

2m11.3019.5

Université de Montréal

Potentiel pharmacologique d'une nouvelle classe d'antisens
dans l'application de la thérapie génique

par
Julie Lacombe

Département de pharmacologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès science (M. Sc.)
en pharmacologie

Avril 2002

© Julie Lacombe, 2002



W
4
U58
2002
nr. 122

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
Potentiel pharmacologique d'une nouvelle classe d'antisens
dans l'application de la thérapie génique

présenté par:
Julie Lacombe

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Guy Rousseau
président-rapporteur

Dr Martin G. Sirois
directeur de recherche

Dr Richard Montparler
membre du jury

RÉSUMÉ

L'utilisation d'oligodésoxyribonucléotides antisens est un outil puissant pour réguler l'expression génique et le développement de nouvelles structures représente un domaine en pleine effervescence en chimie médicinale. En effet, nous cherchons à développer des molécules dont l'affinité de liaison pour l'ARNm serait plus élevée, tout en possédant la capacité d'activer la RNase H, l'enzyme qui reconnaît le complexe ADN / ARNm et qui dégrade l'ARNm.

Il a déjà été démontré qu'une inversion de configuration en position C2' du ribose de l'ADN (ANA), combinée à la substitution du groupement 2'OH par un atome fluor (2'-F-ANA) augmente l'affinité de liaison de l'oligonucléotide à l'ARNm. Lors de notre étude, nous avons évalué l'activité antisens d'oligonucléotides phosphorothioates chimériques composés de 2'-désoxy-2'-fluoro- β -D-arabinose et de 2'-désoxyribose (chimère S-2'-F-ANA / ADN) comportant un sucre en conformation L à leur extrémité 3'. Nous avons déterminé la capacité de ces molécules à inhiber l'expression et la phosphorylation de Flk-1, un récepteur du VEGF ainsi que les effets médiés par le VEGF, soit la prolifération, la migration et la synthèse du «platelet-activating factor» (PAF) au niveau des cellules endothéliales (CE). Le traitement de CE d'aorte bovine avec les chimères S-2'-F-ANA / ADN a permis de réduire l'expression protéique ainsi que la phosphorylation de Flk-1 plus efficacement qu'un traitement avec les antisens d'ADN phosphorothioates (S-DNA) utilisés comme témoins positifs. Par contre, ces deux classes d'antisens ont inhibé les effets biologiques du VEGF de la même manière. Cette étude démontre aussi la capacité des antisens chimériques à activer la RNase H et leur meilleure affinité de liaison envers l'ARN comparativement aux antisens S-DNA.

Mots clés: ADN antisens, 2'-F-ANA, antisens chimériques, VEGF, Flk-1

SUMMARY

The use of oligonucleotides complementary to specific mRNA sequences is a powerful tool to regulate gene expression. The design of new antisense agents capable of increased binding affinity for their target mRNA, while still activating ribonuclease (RNase) H is a major research area in medicinal chemistry. RNase H is an ubiquitous enzyme that recognizes mRNA / DNA duplex and cleaves the complementary mRNA strand, providing the main mechanism by which antisense oligomers elicit their activities.

It has previously been shown that configuration inversion at C2'-position of the DNA sugar moiety (ANA), combined to the substitution of 2'OH group by a fluorine atom (2'F-ANA) increases binding affinity of oligomers for the targeted RNA. In the present study, we evaluated the antisense activity of mixed-backbone phosphorothioate oligomers composed of 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinose and 2'-deoxyribose sugars (S-2'F-ANA / DNA chimeras) with L-deoxyguanosine at their 3'-end. We determined their abilities to inhibit the protein expression and phosphorylation of Flk-1, a VEGF receptor as well as VEGF biological effects on endothelial cell proliferation, migration and platelet-activating factor (PAF) synthesis. Treatment of bovine aortic endothelial cells (BAEC) with chimeric oligonucleotides reduced Flk-1 protein expression and phosphorylation more efficiently than with phosphorothioate antisenses (S-DNA), which were used as positive controls. Nonetheless, these two classes of antisenses inhibited VEGF activities equally. Herein, we also demonstrated the chimeric oligomers' capacity to elicit RNase H activity and their improved binding affinity for complementary RNA as compared to S-DNA.

Keywords: antisense DNA, 2'F-ANA, mixed-backbone antisense, VEGF, Flk-1

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
REMERCIEMENTS.....	x
1.0. INTRODUCTION.....	1
1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTISENS.....	1
1.1.1. Définition	
1.1.2. Utilisation	
1.2. MÉCANISMES D'ACTION.....	2
1.2.1. Inhibition de la transcription de l'ARNm	
1.2.2. Inhibition des modifications post-transcriptionnelles	
1.2.3. Inhibition de la traduction des protéines	
1.2.4. Activation de la RNase H	
1.3. PROPRIÉTÉS DES OLIGONUCLÉOTIDES ANTISENS.....	7
1.3.1. Choix du gène et de sa séquence	
1.3.2. Longueur de l'oligonucléotide antisens	
1.3.3. Principes de base	
1.4. STRUCTURES DES OLIGONUCLÉOTIDES ANTISENS.....	11
1.4.1. Les phosphorothioates	
1.4.2. La L-désoxycytosine	
1.4.3. Les modifications en position 2' du sucre	
1.4.4. Les oligonucléotides chimériques	
1.5. APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES.....	16
1.6. BUT DE L'ÉTUDE.....	17
2.0. ARTICLE.....	18
2.1. ABSTRACT.....	20

2.2.	RÉSUMÉ.....	21
2.3.	INTRODUCTION.....	22
2.4.	MATERIALS AND METHODS.....	25
2.5.	RESULTS.....	33
2.6.	DISCUSSION.....	42
2.7.	ACKNOWLEDGMENTS.....	45
2.8.	REFERENCES.....	46
2.9.	FOOTNOTES.....	49
2.10.	LEGENDS.....	50
2.11.	FIGURES.....	54
3.0.	DISCUSSION.....	62
3.1.	LES CHIMÈRES S-2'F-ANA / DNA ONT UNE MEILLEURE AFFINITÉ DE LIAISON À L'ARN.....	62
3.2.	LES CHIMÈRES S-2'F-ANA / DNA ACTIVENT LA RNASE H.....	63
3.3.	LES CHIMÈRES S-2'F-ANA / DNA RÉDUISENT LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DE FLK-1 ET SA PHOSPHORYLATION INDUITE PAR LE VEGF.....	64
3.4.	LES CHIMÈRES S-2'F-ANA / DNA INHIBENT LES EFFETS BIOLOGIQUES DU VEGF: LA PROLIFÉRATION, LA MIGRATION ET LA SYNTHÈSE DE PAF.....	65
4.0.	CONCLUSION.....	67
5.0.	RÉFÉRENCES.....	68
6.0.	ANNEXE I.....	75

LISTE DES TABLEAUX**ARTICLE**

Table 1: Melting temperature (T_m) of hybrids formed between antisense oligonucleotides and target RNA.....	54
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schématisation des principaux sites d'action des oligonucléotides antisens.....	4
Figure 2: Mécanisme d'inhibition de la synthèse protéique par activation de la RNase H.....	6
Figure 3: Structure d'un oligonucléotide antisens modifié composé de résidus S-2'F-ANA et d'ADN.....	12
Figure 4: Structure d'un désoxyribose en conformation D et L	13

ARTICLE

Figure 1: Chemical structure of DNA, phosphorothioate DNA and mixed-backbone S-2'F-ANA / DNA oligomers.....	55
Figure 2: RNase H cleavage of RNA duplexed with various antisense oligomers structures.....	56
Figure 3: Comparative Western blot analyses of Flk-1 protein expression in BAEC pretreated with phosphorothioate or chimeric S-2'F-ANA / DNA oligomers.....	57
Figure 4: Comparative Western blot analyses of Flk-1 activation on BAEC pretreated with phosphorothioate DNA or S-2'F-ANA / DNA oligomers.....	58
Figure 5: Comparative effects of phosphorothioate DNA and chimeric S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers on VEGF-induced BAEC proliferation.....	59
Figure 6: Comparative effects of phosphorothioate DNA and chimeric S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers on VEGF-induced BAEC migration.....	60
Figure 7: Comparative effects of phosphorothioate DNA and chimeric S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers on VEGF-induced BAEC PAF synthesis.....	61

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
ANA	: acide arabinonucléique
2'F-ANA	: 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleic acid
S-2'F-ANA	: phosphorothioate 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleic acid
ARNm	: acide ribonucléique messenger
BAEC	: cellules endothéliales d'aorte bovine
PAF	: facteur d'activation plaquettaire
RNase H	: ribonucléase H
S-DNA	: phosphorothioate deoxyribonucleic acid
VEGF	: vascular endothelial growth factor

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement:

1. Le Dr Martin G. Sirois, pour m'avoir dirigé tout au long de ma maîtrise et pour son support financier.
2. Mes collègues de travail, pour leurs encouragements et leur amitié.
3. Les membres du jury, pour leurs corrections et leurs commentaires judicieux.
4. Mes parents, pour leur soutien moral et financier.
5. Mes amis, pour leur amitié et leur support.

1.0. INTRODUCTION

1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTISENS

1.1.1. Définition

C'est grâce aux études de Watson et Crick que nous savons maintenant que l'ADN est une double hélice formée de deux brins de nucléotides complémentaires. Les nucléotides se différencient entre eux par la nature de la base qu'ils portent, et l'appariement de ces bases dans la double hélice se fait de manière spécifique, c'est-à-dire que l'adénosine se lie exclusivement à la thymidine et la guanosine à la cytosine. Les bases complémentaires de chaque brin sont retenues ensemble par des ponts hydrogènes. Le brin sens d'un gène contient l'information qui dicte le contenu en acides aminés de la protéine provenant de ce gène. Par opposition, le brin complémentaire portera la même information, mais dans l'orientation antisens. C'est ici que le terme ADN antisens trouve son origine.

1.1.2. Utilisation

L'utilisation de molécules d'ADN antisens pour bloquer l'expression d'un gène spécifique est un outil de choix pour les biologistes moléculaires qui désirent étudier la fonction d'un gène (1, 2). Les oligodésoxyribonucléotides sont des molécules possédant un potentiel thérapeutique important étant donné qu'ils permettent de réduire, voire même d'inhiber l'expression de gènes viraux et d'oncogènes de manière spécifique et sélective. La plupart des oligonucléotides antisens vont exercer leur action en empêchant la synthèse protéique d'un gène suite à une inactivation de

l'ARN messager (ARNm) correspondant. Il est à noter que dans l'ARN, la thymidine est remplacée par l'uracile. Zamecnik et Stephenson ont été les premiers à démontrer le potentiel des oligonucléotides antisens synthétiques à des fins thérapeutiques. En ciblant l'ARNm du virus du sarcome de Rous avec un ADN antisens de 13 bases dirigés contre une séquence spécifique, ils ont été capables de bloquer la croissance du virus dans des fibroblastes de poulet transfectés et en culture (3, 4).

1.2. MÉCANISMES D'ACTION

1.2.1. Inhibition de la transcription de l'ARNm

Les ADN antisens peuvent bloquer l'expression d'un gène en interférant avec la transcription de l'ADN en ARNm (Figure 1a). La transcription de l'ADN débute par la reconnaissance d'un codon d'initiation spécifique sur l'ADN par l'ARN polymérase qui se lie à l'ADN double brin. L'ADN se déroule pour laisser place à la transcription et c'est à cette étape que l'ADN antisens s'hybride à l'ADN et ainsi bloque la transcription de l'ADN (5).

1.2.2. Inhibition des modifications post-transcriptionnelles

L'ARNm subit plusieurs modifications avant d'atteindre la maturité et d'être transloqué au cytoplasme. Dans le nucléoplasme, les régions non codantes (les introns) de l'ARNm sont excisées et les extrémités 5' sont modifiées pour une meilleure stabilité. De plus, différentes bases sont altérées et l'ARNm subit une polyadénylation en 3', ce qui facilite son exportation. Les ADN antisens peuvent

aussi interagir à chacune de ces étapes pour inhiber l'expression d'un gène (Figure 1b et 1c) (6).

1.2.3. Inhibition de la traduction des protéines

Certains mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer l'activité des oligonucléotides antisens. La plupart de ceux-ci ont été conçus de manière à inhiber la traduction de l'ARNm en protéines (Figure 1d). Les ADN antisens complémentaires à la région d'initiation de la traduction (codon AUG) de l'ARNm causent un encombrement stérique qui empêche les ribosomes et les facteurs d'initiation de la traduction de s'attacher à l'ARNm (7). En effet, les structures secondaires formées par les ADN antisens liés à l'ARNm en proximité du codon AUG causent un arrêt de la traduction, possiblement à cause de la perte de la conformation requise pour l'assemblage des ribosomes. Par contre, il se peut qu'un codon AUG précédé d'une séquence ressemblant à celles reconnues par les ribosomes se retrouve plus loin sur la séquence de l'ARNm. Donc même si le codon d'initiation de la traduction est masqué, les ribosomes peuvent reconnaître une autre séquence et synthétiser une protéine tronquée du côté N-terminal (5). Le problème ici, c'est que la protéine synthétisée pourrait possiblement être active. Les antisens visant la région 5' non codante des ARNm ou celle en proximité du codon AUG sont les plus efficaces étant donné qu'ils empêchent la liaison d'activateurs et de facteurs d'initiation de la traduction.

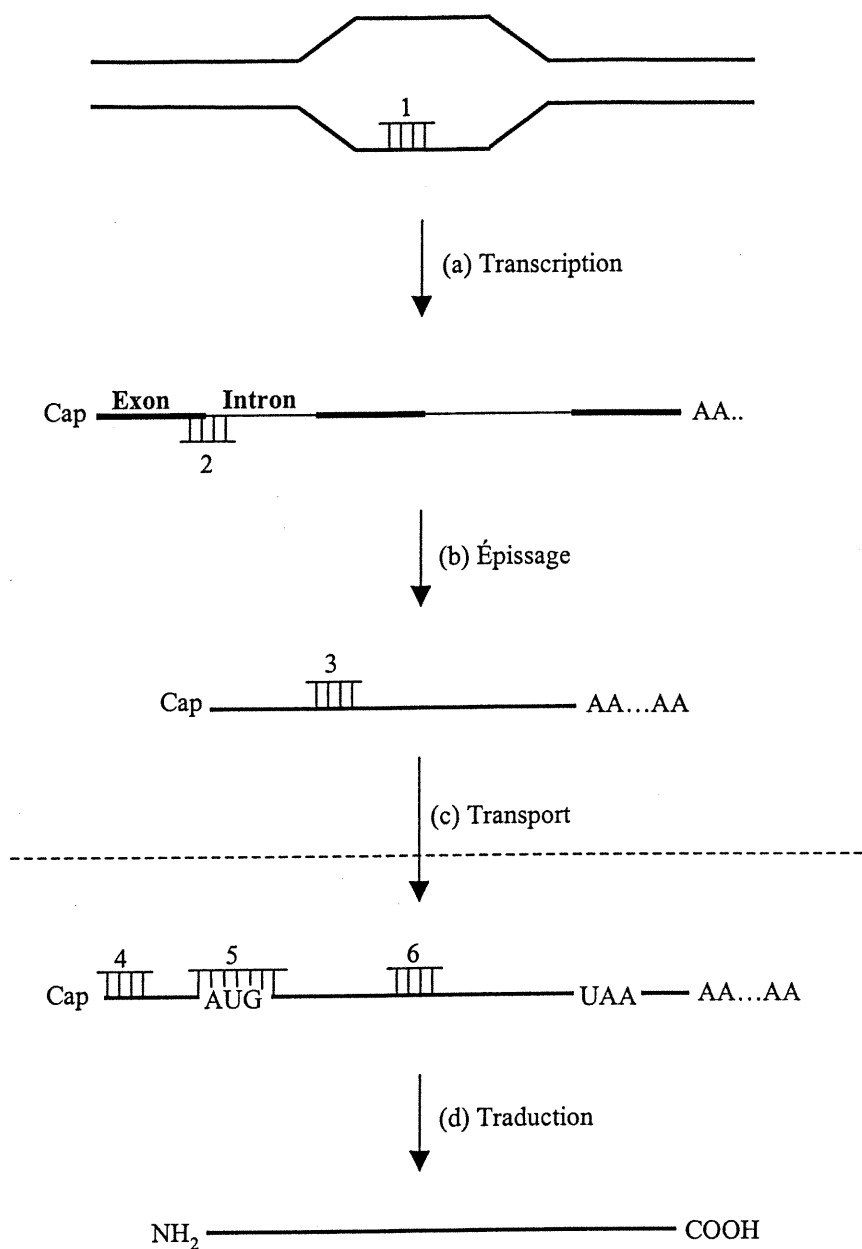


Figure 1: Schématisation des principaux sites d'action des oligonucléotides antisens. Les fragments d'ADN antisens peuvent interférer: (a) avec la transcription de l'ADN en se liant dans la boucle créée par l'ARN polymérase (1); (b) avec l'épissage par hybridation à la jonction intron-exon (2); (c) avec le transport de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme (3); (d) avec la traduction, par l'inhibition de la liaison des facteurs d'initiation (4), l'inhibition de l'assemblage du ribosome au site d'initiation (5) ou par l'inhibition du glissement du ribosome le long de la séquence codante (6).

1.2.4. Activation de la RNase H

La régulation de la traduction de l'ARNm peut également être contrôlée par l'activité catalytique de la RNase H (Figure 2). En effet, ce phénomène semble être le plus impliqué dans l'inhibition de l'expression de gènes par les antisens. Dans un premier temps, le fragment d'ADN s'hybride avec sa séquence complémentaire sur l'ARNm. Le duplexe ADN / ARN ainsi formé active la RNase H, une enzyme ubiquitaire responsable du clivage de l'ARNm d'un complexe ADN / ARN. La RNase H activée va cliver l'ARNm au site de l'hétéroduplexe et suite à leur dissociation, les fragments d'ARNm clivés sont digérés par des exonucléases (8). La dégradation du brin d'ARNm entraîne l'arrêt de sa synthèse protéique et par conséquent l'inhibition de l'expression du gène correspondant. Pour sa part, l'ADN antisens peut à nouveau s'hybrider à la séquence d'un nouvel ARNm complémentaire et poursuivre son activité inhibitrice de la synthèse protéique cible.

