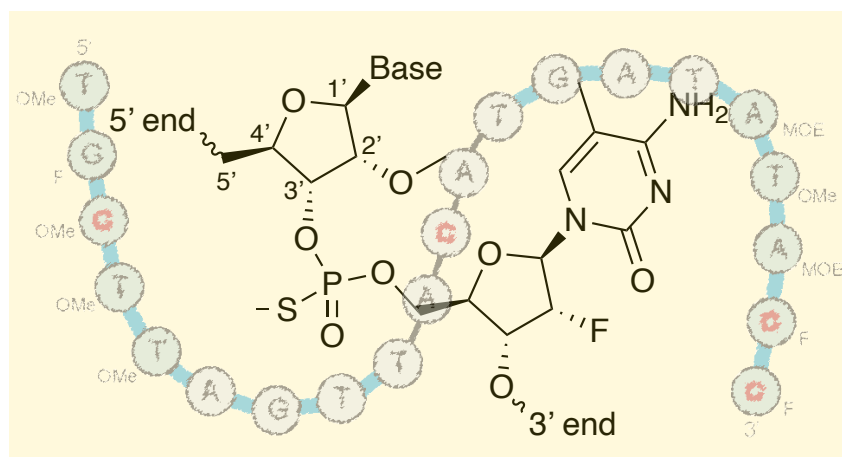


Grundlagen und Konzepte für Umweltrisikoplanalysen von chemisch modifizierten, therapeutischen Oligonukleotiden

Inga M. Scheidat, Helmut Bürgmann, Cresten Mansfeldt,
Serina L. Robinson, Michael Sander, Thomas B. Hofstetter
Eawag, Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology

Bericht im Auftrag des Bundesamt für Umwelt, BAFU
Auftrag Nr. 110017262/8T10/00.5004.PZ/0026

23. Juni 2025



Impressum

Auftraggeber: Bundesamt für Umwelt (BAFU), Abt. Boden und Biotechnologie, CH-3003 Bern (Auftrag Nr. 110017262/8T10/00.5004.PZ/0026 vom 01.09.2024 bis 30.06.2025). Das BAFU ist ein Amt des Eidg. Departements für Umwelt, Verkehr, Energie und Kommunikation (UVEK).

Auftragnehmerin: Eawag, Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz, CH-8600 Dübendorf

AutorInnen: Inga M. Scheidat, Helmut Bürgmann, Cresten Mansfeldt, Serina L. Robinson, Michael Sander, Thomas B. Hofstetter (Eawag, Überlandstrasse 133, 8600 Dübendorf). Korrespondenzadresse: thomas.hofstetter@eawag.ch

Begleitgruppe: Andrea Johnner (Abteilung Boden und Biotechnologie BAFU)

Hinweis: Dieser Bericht wurde im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU) verfasst. Für den Inhalt ist allein der Auftragnehmer verantwortlich.

Datum: 23. Juni 2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Vorwort	vii
Zusammenfassung	ix
Abkürzungsverzeichnis	xi
Glossar	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Motivation und Ziele	1
1.2 Vorgehen, Methodik und Aufbau des Berichts	2
1.3 Chemisch modifizierte Oligonukleotide und deren Wirkmechanismen	4
2 Einteilung und Systematik	7
2.1 Chemisch modifizierte Oligonukleotide	7
2.1.1 Strukturelle Modifikationen des Phosphodiesters	8
2.1.2 Erweiterte Ribose Analoga	9
2.1.3 Modifikationen am Nukleotid Rückgrat	10
2.1.4 Modifikationen an der 2'-Position der Ribose	11
2.1.5 Strukturelle Modifikation der Nukleobasen	13
2.2 Kombinationen chemischer Modifikationen in mON Kategorien	14
2.2.1 Gapmers	15
2.2.2 Small interfering RNA	15
2.2.3 Micro RNA	17
2.2.4 Splice-Switching Oligonucleotides	17
2.2.5 Aptamers	18
2.3 Carriersysteme für die Verabreichung von mONs	18
2.3.1 Konjugate	18
2.3.2 mON Verabreichung mit Vesikeln	18
2.4 Analyse der zugelassenen Therapeutika	19
2.4.1 Strukturelle Modifikationen in Pharmaka	20
2.4.2 Theoretisch mögliche Modifikationen	21
3 Konzepte für die Umweltrisikoaanalyse	23
3.1 Ansätze und Annahmen für die Umweltrisikoaanalyse	24
3.1.1 Beurteilung aus Sicht von Chemikalien- vs. Biosicherheit	24
3.1.2 Rolle der Verabreichungsformen	25

