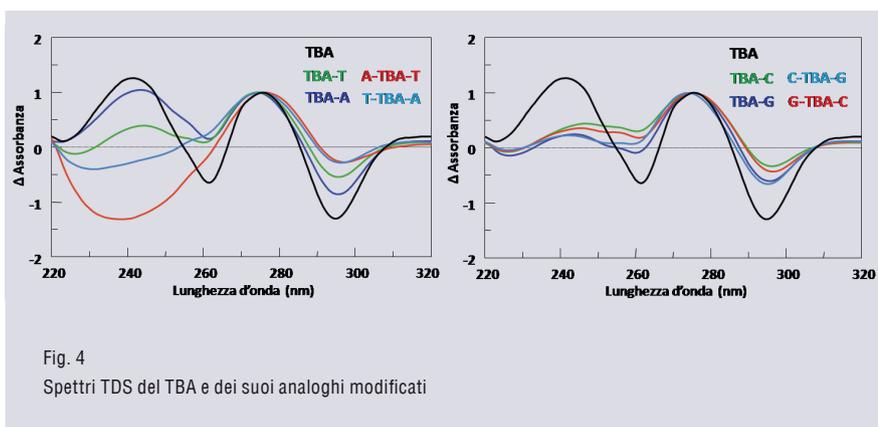


Fig. 4  
Spettri TDS del TBA e dei suoi analoghi modificati

possa essere considerato un dato rilevante, i risultati più interessanti sono stati ottenuti nella misurazione dell'affinità degli aptameri modificati verso la loro proteina target, la trombina, e nella valutazione della loro resistenza in ambiente biologico. L'affinità verso la trombina è stata valutata tramite il saggio di aumento del tempo di coagulazione del fibrinogeno (Prolonged fibrinogen clotting assay) che consiste nel misurare l'incremento del tempo di formazione del coagulo dovuto alla presenza dell'aptamero che rallenta la trasformazione, catalizzata dalla trombina, del fibrinogeno in fibrina [16]. In base ai dati riassunti nell'istogramma in Fig. 5 gli aptameri modificati possono essere suddivisi in tre gruppi:

- 1) aptameri modificati caratterizzati da tempi di coagulazione migliori del TBA (TBA-A, TBA-G e T-TBA-A);
- 2) aptameri modificati con tempi di coagulazione paragonabili a quello del TBA (TBA-C e A-TBA-T);
- 3) aptameri modificati con tempi di coagulazione inferiori a quelli del TBA (TBA-T, G-TBA-C e C-TBA-G).

Sebbene la complessità dell'interazione aptamero/trombina e dei fattori coinvolti non ci permetta di razionalizzare completamente i dati, questo saggio ha messo chiaramente in evidenza che gli aptameri migliori (quelli del primo gruppo) condividono la presenza di un nucleotide purinico in 3', anche se, alla luce degli altri dati, questa non può essere considerata una condizione sufficiente ad incrementare l'affinità verso la trombina rispetto al TBA. Tuttavia l'aspetto più importante della nostra ricerca e l'obiettivo delle modifiche apportate alla sequenza originale riguardano la resistenza degli aptameri modificati in ambienti biologici. Per testare questa proprietà tutte le sequenze modificate sono state sottoposte ad un saggio di degradazione in siero fetale bovino, una procedura comunemente usata per valutare la capacità di oligonucleotidi di interesse terapeutico di resistere alla degradazione enzimatica da parte delle nucleasi. Successivamente, gli eventuali prodotti di degradazione sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide.

I risultati hanno chiaramente indicato che tutti gli aptameri modificati sono resistenti alle nucleasi fino a 24 ore, mentre da dati in letteratura è noto che, nelle stesse condizioni, il TBA non modificato si degrada quasi completamente in solo un'ora [8]. I risultati ottenuti

per gli aptameri modificati contenenti entrambi i tipi di inversione della polarità non hanno indicato una maggiore resistenza all'azione enzimatica rispetto agli aptameri modificati contenenti solo un sito di inversione della polarità 3'-3'.