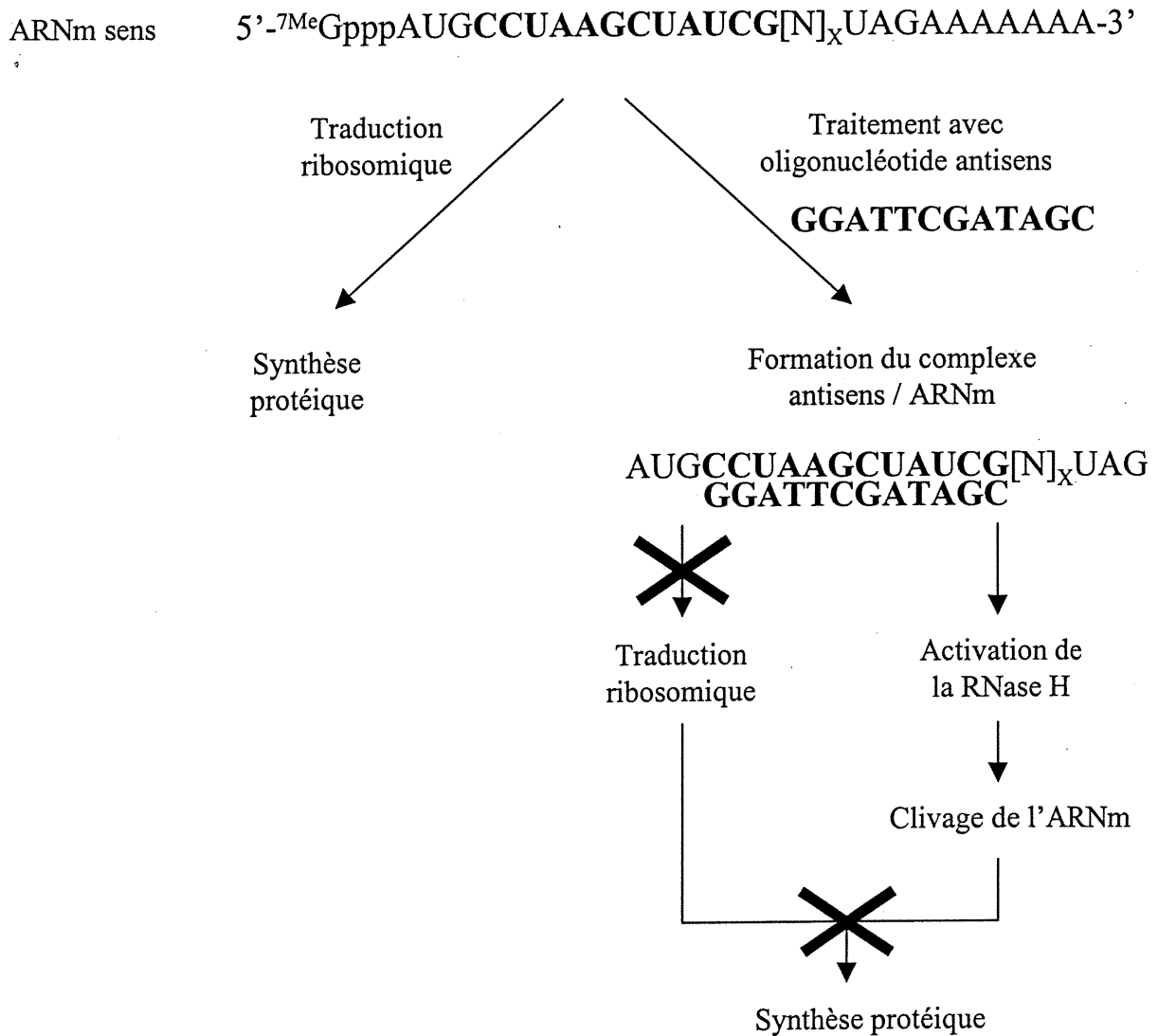


Figure 2: Mécanisme d'inhibition de la synthèse protéique par activation de la RNase H. Un oligonucléotide antisens s'hybride à sa séquence complémentaire sur l'ARNm cible. La formation du complexe antisens / ARNm bloque la traduction ribosomique et active la RNase H qui vient cliver l'ARNm provoquant l'inhibition de l'expression du gène ciblé.

1.3. PROPRIÉTÉS DES OLIGONUCLÉOTIDES ANTISENS

1.3.1. Choix du gène et de sa séquence

Plusieurs paramètres doivent être pris en considération afin d'assurer une bonne efficacité des oligonucléotides antisens. En effet, il est important de bien choisir le gène ainsi que la séquence de son ARNm qui seront visés. La sélection du gène à inhiber est très importante, étant donné que dans le cas de gènes très fortement exprimés, il est difficile d'obtenir une inhibition complète de leur synthèse protéique (9) et certaines protéines n'ont besoin que d'une faible expression pour être biologiquement actives. Les gènes exprimés transitoirement, comme ceux impliqués dans des pathologies (récepteur B₁ de la bradykinine dans la resténose (9)), sont des cibles de choix pour la thérapie génique par antisens. Même si le gène sélectionné semble être le plus approprié, on doit aussi tenir compte de la séquence à cibler. Un léger déplacement de la séquence de l'ADN antisens est suffisant pour affecter grandement l'efficacité de la traduction de l'ARNm. En effet, la séquence de l'oligomère ne doit pas comporter quatre résidus guanosines en série, car une telle séquence pourrait potentiellement se lier à différents facteurs de croissance ayant une affinité de liaison pour l'héparine et ainsi prévenir la liaison de ces facteurs à leurs récepteurs (10, 11). De plus, l'oligonucléotide doit être sous forme linéaire à la température où il est utilisé. Son efficacité sera diminuée si sa séquence favorise un repliement sur lui-même pour former une structure appelée boucle à cheveux ou «hairpin», étant donné que la formation d'une telle structure prévient l'hybridation de l'oligomère à son ARNm complémentaire.

1.3.2. Longueur de l'oligonucléotide antisens

La longueur de l'oligonucléotide n'affecte pas directement l'efficacité de la traduction d'un ARNm en protéine, mais pour obtenir une spécificité et une efficacité de liaison optimales, les ADN antisens devraient avoir une longueur d'environ 15-20 bases (5). Statistiquement, cette longueur offre une sélectivité adéquate, si on considère que le génome des mammifères, dont l'humain, contient environ trois milliards de base et que seulement 10-20% des gènes sont transcrits en ARNm à un moment précis. Les oligonucléotides de longueur supérieure sont plus susceptibles de s'hybrider non spécifiquement, tandis que les plus petits peuvent reconnaître plusieurs ARNm. De plus, la digestion partielle de longs fragments peut produire de plus petites molécules qui peuvent à leur tour agir comme ADN antisens (9). Il a aussi été démontré qu'une augmentation de la longueur d'un oligonucléotide correspond à une diminution de l'efficacité de son entrée dans les cellules (5).

1.3.3. Principes de base

Malgré le choix d'une molécule d'ADN tenant compte de tous les facteurs mentionnés ci-haut, certains principes doivent être respectés pour la mise en pratique de la thérapie génique par antisens.

1. **Le complexe formé par l'oligonucléotide et l'ARNm complémentaire doit être suffisamment stable en conditions physiologiques.** Plusieurs propriétés des oligonucléotides concernant leur structure vont être déterminantes pour leur efficacité. C'est le cas des propriétés physicochimiques des antisens comme la

température de fusion qui caractérise l'affinité de liaison entre l'oligonucléotide et sa séquence complémentaire. La température de fusion est la température à laquelle 50% des hybrides ADN / ARN sont dissociés en deux simples brins. La stabilité du complexe va augmenter en proportion du nombre de cytosines et de guanosines, étant donné que l'interaction entre ces deux bases requiert trois ponts hydrogènes. En conditions physiologiques, au moins douze bases sont requises pour que le duplexe ADN / ARN ait une stabilité raisonnable (5).

2. L'interaction entre l'oligonucléotide et sa séquence cible doit être spécifique.

Il est primordial que le fragment d'ADN antisens ne reconnaisse qu'une seule séquence sur l'ARNm étant donné que nous désirons bloquer l'expression d'un seul gène. Il a déjà été discuté plus tôt que l'oligonucléotide antisens doit posséder une longueur d'environ 15-20 bases afin d'assurer sa spécificité. Par contre, on veut aussi s'assurer que l'oligonucléotide antisens inhibe l'expression protéique d'un gène en se liant à sa séquence complémentaire sur son ARNm et non par des effets non spécifiques comme, par exemple, en se liant à des protéines. L'utilisation d'un fragment d'ADN possédant une séquence dite «scrambled», c'est-à-dire possédant les mêmes nucléotides qu'une séquence antisens donnée, mais dans un ordre aléatoire, ne devrait pas avoir d'effets sur l'expression du gène ciblé. De cette manière, nous nous assurons que l'ADN antisens exerce son activité par sa liaison à son ARNm complémentaire.

- 3. L'oligonucléotide doit avoir une demi-vie suffisamment élevée *in vivo* pour accomplir son action dans la cellule.** Les ADN antisens se doivent aussi d'être stables sous conditions expérimentales; toutefois, ils sont sujets à la dégradation par les nucléases contenues dans le sérum et dans les cellules (12). Les oligonucléotides sont dégradés en quelques heures dans le sérum de veau et si les conditions sont optimales, 15 minutes peuvent être suffisantes. La solution à ce stade-ci est de modifier la structure des ADN antisens afin qu'ils résistent mieux à la dégradation induite par les exo- et les endonucléases.
- 4. L'oligonucléotide doit être capable de traverser les membranes cellulaires pour atteindre son site d'action.** Malgré leur grosseur et leur charge, les oligonucléotides antisens pénètrent assez bien dans les cellules. Les oligomères peuvent prendre de quinze minutes jusqu'à quelques heures pour entrer dans les cellules dépendamment du type cellulaire et des conditions expérimentales. Il a été démontré que ce processus est énergie-dépendante et que ce transport actif se ferait par endocytose grâce à des protéines membranaires de 34 et 80 kDa (13, 14). Par contre, quelques techniques ont été développées afin de faciliter leur entrée. Une de celles-ci est l'utilisation de liposomes, ces particules qui forment des bicouches lipidiques. Les oligonucléotides sont encapsulés dans les liposomes et traversent la membrane plasmique par endocytose.

1.4. STRUCTURES DES OLIGONUCLÉOTIDES ANTISENS

1.4.1. Les phosphorothioates

Les oligonucléotides comportant des liens phosphodiesters forment des duplexes stables avec leur brin complémentaire d'ARNm. Par contre, leur sensibilité aux nucléases ne fait pas d'eux des candidats idéaux, leur temps de demi-vie étant trop court pour qu'ils puissent agir adéquatement (12). C'est pourquoi les ADN antisens doivent subir certaines modifications pour acquérir une résistance aux nucléases. Les phosphorothioates, caractérisés par la substitution d'un des atomes d'oxygène du groupement phosphate de l'ADN par un atome de soufre, résistent aux exo- et aux endonucléases sans trop changer les propriétés de l'oligonucléotide (Figure 3) (12, 15). Leur capacité à activer la RNase H et leur facilité à pénétrer dans les cellules rendent les antisens phosphorothioates biologiquement actifs, malgré leur affinité de liaison légèrement réduite avec l'ARNm complémentaire (16, 17). Ces caractéristiques font d'eux les molécules d'ADN antisens les plus utilisées à ce jour. Par exemple, le premier antisens phosphorothioate vient d'être admis sur le marché pour le traitement du «cytomegalovirus retinitis» chez les patients atteints du VIH (18).

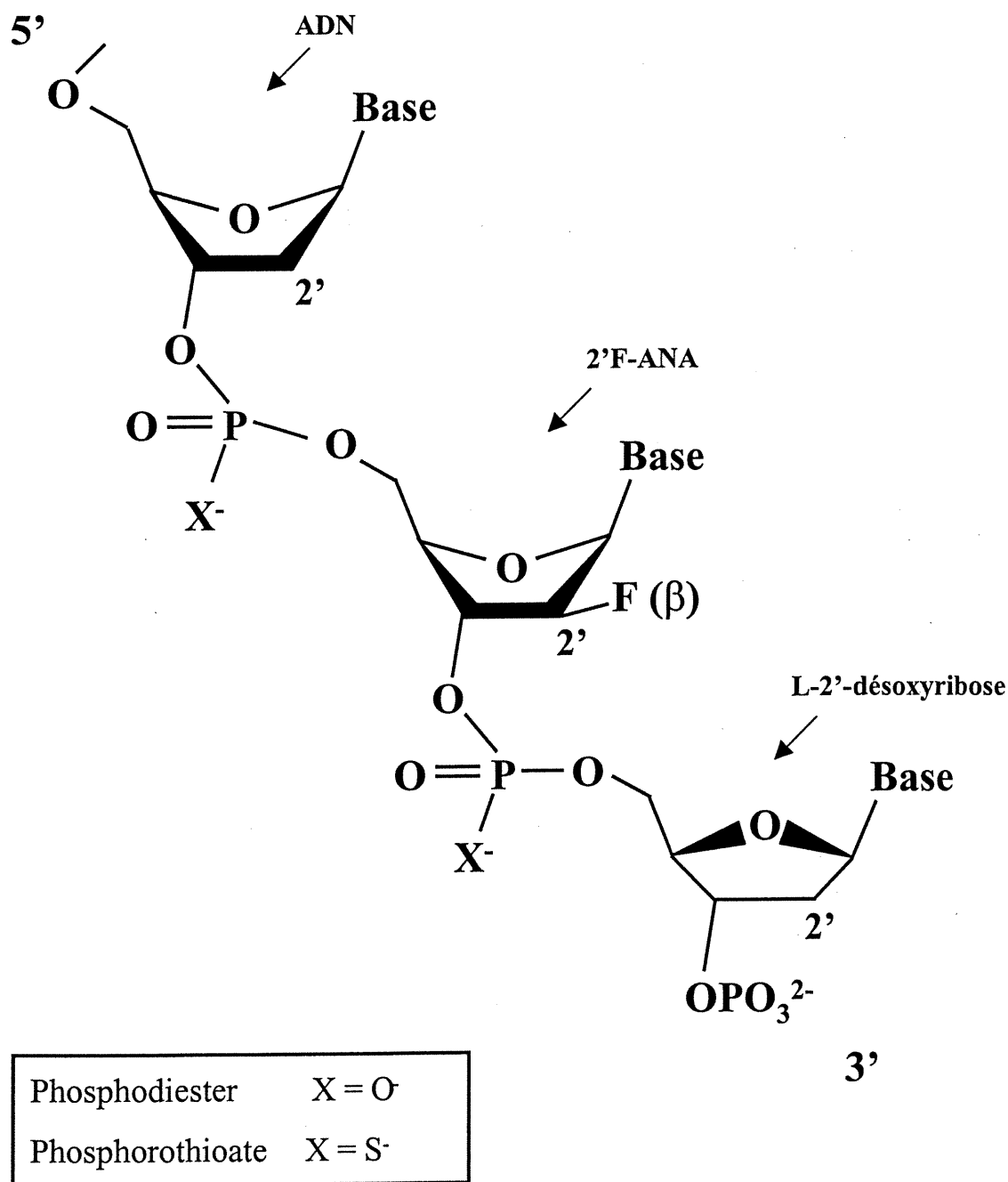


Figure 3: Structure d'un oligonucléotide antisense chimérique composé de résidus S-2'F-ANA et d'ADN. La substitution d'un atome d'oxygène du groupement phosphate (lien phosphodiester) par un atome de soufre (lien phosphorothioate) leur confère une plus grande résistance aux nucléases. L'augmentation de l'affinité de liaison de l'oligonucléotide avec l'ARNm complémentaire se caractérise par l'inversion de configuration en position C2' du sucre et par la substitution du groupement hydroxyl par un atome du fluor (2'F-ANA). Ces fragments antisense possèdent un sucre en conformation L à leur extrémité 3' pour une résistance aux exonucléases 3'.

1.4.2. La L-désoxycytosine

D'autres modifications ont été incorporées à la structure des oligonucléotides antisens afin d'accroître leur résistance aux nucléases. Par exemple, il a été démontré que les oligodésoxynucléotides possédant une cytosine sur un ribose en conformation L à leur position terminale ou interne sont des molécules résistantes à l'action des exonucléases 3' (19). Malgré ce changement de conformation, ces molécules peuvent toujours former des hétérodimères avec l'ARN complémentaire et permettre aussi l'activation de la RNase H.

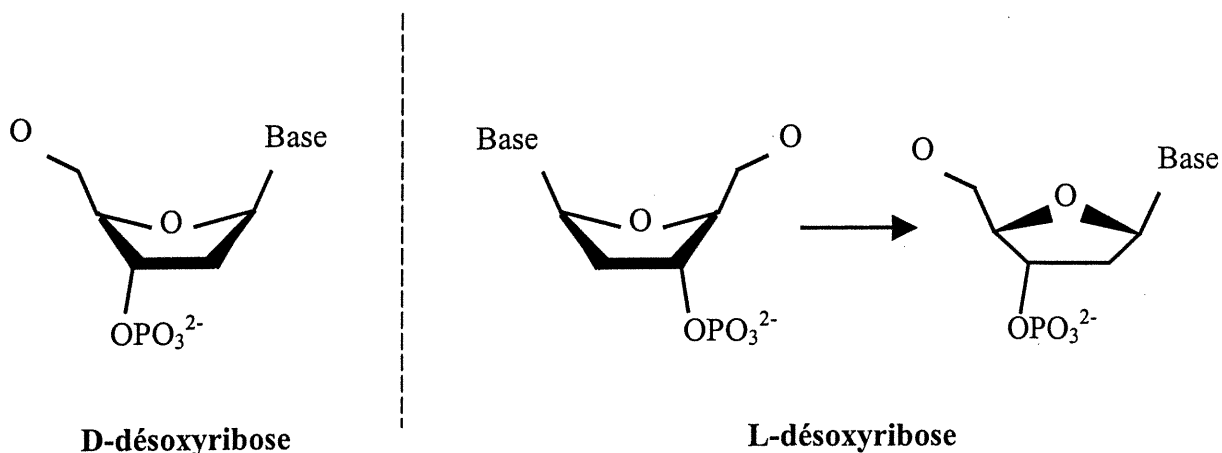


Figure 4: Structure d'un désoxyribose en conformation D et L. Interconversion de la conformation D et L du ribose, ainsi qu'un réarrangement de la forme L.

1.4.3. Les modifications en position 2' du sucre

Le défi des chimistes est maintenant de développer des oligonucléotides antisens possédant une meilleure affinité de liaison pour leur séquence complémentaire sur l'ARNm. Les nouvelles générations d'antisens doivent aussi être capables de résister aux nucléases et d'activer la RNase H. Récemment, il a été démontré que la position

2' du sucre des oligonucléotides est un élément déterminant de l'affinité de liaison entre l'oligonucléotide antisens et l'ARNm ciblé. En effet, l'incorporation d'un groupement méthyl en position 2' du sucre d'un oligonucléotide lui confère une meilleure affinité de liaison envers l'ARNm cible (20) ainsi qu'une résistance aux nucléases comparativement à l'ADN non modifié. Par contre, ces oligonucléotides modifiés ne permettent pas d'activer la RNase H, ce qui limite grandement leur utilisation comme antisens (21).

Une inversion de configuration en position C2' du sucre d'un oligonucléotide, c'est-à-dire la conversion d'un ribose en arabinose, rend le duplexe ADN / ARN moins stable (22). Cette nouvelle structure appelée acide arabinonucléique (ANA), possède un groupement hydroxyl en position *cis* qui peut amener des changements dans la conformation du lien N-glycosidique qui relie la base au sucre. Ce changement de conformation amènerait une déformation des paires de bases, et ultimement une diminution de la stabilité de la double hélice. Ce problème pourrait être résolu par le remplacement du groupement hydroxyl par de plus petits groupements. En effet, la substitution du groupement hydroxyl par un atome de fluor en position C2' de l'arabinose (2'F-ANA, Figure 4) provoque une augmentation de la stabilité du complexe formé avec l'ARN de manière plus efficace que les fragments ANA ou même que l'ADN non modifié (23). Des études ont démontré la présence de molécules d'eau dans le sillon mineur d'une double hélice d'acide nucléique, et l'atome de fluor qui est petit et électronégatif stabiliserait ces molécules par des ponts hydrogènes (24, 25). De plus, les oligonucléotides 2'F-ANA offre une meilleure

résistance à la phosphodiesterase de venin de serpent comparativement à l'ADN non modifié (26).

Les oligonucléotides 2'F-ANA possèdent des qualités leur conférant un grand potentiel. Par contre, les oligonucléotides phosphorothioates pénètrent bien dans les cellules et résistent adéquatement aux nucléases. Ceci a donc mené à la synthèse d'oligonucléotides de type 2'F-ANA caractérisés par la substitution d'un des oxygènes de leur groupement phosphate par un atome de soufre (S-2'F-ANA, Figure 4). Ces nouveaux oligonucléotides forment un hybride stable avec l'ARN et sont résistants aux nucléases de façon plus efficace que l'ADN non modifié (23, 26).

1.4.4. Les oligonucléotides chimériques

L'activation de la RNase H par le complexe formé par l'oligonucléotide antisens et son ARN complémentaire est primordiale au succès de la thérapie génique par antisens. Ce phénomène requiert un minimum de quatre à cinq résidus d'ADN au centre de la séquence de l'oligonucléotide (21, 27). Voilà les raisons qui ont motivé le développement d'oligonucléotides antisens possédant des structures mixtes. En effet, des oligonucléotides phosphorothioates chimériques composés de 2'-désoxy-2'-fluoro- β -D-arabinose et de 2'-désoxyribose ont été synthétisés (chimères S-2'F-ANA / ADN, Figure 4). Ces molécules sont capables d'inhiber spécifiquement l'expression protéique et de l'ARNm de gènes plus efficacement que les oligonucléotides possédant uniquement des résidus 2'F-ANA (28). De plus, les chimères permettent également d'activer la RNase H (28).

1.5. APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES

Il existe plusieurs applications à l'utilisation des oligonucléotides antisens. Premièrement, ceux-ci peuvent être utilisés comme instrument en biologie cellulaire et moléculaire afin de déterminer le rôle de certains gènes. Les oligonucléotides ont déjà été utilisés pour mieux connaître certains gènes impliqués dans le cycle cellulaire et le développement cellulaire ou embryonnaire. Certains oncogènes ont déjà été caractérisés (29-31) et les oligonucléotides antisens représentent un bon outil pour contrer le cancer. Par contre, l'avancement le plus important concernant la thérapie par antisens se situe au niveau des virus. En effet, il a été possible d'inhiber la croissance de plusieurs virus comme celui de l'herpès (32, 33) et de l'influenza (34) en culture cellulaire, de même qu'*in vivo* chez des souris ayant des infections virales (5). Par contre, les oligonucléotides phosphorothioates à très fortes doses peuvent provoquer des effets toxiques en induisant des réponses immunologiques (35). Il a été démontré chez des souris que le traitement avec des oligomères phosphorothioates (10 mg / kg) induit la prolifération des cellules B (36), la production de cytokines et d'anticorps ainsi que l'expansion des organes lymphoïdes (37-40). De plus, une concentration trop élevée d'oligonucléotides peut activer la cascade du complément (41-43) ou inhiber celle de la coagulation (44-45), possiblement à cause de leur liaison à certains facteurs dans le plasma. Les antisens sont aussi susceptibles de s'accumuler dans le foie, ce qui cause une hypertrophie des cellules de Kupffer chez les rongeurs de même qu'une nécrose des cellules hépatocytaires.

1.6. BUT DE L'ÉTUDE

Des études récentes dans notre laboratoire ont démontré que des oligonucléotides d'ADN phosphorothioates inhibent l'expression protéique du récepteur Flk-1 du «vascular endothelial factor» (VEGF) ainsi que les effets biologiques du VEGF via l'activation de ce récepteur (46). En se basant sur le potentiel connu des antisens phosphorothioates, nous avons tenté de démontrer que des oligonucléotides antisens composés de résidus thio-2'F-ANA comportant des ADN phosphorothioates au centre ainsi qu'un sucre en conformation L à sa position 3' pouvaient être actifs biologiquement. Pour ce faire, des cellules endothéliales d'aortes bovines ont été traitées avec les oligonucléotides chimériques et phosphorothioates. Ensuite, par un immunobuvardage de type Western, nous avons déterminé leurs effets sur la synthèse protéique et la phosphorylation du récepteur Flk-1. Nous avons aussi observé les effets de ces oligonucléotides antisens sur les activités biologiques du VEGF, soit la prolifération, la migration et la synthèse de PAF chez les cellules endothéliales. Finalement, nous avons déterminé si les antisens chimériques résistent aux nucléases et s'ils forment des hybrides stables avec l'ARNm de même que la capacité de ces hétérodimères à activer la RNase H.

2.0. ARTICLE

**ANTISENSE INHIBITION OF Flk-1, A RECEPTOR FOR THE
VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF), BY
OLIGONUCLEOTIDES COMPRISED OF 2'-DEOXY-2'-
FLUORO- β -D-ARABINO AND 2'-DEOXYNUCLEOSIDES**

**Julie Lacombe¹, Ekaterina Viazovkina², Pascal N. Bernatchez¹,
Annie Galarneau², Masad J. Damha² and Martin G. Sirois^{1*}.**

¹Research Center, Montreal Heart Institute, and Department of Pharmacology,
University of Montreal, Montreal (Qc), Canada.

²Department of Chemistry, Otto Maass Chemistry Building, McGill University,
Montreal (Qc), Canada.

Running Title: Antisense activity of S-2'F-ANA / DNA chimeras

*Correspondence should be addressed to:

Martin G. Sirois, Ph. D.

Montreal Heart Institute

5000 Belanger Street

Montreal (Qc), Canada, H1T 1C8

Phone: (514) 376-3330 (ext: 3583)

FAX: (514) 376-1355

E-mail: mgsirois@icm.umontreal.ca

2.1. ABSTRACT

The design of new antisense oligomers with improved binding affinity for targeted RNA, while still activating ribonuclease (RNase) H is a major research area in medicinal chemistry. RNase H recognizes the RNA / DNA duplex and cleaves the complementary mRNA strand, providing the main mechanism by which antisense oligomers elicit their activities.

It has been shown that configuration inversion at C2'-position of the DNA sugar moiety (arabinonucleic acid; ANA), combined to the substitution of 2'OH group by a fluorine atom (2'-F-ANA) increases the oligomers binding affinity for targeted RNA. In the present study, we evaluated the antisense activity of mixed-backbone phosphorothioate oligomers composed of 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinose and 2'-deoxyribose sugars (S-2'-F-ANA / DNA chimeras). We determined their abilities to inhibit the protein expression and phosphorylation of Flk-1, a vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor and VEGF biological effects on endothelial cell proliferation, migration and platelet-activating factor synthesis. Treatment of endothelial cells with chimeric oligonucleotides reduced Flk-1 protein expression and phosphorylation more efficiently than with phosphorothioate antisenses (S-DNA). Nonetheless, these two classes of antisenses inhibited VEGF activities equally. Herein, we also demonstrated the capacity of the chimeric oligomers to elicit RNase H activity and their improved binding affinity for complementary RNA as compared to S-DNA.

Keywords: antisense DNA, 2'-F-ANA, mixed-backbone antisense, Flk-1, VEGF

2.2. RÉSUMÉ

Le développement de nouveaux antisens oligodésoxyribonucléotides représente un défi en chimie médicinale. Nous cherchons à développer des molécules dont l'affinité de liaison pour l'ARN serait plus élevée en gardant la capacité d'activer la RNase H, l'enzyme qui reconnaît le complexe ADN / ARN et qui dégrade l'ARNm.

Il a été démontré qu'une inversion de configuration en position C2' du ribose de l'ADN (acide arabinucléique; ANA), combinée à la substitution du groupement 2'OH par un atome de fluor (2'F-ANA) augmente l'affinité de liaison de l'oligonucléotide à l'ARNm. Nous avons évalué l'activité antisens d'oligonucléotides phosphorothioates chimériques composés de 2'-désoxy-2'-fluoro- β -D-arabinose et de 2'-désoxyribose (chimère S-2'F-ANA / ADN). Nous avons déterminé la capacité de ces molécules à inhiber l'expression et la phosphorylation de Flk-1, un récepteur du «vascular endothelial growth factor» (VEGF) ainsi que les effets médiés par le VEGF, soit la prolifération, la migration et la synthèse du «platelet-activating factor» (PAF) au niveau de cellules endothéliales. Le traitement de cellules endothéliales avec les chimères S-2'F-ANA / ADN a permis de réduire l'expression protéique ainsi que la phosphorylation de Flk-1 plus efficacement qu'un traitement avec les antisens d'ADN phosphorothioates (S-DNA). Toutefois, ces deux classes d'antisens ont inhibé de façons similaires les effets biologiques du VEGF. Cette étude démontre aussi la capacité des antisens chimériques à activer la RNase H et leur meilleure affinité de liaison envers l'ARN comparativement aux antisens S-DNA.

Mots clés: ADN antisens, 2'F-ANA, antisens chimériques, VEGF, Flk-1

2.3. INTRODUCTION

Unlike classical pharmacology which may require the synthesis of several thousand new compounds to discover each new active drug, antisense oligonucleotide technology enables accurate synthesis of oligomers specific for a given sequence of a targeted gene, in such, we can prevent the protein expression of this gene.

Synthetic antisense DNA and RNA oligonucleotides are negatively charged with a molecular weight of about 4-9 kD; consequently, their passage across cell membranes evokes an endocytosis process which seems to be mediated by two surface proteins of 34 and 80 kD (Loke et al. 1989; Yakubov et al. 1989). Internalized oligonucleotides are distributed in both the cytoplasm and the nucleus, and cluster around the nuclear membrane and the nucleolus (Verspieren et al. 1978). The sense strand of native mRNA can be hybridized with synthetic complementary (antisense) DNA or RNA fragments. The DNA oligonucleotide hybridizes with its selective mRNA sequence at the ribosomal and intranuclear level, and prevents the mRNA processing and its translation into protein. An advantage of using DNA oligonucleotides is the specific recognition of the DNA / mRNA hybrid by the nuclease RNase H. This enzyme degrades the RNA strand at the duplex site and increases the inhibition of mRNA translation (Wagner and Nishikura 1988). Single-stranded RNA and DNA oligomers are, however, extremely sensitive to the ubiquitous exo- and endonucleases and cannot be used unless the oligomer is inserted in a vector system with a very strong eukaryotic promoter to drive transcription and

produce antisense RNA. DNA and RNA oligonucleotides have a half-life (<2-3 hrs) too short to be clinically effective.

During the past twenty years, numerous chemical modifications of oligonucleotides have been developed to improve their hybridization affinity, stability against nucleases, and intracellular incorporation. One of these modifications is the substitution of one of the non-bridging oxygen bound to phosphorus (phosphodiester link) by a sulfur atom to create a phosphorothioate link (S-DNA, Fig. 1A). In fact, S-DNA is among the most widely used antisense inhibitors. It exhibits desirable properties such as enhanced nuclease resistance (up to 50 fold), improved bioavailability and the ability to induce RNase H mediated degradation of target RNA (Markus-Sekura et al. 1987; Cazenave et al. 1989; Bennett and Schwartz 1995). Development of antisense oligomers with 2'-modifications of the sugar moiety are of major interest, as it is the case for 2'-*O*-alkyl RNA which is known to have a greater binding affinity for complementary RNA compared to S-DNA, native DNA and RNA (Manoharan 1999; Kawasaki et al. 1993). Nonetheless, these compounds do not activate RNase H (Inoue et al. 1987).

Recently, it has been demonstrated that arabinonucleic acid (ANA) as well as the corresponding 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleic acid analogue (2'F-ANA) can form a hybrid complex with RNA and are able to elicit RNase H activity (Damha et al. 1998; Wilds and Damha 2000; Noronha et al. 2000). More recently, one of our laboratories showed that chimeric antisense oligonucleotides (AONs) comprising 2'F-ANA flanking a DNA core also induced efficient RNase H cleavage of target

RNA in vitro (Lok et al. 2002). Unlike chimeric AON comprised of 2'-O-alkyl RNA-DNA-2'-O-alkyl RNA, the efficiency of RNase H cleavage of target RNA induced by chimeric 2'-F-ANA-DNA-2'-F-ANA AON was not limited by the size of the DNA core. In fact, introduction of a single DNA residue into an otherwise all 2'-FANA oligonucleotide provided a significant increase in antisense activity compared to AON comprised of 2'-F-ANA alone. In addition, Sirois and co-workers demonstrated antisense inhibition of Flk-1, a receptor of the vascular endothelial growth factor (VEGF) by treating endothelial cells with S-DNA (Bernatchez et al. 1999).

In the present study, we evaluated the ability of S-2'-F-ANA / DNA chimeras at preventing Flk-1 protein expression, and VEGF-mediated biological activities in endothelial cells. The nucleotide at the 3'-terminus of these oligomers is a 2'-deoxynucleotide in the unnatural L-configuration which augment nuclease resistance towards 3'-exonuclease activity (Damha et al. 1994).

2.4. MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were isolated from freshly harvested aorta and cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; GIBCO, Burlington, ON) containing 5% fetal bovine serum (FBS; Hyclone Laboratories, Logan, UT) and 1% antibiotics (Sigma, Oakville, ON). BAEC were characterized by their morphology and by diiodoindocarbocyanide-acetylated low-density lipoprotein uptake (Sirois and Edelman 1997). Cells were not passaged for more than 9 cycles.

Antisense Oligonucleotide Synthesis

To compare the efficiency of S-2'F-ANA / DNA versus S-DNA oligomers, BAEC were treated with antisense oligonucleotide sequences complementary to bovine Flk-1 mRNA. Three different S-DNA sequences were used, two targeting the bovine Flk-1 mRNA (antisense 1, S-DNA-1 and antisense 2, S-DNA-2), and a scrambled phosphorothioate sequence was used as negative control (scrambled-1, S-DNA-SCR1). Three different S-2'F-ANA / DNA oligomers were used, two targeting the bovine Flk-1 mRNA (antisense 1, S-2'F-ANA / DNA-Lg-1 and antisense 2, S-2'F-ANA / DNA-Lg-2), and a scrambled S-2'F-ANA / DNA sequence was used as negative control (scrambled 1, S-2'F-ANA / DNA-Lg-SCR1). One S-DNA with a L-2'-deoxynucleotide at its 3'-end was also used to target the bovine Flk-1 mRNA (antisense 2, S-DNA-Lg-2). Phosphorothioate and S-2'F-ANA / DNA chimeras

sequences were designed with no more than three consecutive guanines and by minimizing their capacity to form hairpins and dimers.

Thermal denaturation studies

We determined the relative binding affinity of S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers to their complementary RNA, by determining the melting temperature (T_m) of the antisense oligomer / RNA duplex. UV thermal denaturation data were obtained on a Varian Cary1 UV-VIS spectrophotometer as previously described (Noronha et al. 2000; Puglisi and Tinoco 1989; Li et al. 1991). Experiments were performed with 2.3 μ M of duplex in thermal denaturation buffer containing 140 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 5 mM Na₂HPO₄ at pH 7.2. Melting temperatures were determined as the maximum point on the first derivative vs temperature (T) curves.

***In Vitro* hRNase H2 Assays**

Substrates for RNase H II were prepared by mixing antisense oligomers (3 pmoles) with ³²P labeled complementary target RNA (0.2 pmoles) in an annealing buffer containing 500 mM NaCl and 100 mM Tris-HCl for a 6 μ L final volume. RNA strands were prepared chemically using the solid-phase methodology (Damha and Ogilvie 1993). Human RNase H II gene fragment from pcDNA / GS / hrnh (Invitrogen, Burlington, ON) was cloned in the bacterial expression vector pBAD / His / hrnh (Invitrogen), expressed in *E. coli* and purified using a Ni²⁺-nitrilotriacetate-agarose column. This mixture is then heated at 85°C and cooled

down to room temperature to allow duplex formation. To this whole solution, hRNase H II is added as well as a reaction buffer containing 250 mM Tris-HCl, 300 mM KCl and 10 mM MgCl₂. This solution is incubated at 37°C for 10 or 20 minutes, and the reaction is stopped with 6 µL of loading dye. Reaction products were denaturated by heating at 100°C for 5 minutes, separated by polyacrylamide gel electrophoresis containing urea and visualized by autoradiography.

Western Blot Analysis of Flk-1 Protein Expression and Phosphorylation

Chimeric S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers efficiency and specificity to block the targeted protein expression and phosphorylation was evaluated by Western blot analyses. Confluent BAEC (100-mm tissue culture plate) were washed with DMEM and treated with trypsin-EDTA (GIBCO). Cells were resuspended in DMEM containing 5% FBS and antibiotics, centrifuged and resuspended in DMEM. Cells were seeded at 1×10^6 cells / 100-mm tissue culture plates, starved for 6h in DMEM and stimulated for 24 h in DMEM, 5% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers. Then, the cells were starved for 48h in DMEM, 0.25% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers daily for G₀ synchronization and grown to confluence for 16h in DMEM, 1% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers. Cells were starved for 8h in DMEM, 0.25% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers to induce an up-regulation of Flk-1 expression. Cells were then rinsed with Hank's balanced salt solution (HBSS)-HEPES (10 mM, pH 7.4), incubated on ice in HBSS-HEPES (10 mM, pH 7.4) plus bovine serum

albumin (BSA; 1 mg/mL), CaCl_2 (1.4 mg/mL) and VEGF (10^{-9} M; PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) for 30 min, incubated at 37°C for 7 min and then brought back on ice. Cells were rinsed with HBSS-HEPES (10 mM, pH 7.4) plus NaVO_3 (1mM; Sigma) and proteins were extracted by the addition of 500 μL of lysis buffer containing phenylmethylsulfonyl fluoride (1mM; Sigma), leupeptin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma), aprotinin (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma) and NaVO_3 (1mM). Plates were incubated for 30 min at 4°C and scraped, and the protein concentration was determined with a Bio-Rad protein assay kit. Immunoprecipitation was performed on 1 mg of total protein for each sample by incubation with rabbit Flk-1 IgG polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) at 4°C for 4h. Then protein G-Sepharose 4 Fast Flow beads (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Qc) were added overnight. After washing three times with lysis buffer, the immunoprecipitates were dissolved in Laemmli's buffer, boiled for 5 minutes in reducing conditions, separated by a 6% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Mini-Protean II kit; Bio-Rad, Mississauga, ON), and transblotted on a 0.45- μm polyvinylidene difluoride membrane (Millipore Corp., Bedford, MA). Membranes were blocked in TBS containing 0.1% Tween (0.1% TTBS) and 3% BSA for 1h at room temperature with gentle agitation and incubated for 4h with the primary antisera (anti-Flk-1; 1:1000 dilution; Santa Cruz). Membranes were washed three times for 10 min with 0.1% TTBS, incubated with an horseradish peroxidase anti-rabbit IgG antibody (1:4000 dilution; Santa Cruz) for 30 min, washed three times with 0.1% TTBS and horseradish peroxidase bound to secondary antibody was revealed by chemiluminescence (Renaissance kit, NEN Life

Science Products, Guelph, ON). The membranes used for Flk-1 protein expression analysis were also used for Flk-1 phosphorylation analysis. Antibodies detecting Flk-1 protein expression were removed by treating the membranes with Re-Blot Plus Strong stripping solution (Chemicon International, Temecula, CA) during 20 min, then the membranes were rinsed three times for 10 min with 0.1% TTBS. The same detection procedure was followed, except that the primary antisera was a mouse anti-phosphotyrosine clone 4G10 (1:3000 dilution; Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY), and the secondary antisera was a horseradish peroxidase anti-mouse IgG antibody (1:4000 dilution; Santa Cruz). Kaleidoscope molecular weights (Bio-Rad) were used as standard for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Digital image densitometry (PDI Bioscience) was performed on x-ray films to determine relative percentage of Flk-1 protein expression and phosphorylation.