Analoghi del TBA contenenti siti di inversione della polarità all'interno della sequenza originale erano già stati riportati in letteratura. In particolare l'oligonucleotide 3'-GGT-5'-5'-TG-GTGTGGTTGG-3' è stato l'oggetto di diverse indagini [17]. Sebbene lo studio del suo complesso con la trombina abbia permesso di chiarire diversi aspetti dell'interazione TBA/trombina [18], questo aptamero modificato possiede peggiori proprietà anticoagulanti rispetto al TBA ed inoltre, essendo caratterizzato da due estremità 3' non potrebbe essere resistente alla degradazione enzimatica da parte delle nucleasi. Al contrario, l'aggiunta di un ulteriore nucleotide all'estremità 3' della sequenza originale tramite un legame fosfodiesterico, quindi senza alterazioni della sequenza iniziale, ha permesso simultaneamente di rendere tutti gli aptameri resistenti alla degradazione enzimatica, migliorare l'affinità verso la trombina nel caso di TBA-A,

TBA-G e T-TBA-A e aumentare la stabilità termodinamica nella maggior parte dei casi. Considerando il miglioramento generale delle proprietà del TBA, l'opportuna introduzione di siti di inversione della polarità alle estremità della sequenza può essere considerata una promettente modifica post-SELEX che sarebbe interessante estendere ad altri aptameri che adottano strutture G-quadruplex [13], in particolare, se si tiene conto della semplicità con cui questa modifica chimica può essere introdotta in una sequenza oligonucleotidica.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Darmostuck *et al.*, *Biotechnol Adv.* 2015, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.008.
- [2] A.D. Keefe *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2010, **9**, 537.
- [3] L.C. Bock *et al.*, *Nature*, 1992, **355**, 564.
- [4] S. Burge *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 5402.
- [5] V.M. Marathias *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2000, **28**, 1969.
- [6] I. Russo Krauss *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, 8119.
- [7] V.M. Marathias *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2000, **28**, 1969.
- [8] C.G. Peng *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, 4977.
- [9] A. Virgilio *et al.*, *ChemBioChem*, 2014, **15**, 652.
- [10] M. Zaitseva *et al.*, *Biophys. Chem.*, 2010, **146**, 1.
- [11] A.M. Varizhuk *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **67**, 90.
- [12] E.W. Ng *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2006, **5**, 123.
- [13] B. Gatto *et al.*, *Curr. Med. Chem.*, 2009, **16**, 1248.
- [14] V. Esposito *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 8840.
- [15] J.L. Mergny *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, e138.
- [16] R. De Cristofaro *et al.*, *J. Protein Chem.*, 1991, **10**, 455.
- [17] L. Martino *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 6653.
- [18] I. Russo Krauss *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2011, **39**, 7858.

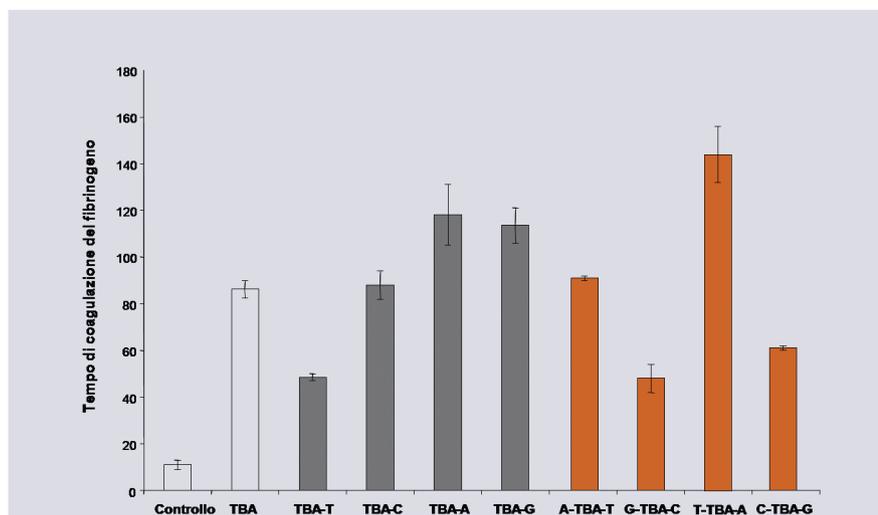


Fig. 5  
Istogramma dei tempi di coagulazione del TBA e dei suoi analoghi modificati

#### A simple modification in the thrombin binding aptamer improving the stability, affinity to the target and nuclease resistance

The introduction of inversion of polarity sites at the 5'- and/or 3'-end in thrombin binding aptamer (TBA) is a simple modification able to improve, at the same time, thermal stability, affinity to thrombin and nuclease resistance in biological environments.

ALDO GALEONE - VERONICA ESPOSITO  
ANTONELLA VIRGILIO - MICHELA VARRA  
RITA SANTAMARIA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"

GALEONE@UNINA.IT