Mitogenic Assays

Confluent BAEC were washed with DMEM and trypsinized. Cells were resuspended in 10 mL of DMEM, 5% FBS, and antibiotics, and a cell count was obtained with a Coulter counter Z1 (Coulter Electronics, Luton, UK). BAEC were seeded at 1×10^4 cells / well of 24-well tissue culture plates, starved for 6 h in DMEM with or without antisense oligomers, stimulated for 24h in DMEM, 5% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers, and starved for 48h in DMEM, 0.25% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers added daily for G_0 synchronization. The cells were stimulated for 72h in DMEM, 1% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers with VEGF (2.5×10^{-10} M). The cells

were then trypsinized, and cell number was determined by using a Coulter counter Z1.

Chemotaxis Assays

Cell migration was evaluated using a modified Boyden 48-well microchamber kit (NeuroProbe, Cabin John, MD). Confluent BAEC (100-mm tissue culture plate) were washed with DMEM and trypsinized. Cells were resuspended in DMEM, 5% FBS, and antibiotics, and a cell count was obtained. BAEC were seeded at 1×10^6 cells / 100 mm tissue culture dish; starved for 6h in DMEM with or without antisense oligomers; stimulated for 24h in DMEM, 5% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers; starved for 48h in DMEM, 0.25% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers daily for G_0 synchronization; and stimulated 16h in DMEM, 1% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers. Cells were harvested by trypsinization and resuspended in DMEM, 1% FBS at a concentration of 1×10^6 cells / mL. Fifty (50) μ L of this solution with or without antisense oligomers was added to the upper chamber of the modified Boyden chamber apparatus, and the lower chamber was filled with DMEM, 1% FBS plus VEGF (10^{-9} M). The two sections of the system were separated by a porous polycarbonate filter (5- μ m pores), pretreated with a gelatin solution (1.5 mg/mL), and assembled. Six hours post incubation at 37 °C, the nonmigrated cells were scraped with a plastic policeman, and the migrated cell were stained using Quick-Diff solutions. The filter was then

mounted on a glass slide, and migrated cells were counted using a microscope adapted to a video camera to obtain a computer-digitized image.

Measurement of PAF synthesis

PAF production by BAEC was measured by incorporation of [³H] acetate into lyso-PAF. Confluent BAEC (100-mm tissue culture plate) were washed with DMEM and trypsinized. Cells were resuspended in DMEM, 5% FBS, and antibiotics, and a cell count was obtained. Cells were seeded at 5×10^5 cells/well of a six-well tissue culture plates; starved for 6h in DMEM with or without antisense oligomers; stimulated for 24h in DMEM, 5% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers; and starved for 48h in DMEM, 0.25% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers for G₀ synchronization. The cells were then grown to confluence for 16h in DMEM, 1% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers and starved for 8h in DMEM, 0.25% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers to induce an up-regulation of Flk-1 protein expression. Culture medium was removed, and cells were rinsed with HBSS-HEPES (10 mM, pH 7.4). Cells were then stimulated stimulates for 15 minutes in 1 mL of HBSS-HEPES (10 mM, pH 7.4) plus CaCl₂ (10mM) plus [³H]acetate (25 μCi) plus VEGF (10⁻⁹ M). The reaction was stopped by the addition of acidified methanol (50 mM acetic acid), and the wells were scraped and added to a chloroform (2.5 mL) and 0.1M sodium acetate (1 mL) mixture. Culture plates were washed twice with 1 mL of methanol, added to the chloroform mixture, and centrifuged for 2 min at 1700 rpm. The upper phase was

discarded, and the chloroform phase was washed twice with 2 mL of the organic phase of an HBSS-HEPES (10 mM) / methanol / chloroform / sodium acetate (0.1 M) solution (1:2:5:3:75:1). Isolated lipids were evaporated under a stream of N₂ gas, resuspended in 175 µL of mobile phase solvent (water/chloroform/methanol, 5:40:55), and purified by HPLC. Samples were injected into a silica-based normal phase HPLC column (4.5 x 250 mm, 5-µm silica particle size; Varian, Harbor City, CA) and eluted with the mobile phase solvent at a 0.5 mL / min flow rate. Fractions were collected every min, and the amount of [³H] PAF synthesized was quantified by counting radioactivity with a β-counter. The authenticity of synthesized [³H]PAF was confirmed by an HPLC elution pattern similar to standard [³H]PAF (NEN Life Sciences Products) and by its ability to induce platelet aggregation similar to standard PAF (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) (Sirois et Edelman 1997).

Statistical Analysis

Data are mean ± S.E. Statistical comparisons were made by analysis of variance followed by a Bonferonni's t-test. Data were considered significantly different if values of $p < 0.05$ were observed.

2.5. RESULTS

Physical properties of antisense S-2'F-ANA / DNA oligomers

We also evaluated three physicochemical properties of the different antisense oligomers, namely their affinity towards complementary RNA (T_m), their ability to activate RNase H and their resistance to hydrolysis by nucleases.

We previously showed that 2'F-ANA / RNA hybrids are significantly more stable than the corresponding DNA / RNA heteroduplex (Wilds and Damha 2000). We now find that the S-2'F-ANA / DNA oligonucleotides under study also form very stable duplexes with target RNA (Table 1), and that the melting temperature for these chimeras directly correlates with the 2'F-ANA content.

We next determined the ability of the duplex formed by the different antisense oligomers and their complementary RNA strand to activate RNase H. We observed very few degradation products for control oligomer that was not incubated with hRNase H2 (Fig.2). The data also shows that S-2'F-ANA / DNA chimeras (S-2'F-ANA / DNA-Lg-1) is able to elicit RNase H activity since we observed more degradation products as compared to control oligomers, and this activation is time-dependant (Fig. 2). We observed the same phenomenon in the case of S-DNA, but DNA activates RNase H more efficiently.

Finally, we looked at the nuclease stability of the different oligonucleotides under various conditions. We observed that S-DNA as well as S-2'F-ANA / DNA chimeras oligomers were stable when incubated with BAEC in cell culture medium at

37°C for 6h (DMEM, 5% FBS). Antisense oligomers were also incubated at 37°C for 6h with proteins isolated from BAEC and we did not observed any degradation products (data not shown). The nuclease activity of this cellular extract was previously demonstrated on unmodified DNA.

Regulation of Flk-1 protein expression by antisense S-2'F-ANA / DNA oligonucleotides

In a first series of biological experiments, we evaluated the potential of chimeric S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers to reduce Flk-1 protein expression by Western blot analysis. BAEC were treated with various sequences and structure of antisense oligomers at three different concentrations of oligomers (10^{-8} M, 5×10^{-8} M and 10^{-7} M).

All antisense oligomers, at a concentration of 10^{-7} M, showed a similar capacity to prevent Flk-1 protein expression. Two different sequences of phosphorothioate oligodeoxynucleotides (S-DNA-1 and S-DNA-2) reduced Flk-1 protein expression by 77% and 66% as compared to PBS-treated cells (Fig. 3A). S-2'F-ANA / DNA chimeras (S-2'F-ANA / DNA-Lg-1 and S-2'F-ANA / DNA-Lg-2) decreased Flk-1 protein expression by 82% and 83%, while S-DNA-Lg-2 reduced Flk-1 protein expression by 76% as compared to PBS-treated cells (Fig. 3A). No or minor inhibitory effects has been observed with scrambled antisense oligomers (S-DNA-SCR1 or S-2'F-ANA / DNA-Lg-SCR1) which were used as negative control.

Since we did not distinguish any difference regarding Flk-1 protein expression in BAEC treated with various sequences and structures of antisense oligomers at 10^{-7}

M, BAEC were then treated with lower concentrations (5×10^{-8} M and 10^{-8} M) to investigate a potential difference of efficiency between the different antisense oligomers. We observed a better ability with antisense S-2'F-ANA / DNA oligonucleotides at preventing Flk-1 protein expression, at a concentration of 5×10^{-8} M of oligomers applied daily as compared to S-DNA antisense oligomers. Indeed, phosphorothioate DNA antisense sequence 1 and 2 (S-DNA-1 and S-DNA-2) reduced Flk-1 protein expression by 11% and 15% as compared to PBS-treated cells (Fig. 3B). S-2'F-ANA / DNA chimeras (S-2'F-ANA / DNA-Lg-1 and S-2'F-ANA / DNA-Lg-2) were able to inhibit the expression of Flk-1 by 40% and 31% as compared to PBS-treated cells. S-DNA-Lg-2 which is a S-DNA antisense with L-deoxyguanosine at its 3'-terminus reduced Flk-1 protein expression by 42% as compared to PBS-treated cells (Fig. 3B). Only a slight decreased in Flk-1 protein expression was observed with the scrambled antisense sequences (16% and 18%).

As we observed a better inhibitory efficiency with S-2'F-ANA / DNA chimeras as compared to phosphorothioate antisense at 5×10^{-8} M, we then wanted to assess if these oligomers would still be efficient at a lower concentration (10^{-8} M). Daily treatment (10^{-8} M) with all the antisense sequences tested did not provide a down regulation of Flk-1 protein expression in BAEC (Fig. 3C). Scrambled antisense oligonucleotide sequences (S-DNA-SCR1 and S-2'F-ANA / DNA-SCR1) were also ineffective at blocking Flk-1 protein expression.

Inhibition of VEGF-induced Flk-1 phosphorylation by S-2'F-ANA / DNA mixed-backbone antisense oligonucleotides

As we observed the capacity of standard phosphorothioate DNA antisense oligomers and S-2'F-ANA / DNA chimeras at blocking Flk-1 protein expression, we then wanted to assess how it would affect the activation of Flk-1 receptor. To do so, we determined how a treatment with these various antisense oligomers did influence VEGF-induced Flk-1 activation by analyzing the phosphorylation of Flk-1 receptor. It is well-known that some receptors have the capacity to bind their ligand without activating the signalisation cascade. Those binding sites are important since they prevent cells to elicit too strong answer in presence of large numbers of ligands. To a given concentration of antisense oligomers, a reduction in the expression of a receptor does not necessarily correlates with a reduction of its phosphorylation. By looking at the phosphorylated form of Flk-1 following a treatment with antisense oligonucleotides, we ensure ourselves that the reduction of Flk-1 protein expression really cause an inhibition of its activity. The membranes used to detect Flk-1 protein expression were stripped with a Re-Blot solution and used to detect Flk-1 phosphotyrosine activation. The efficiency of the stripping solution has been validated by the absence of Flk-1 phosphorylated form in PBS-treated groups following a detection of Flk-1 expression.

First, we looked at VEGF capacity to mediate Flk-1 phosphorylation. A treatment with VEGF (10^{-9} M) for 7 minutes induced a marked phosphorylation of Flk-1 (Fig. 4A-C). Then, we looked at the effect of daily treatment (10^{-8} M, 5×10^{-8} M or 10^{-7} M) with antisense oligomers on Flk-1 activation mediated by VEGF (10^{-9} M;

7 minutes). First, at a concentration of 10^{-7} M, we observed on Figure 3A that all sequences and structures of antisense oligomers prevented Flk-1 protein expression by 66 to 83%. Now, we observed that at this concentration, S-2'F-ANA / DNA chimeras abolished completely VEGF-mediated Flk-1 phosphorylation as compared to VEGF-stimulated cells untreated with antisense oligomers (Fig. 4A). Only a slight inhibition of phosphorylation has been observed in presence of scrambled sequences (11% and 9%).

Since we observed equivalent efficiency from each antisense oligomers used at 10^{-7} M, we investigated Flk-1 phosphorylation upon a treatment with 5×10^{-8} M of antisense oligomers. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides (S-DNA-1 and S-DNA-2) did not have any effect on Flk-1 phosphorylation as compared to VEGF-tested group (Fig. 4B). S-2'F-ANA / DNA mixed-backbone oligomers (S-2'F-ANA / DNA-Lg-1 and S-2'F-ANA / DNA-Lg-2) reduced VEGF-mediated Flk-1 phosphorylation by 20% while phosphorothioate DNA antisense oligomers with L-deoxyguanosine at its 3'-terminus (S-DNA-Lg-2) reduced it by 35% as compared to VEGF-stimulated cells untreated with antisense oligomers (Fig. 4B). No effects were observed with the use of scrambled antisense sequences (S-DNA-SCR1 and S-2'F-ANA / DNA-Lg-SCR1).

Then, we assessed if S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers were still more powerful than phosphorothioate DNA oligomers to reduce VEGF-mediated Flk-1 phosphorylation, at a lower concentration (10^{-8} M). S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers (S-2'F-ANA / DNA-Lg-1 and S-2'F-ANA / DNA-Lg-2) were equivalent to S-DNA (S-DNA-Lg-2, S-DNA-1 and S-DNA-2) at inhibiting Flk-1

phosphorylation induced by VEGF (Fig. 4C). Scrambled sequences (S-DNA-SCR1 and S-2'F-ANA / DNA-Lg-SCR1) were also found to have no influence on Flk-1 phosphorylation mediated by VEGF.

Influence of chimeric S-2'F-ANA / DNA antisense oligonucleotides on biological effects mediated by VEGF on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis

Binding of VEGF to its receptor Flk-1 on endothelial cells promotes various biological activities including their proliferation, migration and the release of PAF, an inflammatory mediator (Bernatchez et al. 1999; Sirois and Edelman 1997). In the present series of experiments, we wanted to assess if the inhibition of Flk-1 protein expression and activation, as detailed above, would affect as well the VEGF-mediated biological activities.

First, we looked at the VEGF-induced endothelial cell proliferation upon the regulation of Flk-1 receptor protein expression following a treatment with three different concentrations of antisense oligomers (10^{-8} M, 5×10^{-8} M or 10^{-7} M). Stimulation of quiescent BAEC with 1% FBS for 72h induced their proliferation from $11\,920 \pm 300$ to $49\,560 \pm 1\,580$, and up to $75\,540 \pm 3\,120$ cells upon the addition of VEGF 2.5×10^{-10} M. A treatment with S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers or with S-DNA (10^{-7} M) were equally efficient as they completely blocked the VEGF-mitogenic activity (Fig. 5A).

Next, we performed a proliferation assay at a concentration of 5×10^{-8} M of antisense oligomers. Basal BAEC count went from $12\,880 \pm 340$ to $55\,580 \pm 3\,330$

(1% FBS treatment) and to $73\,060 \pm 2\,200$ cells in response to 1% FBS plus VEGF 5×10^{-10} M within three days of treatment. Phosphorothioate antisense oligomers (S-DNA-1 and S-DNA-2) reduced VEGF-induced BAEC proliferation by 66% ($p < 0.001$) and 31% ($p < 0.01$) as compared to VEGF-stimulated cells untreated with antisense oligomers (Fig. 5B). Treatment with S-2'F-ANA / DNA mixed-backbone oligomers (S-2'F-ANA / DNA-Lg-1 and S-2'F-ANA / DNA-Lg-2) reduced the BAEC proliferation upon VEGF stimulation by 55% ($p < 0.001$) and 50% ($p < 0.001$) while phosphorothioate DNA with L-deoxyguanosine at its 3'-terminus (S-DNA-Lg-2) prevented it by 67% ($p < 0.001$) as compared to VEGF-stimulated cells (Fig. 5B).

At a lower concentration (10^{-8} M) none of the antisense oligomers did reduce VEGF-mitogenic activity on BAEC (Fig. 5C). In addition, scrambled antisense sequences (S-DNA-SCR1 and S-2'F-ANA / DNA-SCR1) showed no inhibitory effect on VEGF-induced endothelial cell proliferation at all concentrations (10^{-8} M, 5×10^{-8} M or 10^{-7} M) (Fig. 5A-C).

VEGF is known to be a chemoattractant agent for endothelial cells upon the activation of Flk-1 receptor. In a previous study, we observed that maximal VEGF-chemotactic effect on BAEC was achieved at 10^{-9} M (Bernatchez et al. 1999), so we wanted to determine the influence of S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers on VEGF-induced BAEC migration. BAEC were previously stimulated for 24h in 5% FBS with or without antisense oligomers and starved for 48h with or without antisense oligomers in 0.25% FBS for G_0 synchronization. BAEC were then stimulated for 16h in 1% FBS with or without antisense oligomers before being

added to the upper chamber of the modified Boyden chamber apparatus. PBS-stimulated BAEC showed a basal migration of 416 ± 9 cells/mm² and a treatment with VEGF (10^{-9} M) for 6 h increased the BAEC migration up to 624 ± 7 cells/mm². BAEC treatment with 10^{-7} M of S-2'F-ANA / DNA oligomers or phosphorothioate DNA provided a complete inhibition of VEGF-mediated migration of BAEC (Fig. 6A).

At lower concentrations of S-2'F-ANA / DNA or phosphorothioate DNA antisense oligomers (5×10^{-8} M and 10^{-8} M) did not induce any inhibition of the chemotactic activity of VEGF on BAEC (Fig. 6B-C). Scrambled antisense sequences (S-DNA-SCR1 and S-2'F-ANA / DNA-Lg-SCR1) showed no inhibitory effect on VEGF-induced endothelial cell migration at all concentrations of (10^{-8} M, 5×10^{-8} M or 10^{-7} M) (Fig. 6A-C).

PAF is an inflammatory mediator which is known to be synthesized by BAEC upon VEGF (10^{-9} M) stimulation (Bernatchez et al. 1999; Sirois and Edelman 1997). Then, we studied the effects of S-2'F-ANA / DNA mixed-backbone oligomers or S-DNA antisense oligomers, at three different concentration (10^{-8} M, 5×10^{-8} M and 10^{-7} M) on VEGF-induced BAEC PAF synthesis. PAF production by BAEC was measured by the incorporation of [³H] acetate into lyso-PAF as detailed previously in Materials and Methods.

First, we stimulated BAEC for 24h in 5% FBS with or without antisense oligomers (10^{-7} M) and BAEC were starved for 48h in 0.25% FBS with or without antisense oligomers for G₀ synchronization. Then BAEC were grown to confluence in 1% FBS for 16h and stimulated in 0.25% FBS with or without antisense

oligomers. Treatment of BAEC with VEGF (10^{-9} M) increased up to 48-fold the basal synthesis of PAF as observed in PBS-treated cells (Fig. 7A). PAF synthesis induced by VEGF was completely blocked by all sequences and structures of antisense oligomers, at a concentration of 10^{-7} M (Fig. 6A).

Then, BAEC were treated with lower concentrations of antisense oligomers (5×10^{-8} M or 10^{-8} M). In both cases, a treatment with S-2'F-ANA / DNA oligodeoxynucleotides or with S-DNA did not reduce VEGF-mediated BAEC PAF synthesis (Fig. 7B-C). Treatment with scrambled sequences (S-DNA-SCR1 or S-2'F-ANA / DNA-Lg-SCR1) at all concentrations (10^{-8} M, 5×10^{-8} M or 10^{-7} M) did not alter the synthesis of PAF in BAEC stimulated with VEGF (Fig. 7A-C).

2.6. DISCUSSION

In order to improve efficiency of the antisense strategy, much effort has been devoted to the development of cationic lipids to enhance cellular uptake (Flanagan et al. 1996; Lewis et al. 1996), as well as novel nucleic acid backbones (Letsinger et al. 1976; Beaucage and Caruthers 1981; Ogilvie et al. 1988), particularly those that elicit RNase H activity (Inoue et al. 1987; Monia et al. 1993; Crooke et al. 1995; Lima and Crooke 1997).

In the present report, we demonstrated the biological potential of antisense S-2'F-ANA / DNA oligomers. Previous studies demonstrated that completely modified phosphorothioate 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleic acid antisense oligomers were not able to elicit RNase H cleavage of targeted RNA as efficiently as phosphorothioate DNA oligomers, and permitted only a slight inhibition of mRNA target expression (Lok et al. 2002). Mixed-backbone antisense oligomers containing S-2'F-ANA linked by phosphorothioate DNA demonstrated a better antisense activity driven by RNase H cleavage of complementary mRNA (Lok et al. 2002). Effectively, it has been demonstrated that a DNA gap (four to five residues) in the middle of the antisense sequence is required for a good cleavage of RNA by RNase H (Inoue et al. 1987; Monia et al. 1993).

In the present study, we used 2'F-ANA / DNA chimeras containing phosphorothioate linkages and a 3'-L-nucleotide, both of which confer resistance towards exonuclease hydrolysis (Damha et al. 1994). Indeed, we have also shown that unlike DNA, both S-DNA and S-2'F-ANA / DNA are quite resistant to

hydrolysis by nucleases present in cell culture media and BAEC cellular extract. It was shown that these compounds possess a higher binding affinity towards its complementary RNA as compared to S-DNA. Effectively, this enhance binding affinity is characterized by a 6-7°C T_m increase (Table 1). In comparison to S-DNA oligomers, S-2'F-ANA / DNA exhibit a greater binding affinity for target RNA. It was also observed that S-2'F-ANA / DNA chimeras downregulate the expression and phosphorylation of Flk-1 protein, and as a consequence, attenuates the biological effects of VEGF, the proliferation and migration of endothelial cells proliferation, and PAF synthesis.

The S-2'F-ANA / DNA activity was also compared to that of S-DNA (Bernatchez et al. 1999). The results show that at the oligonucleotide concentration of 5×10^{-8} M, S-2'F-ANA / DNA chimeras are more efficient at inhibiting Flk-1 protein expression and phosphorylation relative to S-DNA (Fig. 3-4B). This is consistent with the previous data indicating that S-2'F-ANA / DNA chimeras have superior RNA binding properties compared to S-DNA (Table 1). However, concerning the biological effects of VEGF mediated by Flk-1, we did not observe any inhibitory differences between the two classes of oligomers on the VEGF-induced proliferation, migration and PAF synthesis (Fig. 4-7). This may be explained by the fact that the action of S-2'F-ANA / DNA on Flk-1 protein expression and phosphorylation is not marked enough to bring differences on VEGF biological activities. Finally, we observed that S-2'F-ANA oligomers are not toxic to cells,

since we did not see any morphologic changes, necrosis or apoptosis of BAEC treated with antisense oligomers.

In conclusion, our results are validating the biological potential of S-2'F-ANA / DNA as a new class of antisense agents, and which have a better binding affinity for targeted mRNA, and the capacity to prevent selectively the protein expression of targeted genes.

2.7. ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Anagenis Inc. Mr. Bernatchez is recipient of a studentship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and Dr. Sirois was recipient of a scholarship from the Heart and Stroke Foundation of Canada, and is currently recipient of a scholarship from the CIHR.

2.8. REFERENCES

- Beaucage, S.L., and Caruthers, M.H. 1981. Deoxynucleoside phosphoramidites-A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **22**: 1859-1862.
- Bennett, M.R., and Schwartz, S.M. 1995. Antisense therapy for angioplasty restenosis. *Circulation.* **92**: 1981-1993.
- Bernatchez, P.N., Soker, S., and Sirois, M.G. 1999. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J. Biol. Chem.* **274**: 31047-31054.
- Cazenave, C., Stein, C., Loreau, N., Thuong, N., Neckers, L., Subashinghe, C., Hélène, C., Cohen, J., and Toulmé, J. 1989. Comparative inhibition of rabbit globin mRNA translation by modified antisense oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acid Res.* **17**: 4255-4273.
- Crooke, S.T., Lemonidis, K.M., Neilson, L., Griffey, R., Lesnik, E.A., and Monia, B.P. 1995. Kinetics of *Escherichia coli* RNase H1. *Biochem. J.* **312** (Pt. 2): 599-608.
- Damha, M.J., Giannaris, P.A., and Marfey, P. 1994. Antisense L/D-oligodeoxynucleotide chimeras: nuclease stability, base-pairing properties, and activity at directing ribonuclease H. *Biochemistry.* **33**: 7877-7885.
- Damha, M.J., and Ogilvie, K.K. 1993. Protocols for oligonucleotides and analogues: Synthesis and properties, *In Methods in Molecular Biology. Edited by Agrawal, S.* The Humana Press, Inc., Totowa, NJ. Vol. 20: pp. 81-114.
- Damha, M.J., Wilds, C.J., Noronha, A., Bruckner, I., Borkow, G., and Parniak, M.A. 1998. Hybrids of RNA and arabinonucleic acids (ANA and 2'F-ANA) are substrates of ribonuclease H. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 12976-12977.
- Flanagan, W.M., Kothavale, A., and Wagner, R.W. 1996. Effects of oligonucleotide length, mismatches and mRNA levels on C-5 propyne-modified antisense potency. *Nucleic Acids Res.* **24**: 2936-2941
- Inoue, H., Hayase, Y., Iwai, S., and Ohtsuka, E. 1987. Sequence-dependent hydrolysis of RNA using modified oligonucleotide splints and RNase H. *FEBS Lett.* **215**: 327-330.
- Kawasaki, A.M., Casper, M.D., Freier, S.M., Lesnick, E.A., Zounes, M.C., Cummins, L.L., Gonzalez, C., and Cook, P.D. 1993. Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro

phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets. *J. Med. Chem.* **36**: 831-841.

Letsinger, R.L., and Lunsford, W.B. 1976. Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **98**: 3655-3661.

Lewis, J.G., Lin, K.Y., Kothavale, A., Flanagan, W.M., Wattuucci, M.D., dePrince, R.B., Mook, R.A., Jr., Hendren, R.W., and Wagner, R.W. 1996 A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 3176-3181.

Li, Y., Zon, G., and Wilson, W.D. 1991. Thermodynamics of DNA duplexes with adjacent G.cntdot.A mismatches. *Biochemistry.* **30**: 7566-7572.

Lima, W.F., and Crooke, S.T. 1997. Binding affinity and specificity of *Escherichia coli* RNase H1: Impact on the kinetics of catalysis of antisense oligonucleotide-RNA hybrids. *Biochemistry.* **36**: 390-398.

Lok, C.N., Viazovkina, E., Min, K.L., Nagy, E., Wilds, C.J., Damha, M.J., and Parniak, M.A. 2002. Potent gene-specific inhibitory properties of mixed-backbone antisense oligonucleotides comprised of 2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinose and 2'-deoxyribose nucleotides. *Biochemistry.* **41**: 3457-3467.

Loke, S., Stein, C., Zhang, X., Mori, K., Nakanishi, M., Subashinge, C., Cohen, J., and Neckers, L. 1989. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 3474-3478.

Manoharan, M. 1999. 2'-carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1489**: 117-130.

Marcus-Sekura, C., Woerner, A., Shinozuka, K., Zon G., and Quinnan, G. 1987. Comparative inhibition of chloramphenicol acetyltransferase gene expression by antisense oligonucleotide analogues having alkyl phosphotriester, methylphosphonate and phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.* **15**: 5749-5763.

Monia, B.P., Lesnik, E.A., Gonzalez, C., Lima, W.F., McGee, D., Guinosso, C.J., Kawasaki, A.M., Cook, P.D., and Freier, S.M. 1993. Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J. Biol. Chem.* **268**: 14514-14522.

Noronha, A.M., Wilds, C.J., Lok, C.N., Viazovkina, K., Arion, D., Parniak, M.A., and Damha, M.J. 2000. Synthesis and biophysical properties of arabinonucleic acids (ANA): circular dichroic spectra, melting temperatures, and ribonuclease H susceptibility of ANA:RNA hybrid duplexes. *Biochemistry.* **39**: 7050-7062.

Ogilvie, K.K., Usman, N., Nicoghosian, J., and Cedergren, R.J. 1988. Total chemical synthesis of a 77-nucleotide-long RNA sequence having methionine-acceptance activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 5764-5768.

Puglisi, J.D., and Tinoco, I., Jr. 1989. Absorbance melting curves of RNA, *In Methods in Enzymology. Edited by Dahlberg, J. E. and Abelson, J. N.* Academic Press, San Diego, CA. Vol. 180: pp. 304-325.

Sirois, M.G., and Edelman, E.R. 1997. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am. J. Physiol.* **272**: H2746-H2756.

Verspieren, P., Cornelissen, A.W.C.A., Thoung, N.T., Helene C., and Toulme, J.J. 1978. An acridine-linked oligodeoxynucleotide targeted to the common 5' end of trypanosome mRNAs kills cultured parasites. *Gene.* **61**: 307-315.

Wagner, R., and Nishikura K. 1988. Cell cycle Expression of RNA duplex unwindase activity in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **8**: 770-777.

Wilds, C.J., and Damha, M.J. 2000. 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleosides and oligonucleotides (2'F-ANA): synthesis and physicochemical studies. *Nucleic Acids Res.* **28**: 3625-3635.

Yakubov, L.A., Deeva, E.A., Zarytova, V.F., Ivanova, E.M., Ryte, A.S., Yurchenko, L.V., and Vlassov, V.V. 1989. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: Involvement of specific receptors? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 6454-6458.

2.9. FOOTNOTES

The abbreviations in this manuscript: BAEC, bovine aortic endothelial cells; EC, endothelial cells; VEGF, vascular endothelial growth factor; Flk-1 (VEGF receptor); PAF, platelet activating factor; S-DNA, phosphorothioate deoxyribonucleic acid; S-2'F-ANA, phosphorothioate 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleic acid.

2.10. LEGENDS

Figure 1. Chemical structure of DNA, phosphorothioate DNA and mixed-backbone S-2'F-ANA / DNA oligomers. (A) Phosphorothioate antisense oligomers have a sulfur atom in substitution of a nonbridging oxygen atom bound to phosphorus. (B) S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers are characterized by a D-arabinose sugar, a 2'-fluorine atom in the β configuration and *cis*-positioned at specific heterocyclic bases, and phosphorothioate linkages. The nucleotide at the 3'-terminus of these oligomers is a 2'-deoxynucleotide in the unnatural L-configuration. The L-unit confers nuclease resistance to the oligonucleotide towards 3'-exonuclease activity (Damha et al. 1994).

Figure 2. RNase H II cleavage of RNA duplexed with various antisense oligomers structures. Electrophoretic analysis of ^{32}P -labeled RNA digestion products. Each antisense oligonucleotide and its complementary RNA were incubated with hRNase H II for 10 and 20 minutes at 37°C. DNA-1 represents DNA oligomer sequence 1; S-DNA-1 represents S-DNA oligomer sequence 1 and S-2'F-ANA / DNA-Lg-1 represents chimeric S-2'F-ANA / DNA-Lg oligomer sequence 1.

Figure 3. Comparative Western blot analyses of Flk-1 protein expression in BAEC pretreated with phosphorothioate or chimeric S-2'F-ANA / DNA oligomers. BAEC were treated with or without antisense oligomer sequences complementary to Flk-1 mRNA and stimulated with VEGF (10^{-9} M). Immunoprecipitation was performed overnight on 1 mg of cellular lysate. Proteins were separated by SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis and relative protein expression determined by

image densitometry. Three different concentrations of antisense oligomers were used (A) At a concentration of 10^{-7} M, S-DNA and S-2'F-ANA / DNA chimeras showed equivalent capacity to inhibit Flk-1 protein expression, S-DNA-1 and S-DNA-2 reduced it by 77% and 66% as compared to PBS-treated cells, while S-2'F-ANA / DNA-Lg-1, S-2'F-ANA / DNA-Lg-2 and S-DNA-Lg-2 reduced Flk-1 protein expression by 82%, 83% and 76%, (B) At a concentration of 5×10^{-8} M, S-DNA-1 and S-DNA-2 reduced Flk-1 protein expression by 11% and 15% as compared to PBS-treated cells, while S-2'F-ANA / DNA-Lg-1, S-2'F-ANA / DNA-Lg-2 and S-DNA-Lg-2 reduced Flk-1 protein expression by 40%, 31% and 42%, (C) At a concentration of 10^{-8} M, no inhibitory effects were observed for all antisense oligomers on Flk-1 protein expression.

Figure 4. Comparative Western blot analysis of Flk-1 activation on BAEC pretreated with phosphorothioate DNA or S-2'F-ANA / DNA oligomers. Antibodies detecting Flk-1 protein were removed from membranes by treatment with Re-Blot Plus Strong stripping solution. Activated form of Flk-1 was detected using a mouse anti-phosphotyrosine IgG antibody and relative Flk-1 phosphorylation determined by image densitometry. Three different concentrations were used (A) At a concentration of 10^{-7} M, all sequences and structures of antisense oligomers completely blocked VEGF-mediated Flk-1 phosphorylation, (B) At a concentration of 5×10^{-8} M, S-DNA-1 and S-DNA-2 did not have any effect on Flk-1 phosphorylation, while S-2'F-ANA / DNA-Lg-1, S-2'F-ANA / DNA-Lg-2 and S-DNA-Lg-2 reduced it by 20%, 20% and 35%, (C) At a concentration of 10^{-8} M, no inhibitory effects were observed for all antisense sequences and structures on VEGF-mediated Flk-1 phosphorylation.

Figure 5. Comparative effects of phosphorothioate DNA and chimeric S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers on VEGF-induced BAEC proliferation. BAEC were seeded at 10^4 cells/well on 24 well tissue culture plates and treated with or without antisense oligomer sequences complementary to Flk-1 mRNA, stimulated for 24 h in DMEM 5% FBS and starved for 48 h in DMEM 0.25% FBS. Cells were then stimulated with VEGF (2.5×10^{-10} M) during three days and counted. Three different concentrations of oligomers were used (A) 10^{-7} M (B) 5×10^{-8} M and (C) 10^{-8} M. The values are means of cell count obtained from six wells for each treatment. *** $p < 0.001$ as compared with control (DMEM, 1% FBS). ††† $p < 0.001$; †† $p < 0.01$; † $p < 0.05$ as compared with VEGF (2.5×10^{-10} M) as determined by analysis of variance followed by a Bonferonni's t-test.

Figure 6. Comparative effects of phosphorothioate DNA and chimeric S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers on VEGF-induced BAEC migration. BAEC were seeded 1×10^6 cells/100 mm tissue culture dish with or without antisense oligomer sequences complementary to Flk-1 mRNA, stimulated for 24 h in DMEM 5% FBS and starved for 48 h in DMEM 0.25% FBS. Cells were then stimulated for 16 h in DMEM 1% FBS and added to the upper chamber of the modified Boyden chamber apparatus. The lower chamber was filled with VEGF (10^{-9} M). Six hours post-incubation at 37°C the migrated cells were stained and counted. Three different concentrations of oligomers were used (A) 10^{-7} M, (B) 5×10^{-8} M and (C) 10^{-8} M. The values are means of migrating cells/ mm^2 from six chambers for each treatment. *** $p < 0.001$ as compared with control PBS. ††† $p < 0.001$; †† $p < 0.01$ as compared with control

VEGF (10^{-9} M) as determined by analysis of variance followed by a Bonferonni's t-test.

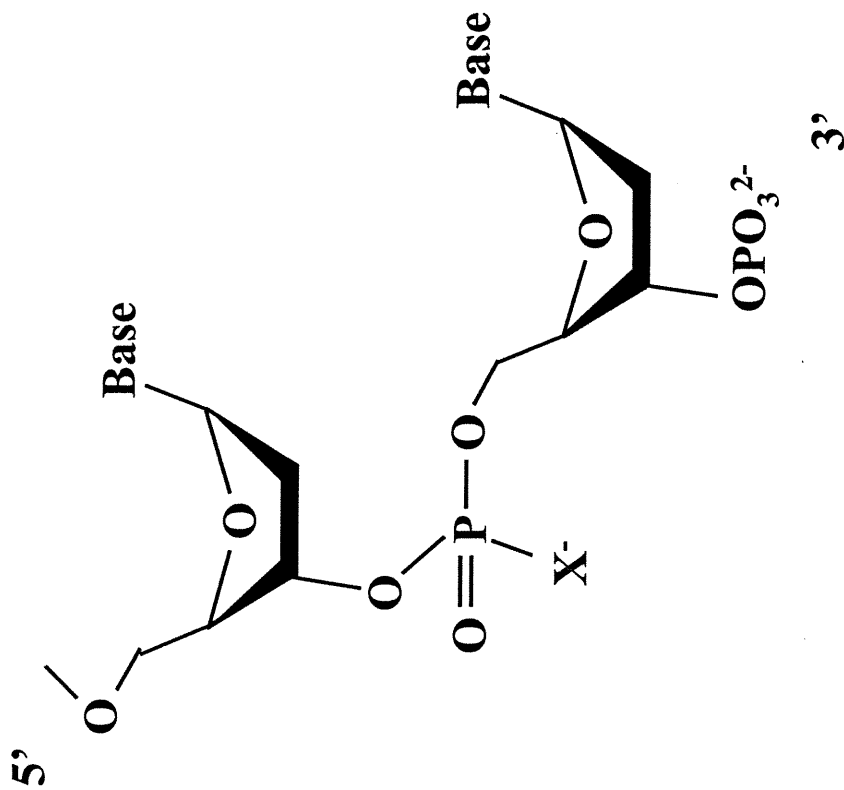
Figure 7. Comparative effects of phosphorothioate DNA and chimeric S-2'F-ANA / DNA antisense oligomers on VEGF-induced BAEC PAF synthesis. BAEC were seeded at 5×10^5 cells/well of a six-well tissue culture plates and stimulated with or without antisense oligomer sequences complementary to Flk-1 mRNA for 24 h in DMEM 5% FBS, starved for 48 h in DMEM 0.25% FBS and grown to confluence for 16 h in DMEM 1% FBS. Cells were starved for 8 h in DMEM 0.25% FBS and stimulated with VEGF (10^{-9} M) in presence of [3 H]acetate. Lipids were purified by HPLC and [3 H]PAF synthesized by BAEC was quantified by counting radioactivity with a β -counter. Three different concentrations of antisense were used (A) 10^{-7} M, (B) 5×10^{-8} M and (C) 10^{-8} M. The values are means of at least six experiments. *** $p < 0.001$ as compared with control buffer (PBS). ††† $p < 0.001$ compared with VEGF (10^{-9} M) as determined by analysis of variance followed by a Bonferonni's t-test.

Melting temperature (T_m) of hybrids formed between antisense oligonucleotides and target RNA

Code	Antisense oligonucleotide	T_m (°C)
DNA-1	gct gct ctg att gtt ggg	69
S-DNA-1	gct gct ctg att gtt ggg	61
S-2'F-ANA/DNA-Lg-1	gCT gct ctg ATT gTT gg(L-g)	67
DNA-2	cct cca ctc ttt tet cag	67
S-DNA-2	cct cca ctc ttt tet cag	58
S-2'F-ANA/DNA-Lg-2	CCT Cca ctc ttt tCT CA(L-g)	65
S-DNA-Lg-2	cct cca ctc ttt tet ca(L-g)	58

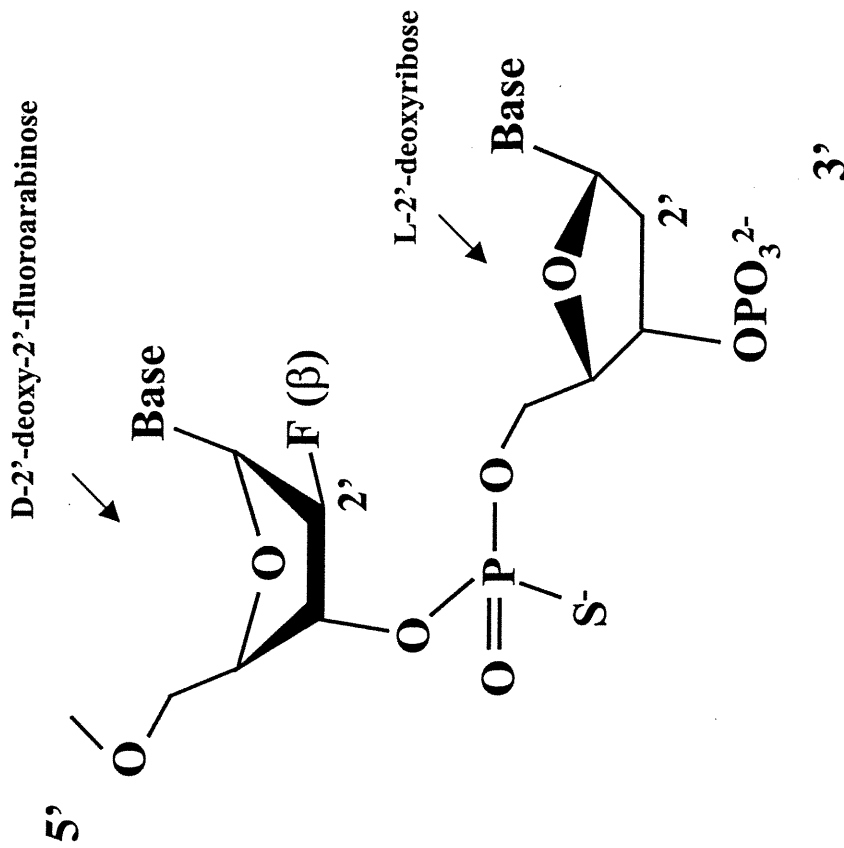
Table 1. Melting temperature (T_m) of duplexes of DNA, S-DNA and mixed-backbone S-2'F-ANA / DNA oligomers with complementary target mRNA. Abbreviations: DNA, deoxyribonucleic acid; S-DNA, phosphorothioate DNA; S-2'F-ANA, phosphorothioate 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleic acid. Uncertainty in T_m values is ± 0.5 °C.

1.A)



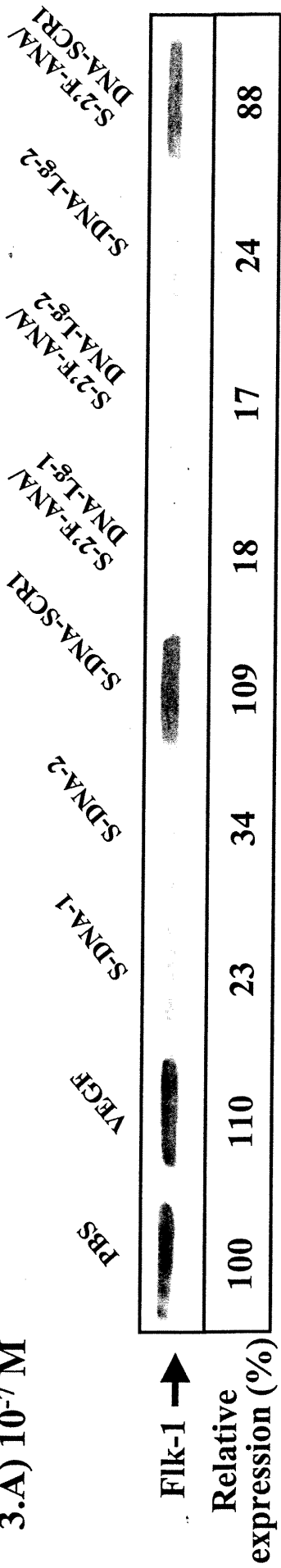
DNA, X = O
Thio-DNA, X = S

B)

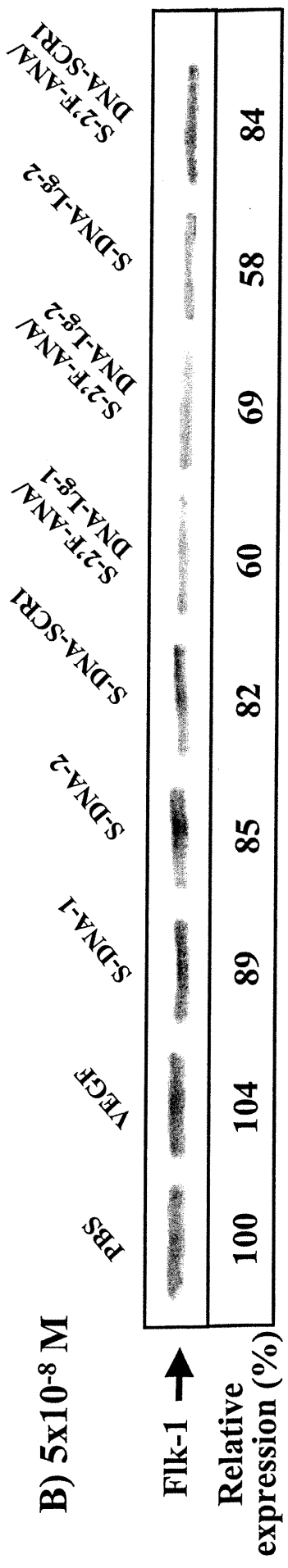


S-2'F-ANA-Lg

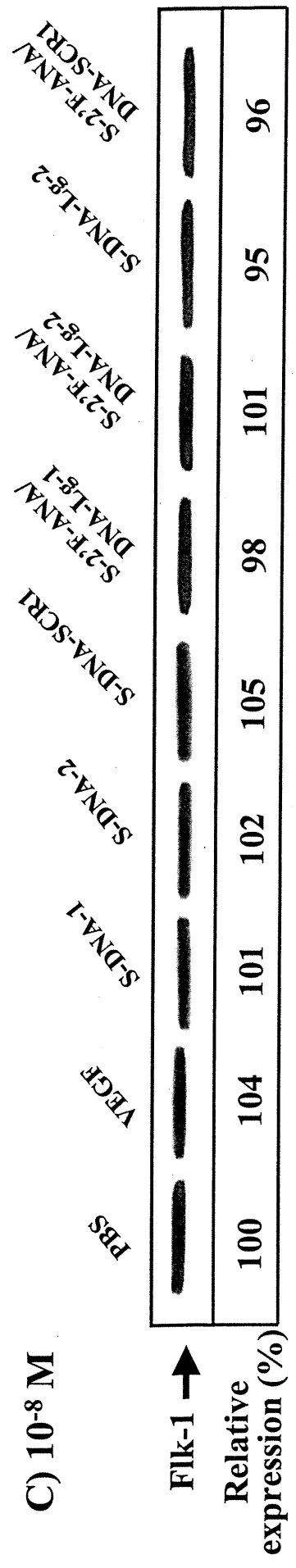
3.A) 10^{-7} M



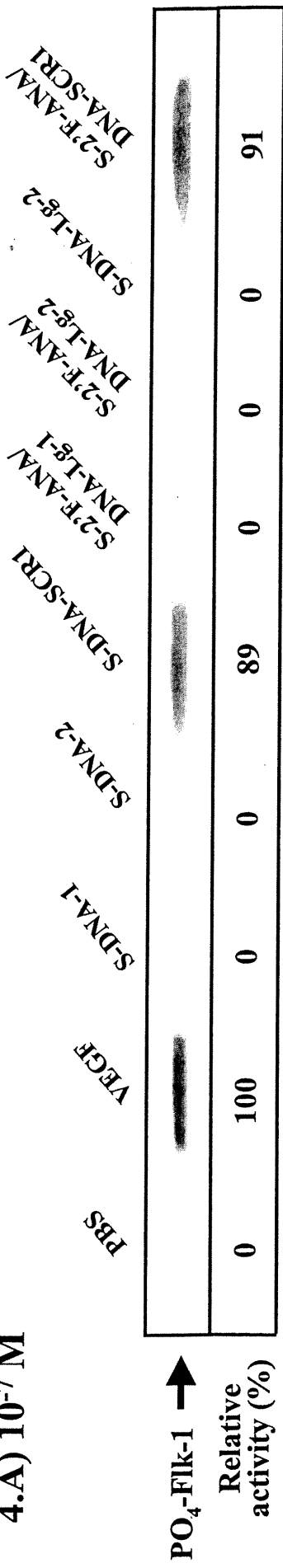
B) 5×10^{-8} M



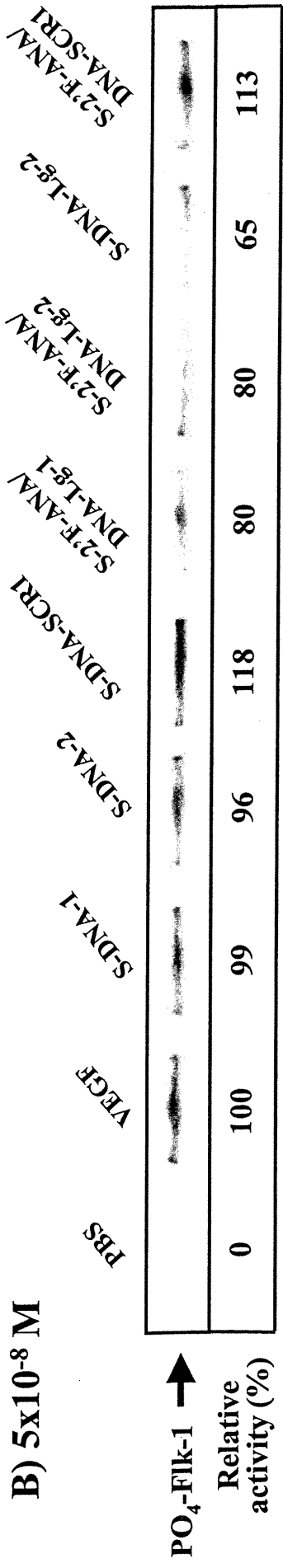
C) 10^{-8} M



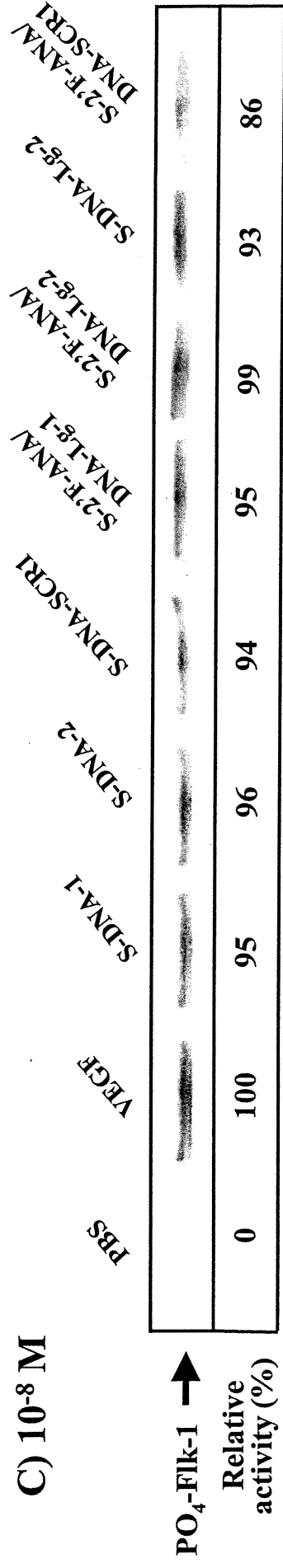
4.A) 10^{-7} M



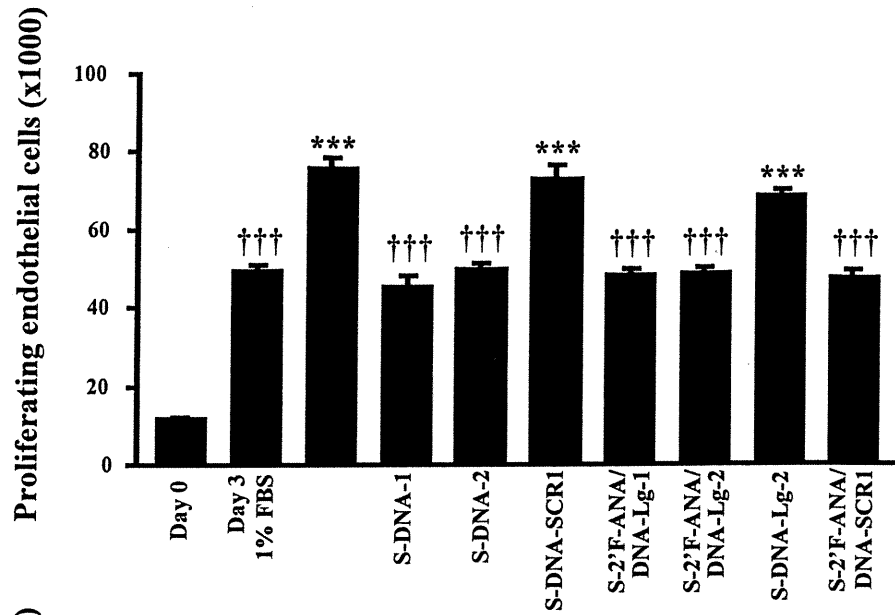
B) 5×10^{-8} M



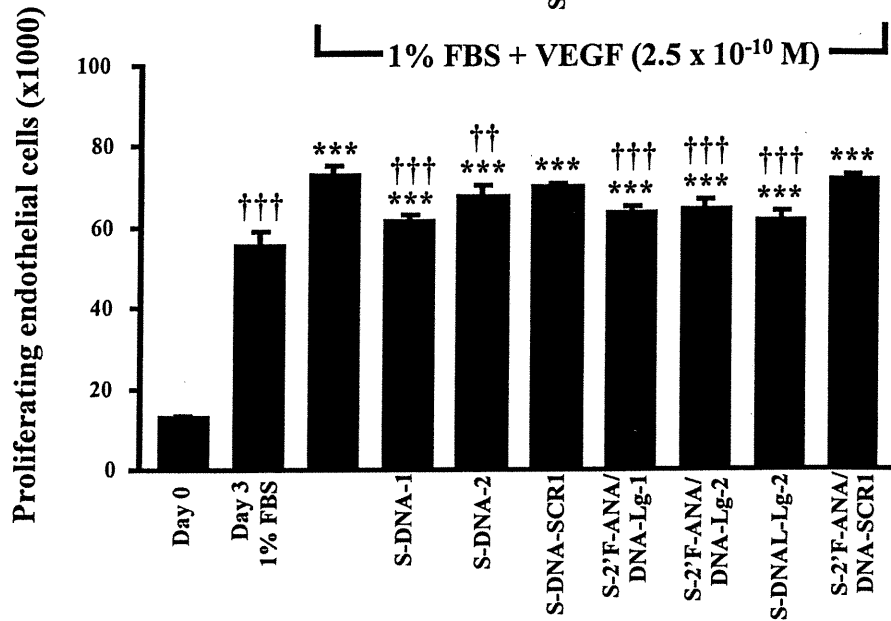
C) 10^{-8} M



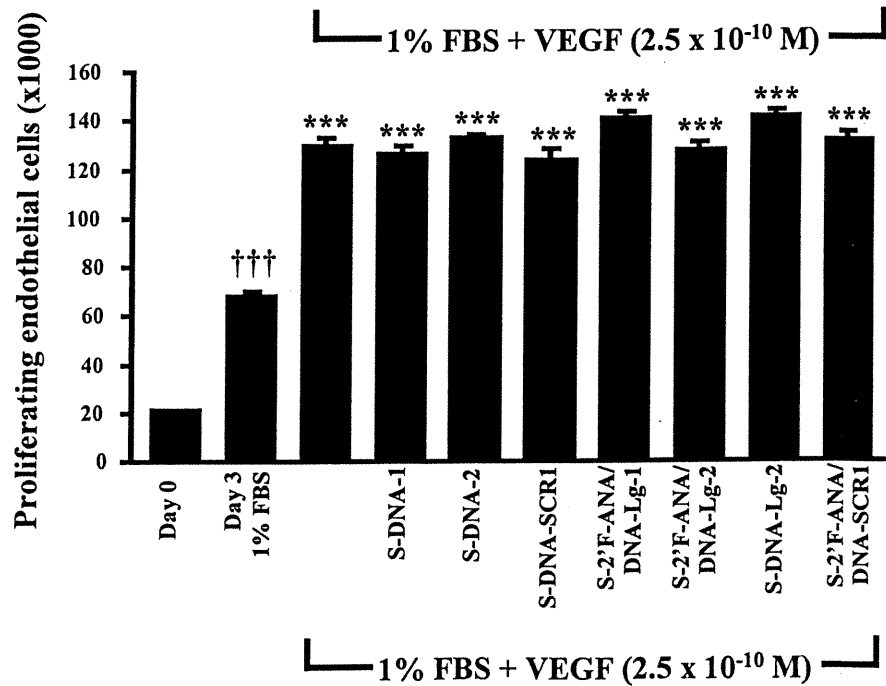
5.A) 10^{-7} M



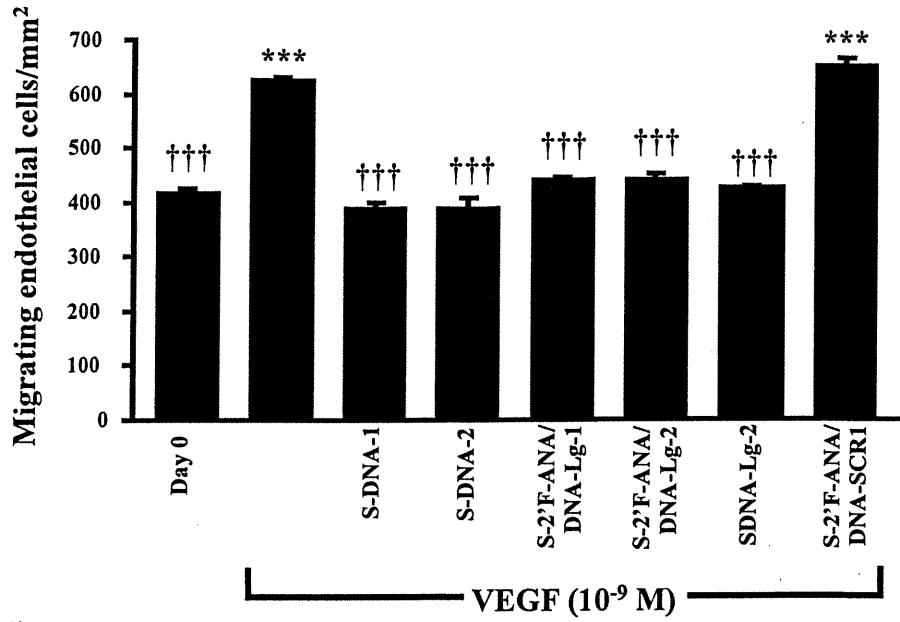
B) 5×10^{-8} M



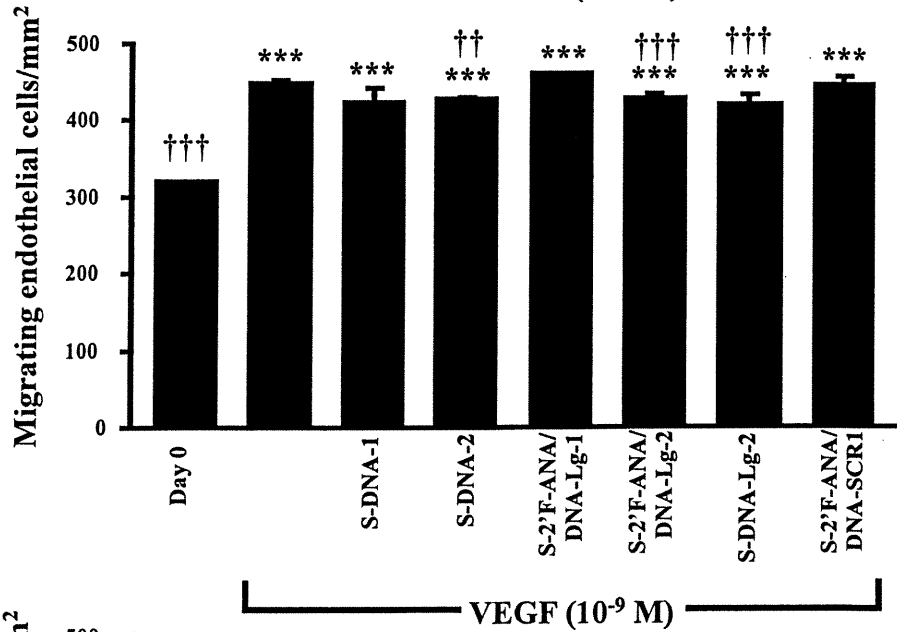
C) 10^{-8} M



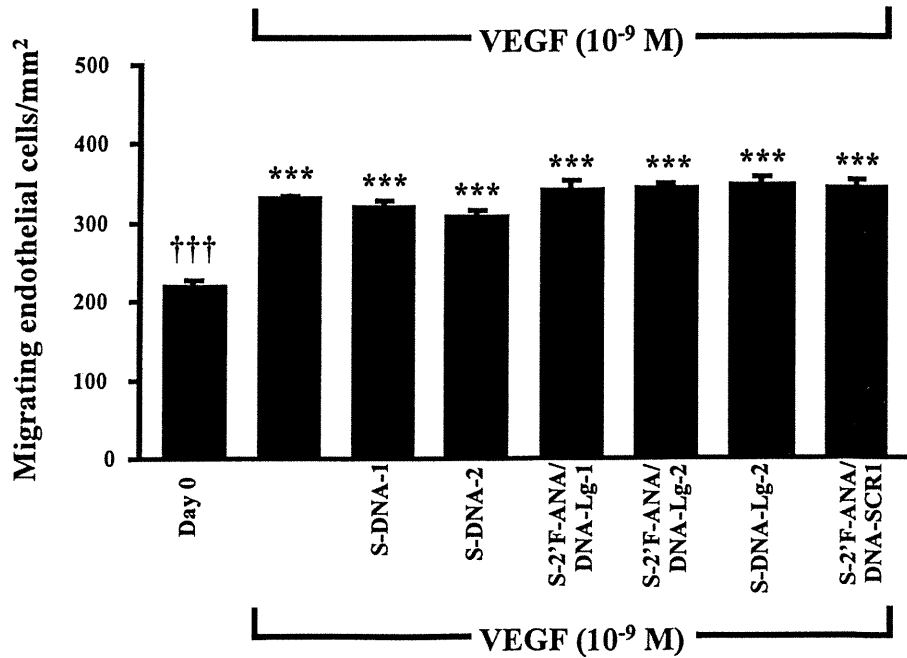
6.A) 10^{-7} M

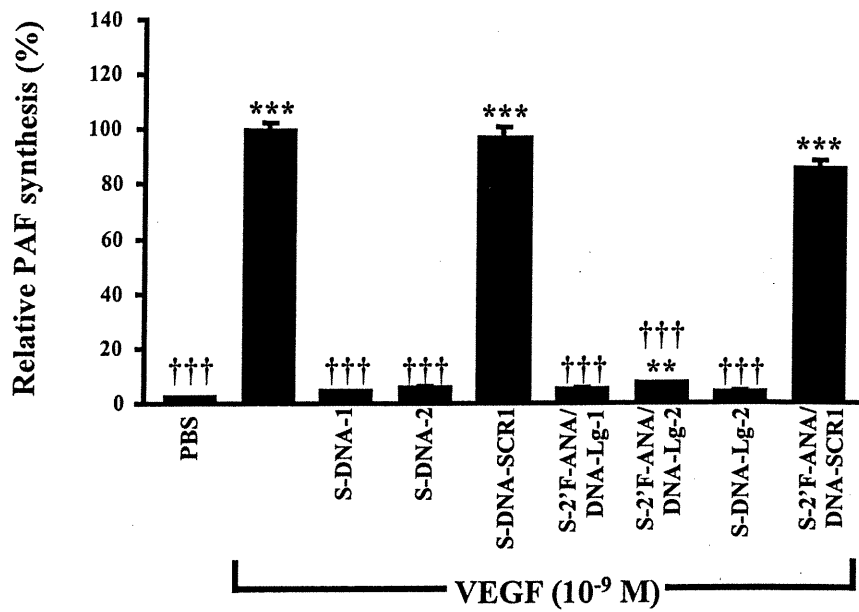
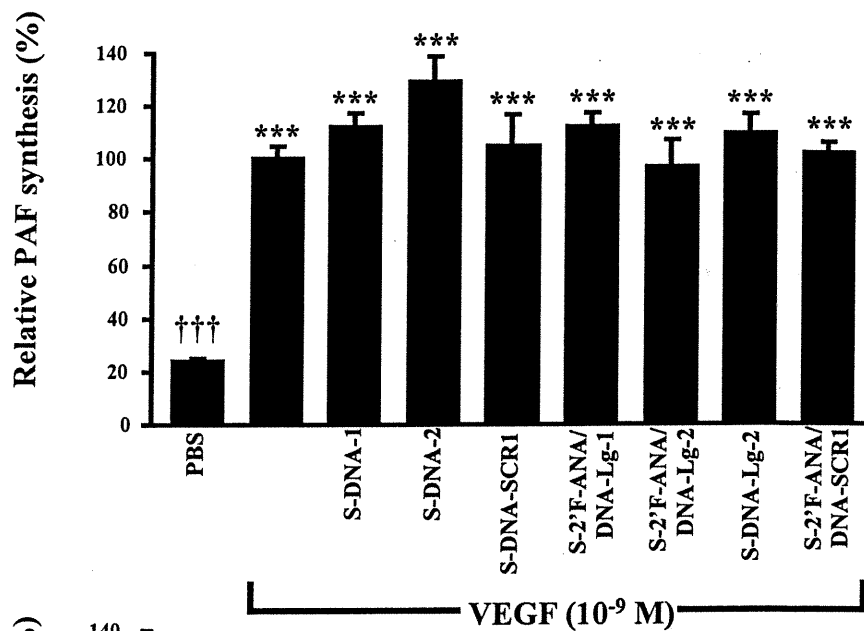
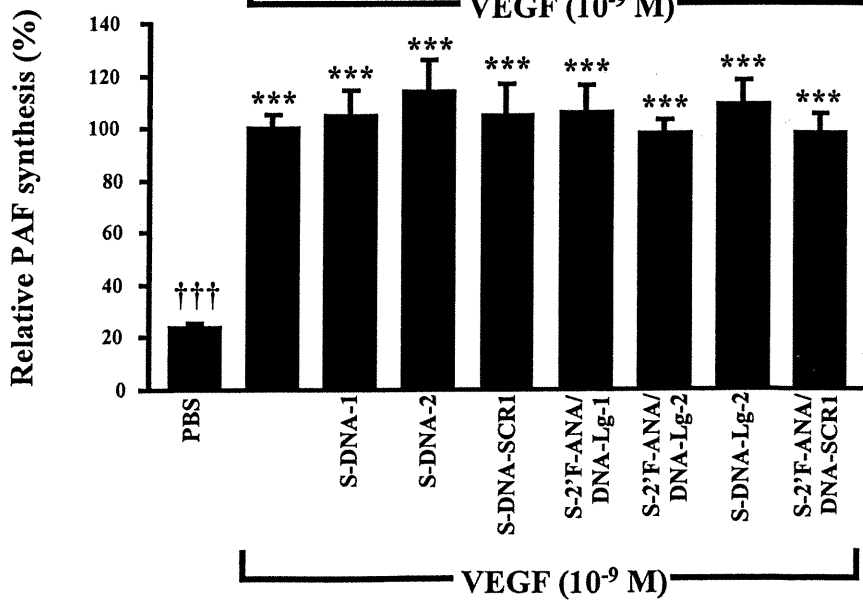


B) 5×10^{-8} M



C) 10^{-8} M



7.A) 10^{-7} MB) 5×10^{-8} MC) 10^{-8} M

3.0 DISCUSSION

3.1. LES CHIMÈRES S-2'F-ANA / ADN ONT UNE MEILLEURE AFFINITÉ DE LIAISON À L'ARN

Il a été démontré que les modifications en position 2' du sucre de l'ADN provoquent une augmentation de son affinité de liaison pour l'ARNm complémentaire (22, 23). En effet, c'est ce qui est observé dans le cas d'oligonucléotides composés de résidus S-2'F-ANA. Tel que mentionné précédemment, ces molécules se caractérisent par une inversion de configuration en position C2' du ribose, ce qui amène la formation d'arabinose combinée à la substitution du groupement hydroxyl à cette position par un atome de fluor et par la présence d'un lien phosphorothioate (Figure 3 du mémoire). Par contre, les oligonucléotides phosphorothioates chimériques utilisés se composent de 2'-désoxy-2'-fluoro- β -D-arabinose et de 2'-désoxyribose. De plus, ils possèdent un sucre en conformation L à leur position 3'.

Lors de cette étude, nous avons déterminé la température de fusion entre différentes séquences d'antisens chimériques complémentaires à l'ARNm du récepteur Flk-1 et nous avons obtenu des températures de fusion de 67°C pour la séquence S-2'F-ANA / DNA-Lg-1 et de 65°C pour la séquence S-2'F-ANA / DNA-Lg-2 (Tableau 1 de l'article). Tant qu'à elles, les séquences S-AS1 et S-AS2 composées d'une structure d'ADN phosphorothioates ont des températures de fusion de 61°C et 58°C. Par ailleurs, les antisens chimériques possèdent une affinité de liaison accrue de 6 à 7°C envers leur brin d'ARN complémentaire comparativement aux antisens d'ADN phosphorothioates. L'ajout de résidus 2'F-ANA augmentent l'affinité de liaison des

oligonucléotides phosphorothioates à des valeurs presque équivalente à l'ADN non modifié, pour qui les séquences AS1 et AS2 ont des températures de fusion de 69°C et 67°C (Tableau 1 de l'article). Cette augmentation n'est pas causée par l'incorporation d'un sucre en conformation L à leur position 3', étant donné qu'un oligonucléotide d'ADN phosphorothioates portant seulement cette modification (S-DNA-Lg-2) a une température de fusion de 58°C.

L'augmentation de la température de fusion pour les oligonucléotides phosphorothioates composés de résidus 2'F-ANA permet d'évaluer leur affinité de liaison avec l'ARNm complémentaire. En effet, ces antisens chimériques possèdent une meilleure affinité de liaison comparativement à l'ADN phosphorothioate.

3.2. LES CHIMÈRES S-2'F-ANA / ADN CHIMÉRIQUES ACTIVENT LA RNASE H

Les oligonucléotides phosphorothioates composés exclusivement de résidus 2'F-ANA n'activent pas la RNase H aussi efficacement que l'ADN phosphorothioate. Dans notre étude, nous avons observé la présence de fragments de dégradation lors de l'incubation d'oligonucléotides chimériques en présence de RNase H (Figure 2 de l'article). Les antisens chimériques sont donc capables d'activer la RNase H, probablement à cause de leur centre formé d'ADN phosphorothioates. Par contre, cette activation n'est pas aussi importante que dans le cas de complexe formé d'ADN non modifié et d'ARN. Cette propriété des oligonucléotides chimériques se révèle très importante étant donné qu'elle comporte le mécanisme principal par lequel les antisens induisent leur action.

3.3. LES CHIMÈRES S-2'F-ANA / ADN RÉDUISENT LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DE FLK-1 ET SA PHOSPHORYLATION INDUITE PAR LE VEGF

Les oligonucléotides phosphorothioates composés de résidus 2'F-ANA possèdent une bonne affinité de liaison envers leur ARNm complémentaire et le complexe ainsi formé induit l'activation de la RNase H. Malgré cela, nous devons déterminer la capacité de ces molécules à inhiber la synthèse d'une protéine particulière pour être en mesure d'évaluer leur activité biologique réelle.

Dans cette optique, nous avons traité des cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC) avec différentes concentrations d'oligonucléotides ayant une séquence complémentaire à l'ARNm du récepteur Flk-1 du VEGF et vérifié leurs effets sur la synthèse protéique de Flk-1 et sa phosphorylation induite par le VEGF. À la plus haute concentration utilisée (10^{-7} M), les chimères S-2'F-ANA / ADN se sont révélés aussi efficaces que ceux composés d'ADN phosphorothioates. En effet, l'expression du récepteur Flk-1 a été réduite de 66% à 83%, tandis que sa phosphorylation a été complètement inhibée (Figures 3A et 4A de l'article). Par contre, à une concentration d'oligonucléotides de 5×10^{-8} M, les antisens chimériques se sont révélés plus efficaces en inhibant la synthèse protéique de Flk-1 de 40% pour la séquence S-2'F-ANA / DNA-Lg-1 et de 31% pour la séquence S-2'F-ANA / DNA-Lg-2, tandis que les oligonucléotides d'ADN phosphorothioates l'ont réduite de 11% et 15% pour les séquences S-AS1 et S-AS2 (Figures 3B et 4B de l'article). À cette concentration, les deux séquences d'antisens phosphorothioates composés de résidus 2'F-ANA ont permis de réduire la phosphorylation de Flk-1 induite par le VEGF de 20%. Les

antisens phosphorothioates n'ont eu aucun effet à ce niveau. À la concentration la plus faible (10^{-8} M), les deux classes d'antisens n'ont pas été efficaces (Figures 3C et 4C de l'article).

Ainsi, la capacité plus élevée des antisens chimériques à inhiber l'expression protéique de Flk-1 ainsi que sa phosphorylation comparativement à l'ADN phosphorothioate corrélient avec leur meilleure affinité de liaison pour leur ARNm complémentaire.

3.4. LES CHIMÈRES S-2'F-ANA / ADN INHIBENT LES EFFETS BIOLOGIQUES DU VEGF: LA PROLIFÉRATION, LA MIGRATION ET LA SYNTHÈSE DE PAF

En ce qui concerne les activités biologiques du VEGF reliées à l'activation du récepteur Flk-1, soit la prolifération, la migration et la synthèse de PAF au niveau des cellules endothéliales, les chimères S-2'F-ANA / ADN ainsi que les antisens S-DNA se sont avérés équivalents pour les inhiber.

Pour ce qui est de la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF, les chimères S-2'F-ANA / ADN ainsi que les antisens S-DNA l'ont complètement inhibée à une concentration de 10^{-7} M. Par contre, à une concentration de 5×10^{-8} M, la prolifération induite par le VEGF a été réduite de 66% et 31% pour la séquence S-DNA-1 et S-DNA-2 et de 55%, 50% et 67% pour les séquences S-2'F-ANA / DNA-Lg-1, S-2'F-ANA / DNA-Lg-2 et S-DNA-Lg-2. À une concentration de 10^{-8} M, aucun des antisens n'a été capable de réduire la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF (Figure 5 de l'article). Par contre, tous les

oligonucléotides ont totalement bloqué les effets du VEGF sur la migration et la synthèse de PAF au niveau des cellules endothéliales à une concentration de 10^{-7} M, sans provoquer d'inhibition aux autres concentrations (Figures 6 et 7 de l'article). Nous avons précédemment obtenu une courbe dose-réponse lors de la détection de l'expression protéique et de la forme phosphorylée de Flk-1 chez les cellules endothéliales suite à des traitements avec différentes concentrations d'oligonucléotides. L'absence d'une courbe dose-réponse dans le cas de la migration et de la synthèse de PAF induite par le VEGF au niveau des cellules endothéliales peut s'expliquer par le fait qu'à 5×10^{-8} M, les effets de ces antisens sur l'expression protéique et la phosphorylation de Flk-1 par rapport au control sans antisens ne sont peut-être pas assez importants pour que nous puissions observer une différence sur certaines activités biologiques du VEGF.

4.0. CONCLUSION

Nos résultats permettent de valider le potentiel biologique d'une nouvelle classe d'antisens composés de résidus S-2'F-ANA et d'ADN, ainsi que d'un sucre en conformation L à leur extrémité 3'. Nous avons démontré que ces oligonucléotides possèdent une meilleure affinité de liaison à l'ARNm complémentaire et permettent de mieux bloquer l'expression protéique de Flk-1 de même que sa phosphorylation comparativement à l'ADN phosphorothioate. Nous avons également démontré que les hybrides formés par les antisens chimériques et l'ARNm permet d'activer la RNase H, une caractéristique essentielle au fonctionnement de la thérapie génique par antisens. Finalement, les chimères S-2'F-ANA / ADN permettent de réduire les effets biologiques du VEGF et ne sont pas toxiques pour les cellules étant donné que nous n'avons pas observé de changements morphologiques, de nécrose ou d'apoptose chez les cellules traitées avec ce type d'oligonucléotide.

Par contre, d'autres études ont démontré que l'activité des antisens d'ADN phosphorothioates est atténuée après 24 heures, tandis que les chimères S-2'F-ANA / ADN sont toujours actifs après 60 heures (C.-N. Lok, M. J. Damha et M. A. Parniak, résultats non publiés). Étant donné que lors de notre étude, nous avons traité les cellules quotidiennement avec les oligonucléotides, il serait intéressant de vérifier les mêmes paramètres sous un traitement moins fréquent.

5.0. RÉFÉRENCES

- (1) Green, P.J., Pines, O., et Inouye, M., The role of antisense RNA in gene regulation, *Annu. Rev. Biochem.*, 1986; 55: 569-597.
- (2) Izant, J.G. et Weintraub, H., Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by antisense RNA, *Science*, 1985; 229: 345-352.
- (3) Zamecnik, P.C. and Stephenson, M.L., Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; 75: 280-284.
- (4) Stephenson, M.L. et Zamecnik, P.C., Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxynucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; 75: 285-288.
- (5) Uhlmann, E. et Peyman, A., Antisense oligonucleotides: A new therapeutic principle. *Chem. Rev.*, 1990; 90: 543-584.
- (6) Kim, S.K. et Wold, B.J., Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high levels of antisense RNA, *Cell*, 1985; 42: 129-138.
- (7) Kitajima, I., Shinohara, T., Bilakovics, J., Brown, D.A., Xu, X. et Nerenberg, M., Ablation of transplanted HTLV-Itax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF-Kappa B, *Science*, 1993; 259: 1523.
- (8) Dagle, J.M., Weeks, D.L. et Walder, J.A., Pathways of degradation and mechanisms of action of antisense oligonucleotides in *Xenopus laevis* embryos, *Antisense Res. Dev.*, 1991; 1: 11-13.

- (9) D'Orléans-Juste, P., Sirois, M.G., Edelman, E.R., Regoli, D., Pheng, L.H., Bkaily, G. et Lindsey, C.J., DNA antisense strategies in the study of receptors for vasoactive peptides, and of growth and wound-healing factors, *Mol. Cell. Biochem.*, 1997; 172: 199-211.
- (10) Stein, C.A., Does antisense exist?, *Nature Med.*, 1995; 1: 1119-1121.
- (11) Guvakova, M.A., Yakubov, L.A., Vlodaysky, I., Tonkinson, J.L. et Stein, C.A., Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix, *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 2620-2627.
- (12) Shaw, J.P., Kent, K., Bird, J., Fishback, J. et Froehler, B., Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease in serum, *Nucl. Acids Res.*, 1997; 19: 747-751.
- (13) Loke, S., Stein, C., Zhang, X., Mori, K., Nakanishi, M., Subashinge, C., Cohen, J. et Neckers, L., Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 3474-3478.
- (14) Yakubov, L.A., Deeva, E.A., Zarytova, V.F., Ivanova, E.M., RYTE, A.S., Yurchenko, L.V. et Vlassov, V.V., Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors?, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 6454-6458.
- (15) Eckstein, F., Phosphorothioate analogues of nucleotides. Tools for the investigation of biochemical processes, *Angewandte Chem.*, 1983; 22: 423-425.
- (16) Eckstein, F., Nucleoside phosphorothioates, *Annu. Rev. Biochem.*, 1985; 54: 367-402.

- (17) Stein, C.A., Subasinghe, C., Shinozuka, K. et Cohen, J.S., Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides, *Nucleic Acids Res.*, 1988; 16: 3209-3221.
- (18) Crooke, S.T., An overview of progress in antisense therapeutics, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 1998; 8: 115-122.
- (19) Damha, M.J., Giannaris, P.A. et Marfey, P., Antisense L/D-oligodeoxynucleotide chimeras: nuclease stability, base-pairing properties, and activity at directing ribonuclease H, *Biochemistry*, 1994; 33: 7877-7885.
- (20) Inoue, H., Hayase, Y., Imura, A., Iwai, S., Miura, K., et Ohtsuka, E., Synthesis and hybridization studies on two complementary nona (2'-O-methyl) ribonucleotides, *Nucl. Acids Res.*, 1987; 15: 6131-6148.
- (21) Inoue, H., Hayase, Y., Iwai, S. et Ohtsuka, E., Sequence-dependent hydrolysis of RNA using modified oligonucleotide splints and RNase H, *FEBS Lett.*, 1987; 215: 327-330.
- (22) Damha, M.J., Noronha, A.M., Wilds, C.J., Trempe, J.-F., Denisov, A., Pon, R.T. et Gehring, K., Properties of arabinonucleic acids (ANA and 2'-F-ANA): Implications for the design of antisense therapeutics that invoke RNase H cleavage of RNA, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2001; 20: 429-440.
- (23) Wilds, C.J. et Damha, M.J., 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleosides and oligonucleotides (2'-F-ANA): Synthesis and physicochemical studies, *Nucl. Acids Res.*, 2000; 28: 3625-3635.

- (24) Drew, H.R., et Dickerson, R.E., Structure of a B-DNA dodecamer III. Geometry of hydration, *J. Mol. Biol.*, 1981; 151: 535-556.
- (25) Subramanian, P.S., Ravishanker, G. et Beveridge, D.L., Theoretical considerations on the "spine of hydration" in the minor groove of d(CGCGAATTCGCG).d(GCGCTTAAGCGC): Monte Carlo computer simulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 1836-1840.
- (26) Noronha, A.M., Wilds, C.J., Lok, C.-N., Viazovkina, K., Arion, D., Parniak, M.A. et Damha, M.J., Synthesis and biophysical properties of arabinonucleic acids (ANA): Circular dichroic spectra, melting temperatures, and ribonuclease H susceptibility of ANA.RNA hybrid duplexes, *Biochemistry*, 2000; 39: 7050-7062.
- (27) Monia, B.P., Lesnik, E.A., Gonzalez, C., Lima, W.F., McGee, D., Guinosso, C. J., Kawasaki, A.M., Cook, P.D. et Freier, S.M., Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression, *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 14514-14522.
- (28) Lok, C.N., Viazovkina, E., Min, K.L., Nagy, E., Wilds, C.J., Damha, M.J., et Parniak, M.A., Potent gene-specific inhibitory properties of mixed-backbone antisense oligonucleotides comprised of 2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinose and 2'-deoxyribose nucleotides, *Biochemistry*, 2002; 41: 3457-3467.
- (29) Gewirtz, A.M. et Calabretta, B., A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis in vitro, *Science*, 1988; 242: 1303-1306.
- (30) Heikkila, R., Schwab, G., Wickstrom, E., Loong Loke, S., Pluznik, D.H., Watt, R. et Neckers, L.M., A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G₀ to G₁, *Nature*, 1987; 328: 445-449.

- (31) Jaskulski, D., de Riel, J.K., Mercer, W.E., Calabretta, B. et Baserga, R., Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin, *Science*, 1988; 240: 1544-1546.
- (32) Miller, P.S., Agris, C.H., Aurelian, L., Blake, K.R., Murakami, A., Reddy, M.P., Spitz, S.A. et Ts'0, P.O.P., Control of ribonucleic acid function by oligonucleoside methylphosphonates, *Biochimie*, 1985; 67: 769-776.
- (33) Miller, P.S. et Ts'0, P.O.P, A new approach to chemotherapy based on molecular biology and nucleic acid chemistry: Matagen (masking tape for gene expression), *Anti-Cancer Drug Design*, 1987; 2: 117-128.
- (34) Zerial, A., Thuong, N.T. et Hélène, C., Selective inhibition of the cytopathic effect of type A influenza viruses by oligodeoxynucleotides covalently linked to an intercalating agent, *Nucl. Acids Res.*, 1987; 15: 9909-9919.
- (35) Levin, A.A., A review of issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1489: 69-84.
- (36) Sparwasser, T., Hultner, L., Koch, E.S., Luz, A., Lipford, H. et Wagner, H., Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis, *J. Immunol.*, 1999; 162: 2368-2374.
- (37) Krieg, A.M. et Stein, C.A., Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: Antisense or anti-protein?, *Antisense Res. Dev.*, 1995; 5: 241.
- (38) Krieg, A.M., Yi, A.-K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A. et Klinman, D.M., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation, *Nature*, 1995; 374: 546-549.

- (39) Klinman, D.M., Ae-Kyung, Y., Beaucage, S.L., Conover, J. et Krieg, A.M., CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93, 2879-2883.
- (40) Yi, A.-K., Chace, J.H., Cowdery, J.S. et Krieg, A.M., IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides, *J. Immunol.*, 1996; 156: 558-564.
- (41) Galbraith, W.M., Hobson, W.C., Giclas, P.C., Schechter, P.J. et Agrawal, S., Complement activation and hemodynamic changes following intravenous administration of phosphorothioate oligonucleotides in the monkey, *Antisense Res. Dev.*, 1994; 4: 201-206.
- (42) Wallace, T.L., Bazemore, S.A., Kornbrust, D.J. et Cossum, P.A., Single-dose hemodynamic toxicity and pharmacokinetics of a partial phosphorothioate anti-HIV oligonucleotide (AR177) after intravenous infusion to cynomolgus monkeys, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996; 278: 1306-1312.
- (43) Henry, S.P., Giclas, P.C., Leeds, J., Pangburn, M., Auletta, C., Levin, A.A. et Kornbrust, D.J., Activation of the alternative pathway of complement by a phosphorothioate oligonucleotide: Potential mechanism of action, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997; 281: 810-816.
- (44) Griffin, L.C., Tidmarsh, G.F., Bock, L.C., Toole, J.J. et Leung, L.L.K., In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits, *Blood*, 1993; 81: 3271-3276.

(45) Henry, S.P., Novotny, W., Leeds, J., Auletta, C. et Kornbrust, D.J., Inhibition of coagulation by a phosphorothioate oligonucleotide, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 1997; 7: 503-510.

(46) Bernatchez, P.N., Soker, S., et Sirois, M.G., Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis, *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 31047-31054.

COAUTHOR AGREEMENT

Student Identification: Julie Lacombe, PHL M.Sc. Pharmacologie



Article description: Title: Antisense inhibition of Flk-1, a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF), by oligonucleotides comprised of 2'-deoxy-2' fluoro-β-D-arabino and 2'-deoxynucleosides.

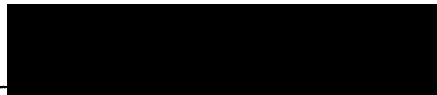
Authors: Julie Lacombe, Pascal N. Bernatchez, Ekaterina Viazovkina, Masad J. Danha and Martin G. Siros

The article is in prepartation and will be submitted in May 2002.

As a coauthor, I agree that Julie Lacombe includes this article in her M.Sc. thesis which is entitled:

Potentiel pharmacologique d'une nouvelle classe d'antisens dans l'application de la thérapie génique.

Ekaterina Viazovkina



7. 05. 2002

Coauthor

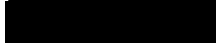
Signature

Date

Dr. Sirois

COAUTHOR AGREEMENT

Student Identification: Julie Lacombe, PHL M.Sc. Pharmacologie



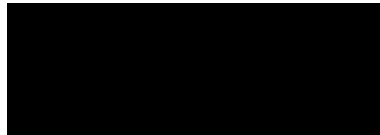
Article description: Title: Antisense inhibition of Flk-1, a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF), by oligonucleotides comprised of 2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabino and 2'-deoxynucleosides.
Authors: Julie Lacombe, Pascal N. Bernatchez, Ekaterina Viazovkina, Masad J. Damha and Martin G. Sirois

The article is in preparation and will be submitted in May 2002.

As a coauthor, I agree that Julie Lacombe includes this article in her M.Sc. thesis which is entitled:

Potentiel pharmacologique d'une nouvelle classe d'antisens dans l'application de la thérapie génique.

Masad Damha



May 10/2002

Coauthor

Signature

Date

ACCORD DES COAUTEURS

Identification de l'étudiant: Julie Lacombe, PHL M.Sc. Pharmacologie



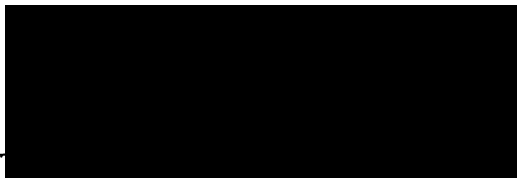
Description de l'article: Titre: Antisense inhibition of Flk-1, a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF), by oligonucleotides comprised of 2'-deoxy-2'fluoro-β-D-arabino and 2'-deoxynucleosides.
 Auteurs: Julie Lacombe, Ekaterina Viazovkina, Pascal N. Bernatchez, Annie Galarneau, Masad J. Damha and Martin G. Sirois

Cet article est en préparation et sera soumis en mai 2002 dans *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.

À titre de coauteur dans l'article identifié ci-dessus, je suis en accord pour que Julie Lacombe inclus cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre:

Potentiel pharmacologique d'une nouvelle classe d'antisens dans l'application de la thérapie génique.

Martin G. Sirois



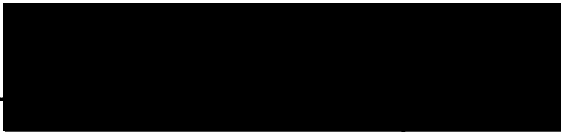
10/05/2002

Coauteur

Signature

Date

Pascal N. Bernatchez



13/5/2002

Coauteur

Signature

Date

COAUTHOR AGREEMENT

Student Identification: Julie Lacombe, PHL M.Sc. Pharmacologie
[Redacted]

Article description: Title: Antisense inhibition of Flk-1, a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF), by oligonucleotides comprised of 2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabino and 2'-deoxynucleosides.
Authors: Julie Lacombe, Pascal N. Bernatchez, Ekaterina Viazovkina, Annie Galameau, Masad J. Damha and Martin G. Sirosis

The article is in preparation and will be submitted in May 2002.

As a coauthor, I agree that Julie Lacombe includes this article in her M.Sc. thesis which is entitled:

Potentiel pharmacologique d'une nouvelle classe d'antisens dans l'application de la thérapie génique.

Annie Galameau

Coauthor

[Redacted Signature]

Signature

10 mai 2002

Date

COAUTHOR AGREEMENT

Student Identification: Julie Lacombe, PHL M.Sc. Pharmacologie



Article description: Title: Antisense inhibition of Flk-1, a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF), by oligonucleotides comprised of 2'-deoxy-2'fluoro-β-D-arabino and 2'-deoxynucleosides.

Authors: Julie Lacombe, Pascal N. Bernatchez, Ekaterina Viazovkina, Annie Galameau, Masad J. Damha and Martin G. Sirois

The article is in preparation and will be submitted in May 2002.

As a coauthor, I agree that Julie Lacombe includes this article in her M.Sc. thesis which is entitled:

Potentiel pharmacologique d'une nouvelle classe d'antisens dans l'application de la thérapie génique.

Annie Galameau



10 mai 2002

Coauthor

Signature

Date

6.0. ANNEXE 1

Les antisens dirigés contre l'ARNm du récepteur Flk-1 ont été obtenus à partir de la séquence partielle de l'ADNc bovin. Les antisens 1 sont dirigés contre le fragment 1-18 de l'ARNm bovin de Flk-1 tandis que les antisens 2 sont dirigés contre le fragment 20-37. GenBank accession number : 94 298.

Nom de l'antisens	Séquence
S-DNA-1	5'-gct gct ctg att gtt ggg-3'
S-DNA-2	5'-cct cca ctc ttt tct cag-3'
S-DNA-SCR-1	5'-tgc tgg cat gtg cgt tgt-3'
S-2'F-ANA / DNA-Lg-1	5'-gCT gct ctg ATT gTT gg(Lg)-3'
S-2'F-ANA / DNA-Lg-2	5'-CCT Cca ctc ttt tCT CA(Lg)-3'
S-2'F-ANA-Lg-2	5'-cct cca ctc ttt tct ca(Lg)-3'
S-2'F-ANA / DNA-Lg-SCR1	5'-gTT cgg tgc TAT gCT gt(Lg)-3'

Tous les nucléotides de ces antisens possèdent des liens phosphorothioates. Les lettres minuscules représentent les désoxyribonucléotides, les lettres majuscules représentent les fluoroarabinonucléotides et l'abréviation Lg signifie L-désoxyguanosine.

Les antisens composés exclusivement de liens phosphorothioates (S-DNA-1, S-DNA-2 et S-DNA-SCR-1) ont été synthétisés à l'Institut Armand-Frappier (Laval, Qc, Canada). Les antisens composés de fluoroarabinonucléotides et / ou de L-

désoxyguanosine ont été synthétisés par le laboratoire du Dr Masad J. Damha, au département de chimie de l'Université Mc Gill (Montréal, Qc, Canada). Après leur synthèse, les antisens ont été lyophilisés et resuspendus dans de l'eau stérile.