3.2	Vorgehen für Beschreibung von Emission, Exposition und Effekten	26
3.2.1	Getrennte Betrachtung von Exposition und Effekten	26
3.2.2	Vorgehen unter Berücksichtigung limitierter Information	26
3.2.3	Emissionen	27
4	Emissionen	29
4.1	Geltungsbereich	29
4.2	Analyse von Angaben zu Exkretionsmengen und -anteilen	29
5	Exposition	33
5.1	Sorption	33
5.1.1	Adsorptionsverhalten von Nukleinsäuren	34
5.1.2	Adsorptionsverhalten modifizierter Oligonukleotide	35
5.2	Abiotische Hydrolyse	36
5.2.1	Hydrolyse der Phosphodiestergruppe	36
5.2.2	Implikationen für mONs	38
5.2.3	Abiotische Hydrolyse der <i>N</i> -glykosidischen Bindung	38
5.2.4	Abiotische Hydrolyse der Nukleobasen in Oligonukleotiden	39
5.3	Chemische Oxidation	39
5.3.1	Implikationen für mONs	40
5.4	Enzymatischer Abbau	40
5.4.1	Enzymklassen und katalysierte Reaktionen	40
5.4.2	Systematik der Nukleasen anhand ihrer Enzym-Substrat-Spezifität	41
5.4.3	Umweltrelevanz von Nuklease-Klassen	43
5.4.4	Auswirkungen chemischer Modifikationen auf Nukleaseaktivität	43
5.5	Aufnahme von mONs und Aufnahmebarrieren	44
5.5.1	Prokaryonten	44
5.5.2	Eukaryonten	45
6	Effekte	47
6.1	Sequenzunabhängige Effekte	48
6.1.1	Toxizität und Genotoxizität	48
6.1.2	Sequenzunabhängige Toxizität von mONs	50
6.2	Sequenzabhängige Effekte	50
6.2.1	(Geno)Toxizität von Modifikationen	51
6.2.2	Sequenzabhängigkeit von toxischen Nebenwirkungen	51
6.2.3	Off- und non-target Effekte bei Nichtzielorganismen	52
6.2.4	Effekte bei Nichtzielorganismen mit komplementären Zielstrukturen . . .	52
6.2.5	Transformation und Gain-of-Function durch Gentransfer	55
6.2.6	Bioinformatische Effektabschätzung	56
6.2.7	Vergleich von Effektkategorien	56
7	Erkenntnisse, Wissenslücken und Empfehlungen für weitere Forschung	59
7.1	Allgemeine Erkenntnisse	59
7.2	Wissenslücken und Empfehlungen	60
7.2.1	Emissionen	61
7.2.2	Exposition	61
7.2.3	Effekte	63
7.3	(Bio)Analytische Methoden für den mON Nachweis	64

7.3.1	Polymerase Chain Reactions	65
7.3.2	Sequencing by Synthesis	65
7.3.3	Nanopore-based Sequencing	66
7.3.4	Massenspektrometrie	66
7.3.5	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	68
Literaturverzeichnis		71
Appendices		83
A	mON Datenbank	a-1
A.1	Aufbau der Datenbank	a-1

Vorwort

Dieser Bericht zu Handen des Bundesamts für Umwelt, BAFU, wurde im Zeitraum vom 1. September 2024 bis 30. Juni 2025 erstellt und am 24. Juni 2025 der Begleitgruppe des BAFU sowie interessierten Vertreter:innen von Fachgruppen aus eidgenössischen Behörden vorgestellt. Der Inhalt des Berichts wurde anschliessend für die Publikation in wissenschaftlichen Fachzeitschriften weiterentwickelt. Wichtige Ergänzungen betreffen u.a. die Aktualisierung der zugelassenen Pharmaka (Stand Frühling 2026), illustrative Emissionsabschätzungen, sowie die Analyse verschiedener Effektkategorien (Tabelle 6.2). Das daraus hervorgegangene Manuskript ist unter [DOI:10.26434/chemrxiv.15002044/v1](https://doi.org/10.26434/chemrxiv.15002044/v1) als preprint frei verfügbar. Unter dieser DOI wird später auch auf die finale Publikation (Version of Record) des Fachartikels verwiesen.

Thomas Hofstetter, 22. April 2026.

Zusammenfassung

RNA-basierte Therapien ermöglichen neue medizinische Behandlungsansätze, bei denen gezielt in die Genexpression eingegriffen wird, um verschiedene Krankheiten zu bekämpfen. Dafür werden unterschiedliche, chemisch modifizierte Nukleinsäureketten, sogenannte modifizierte Oligonukleotide (mONs), eingesetzt, die aufgrund ihrer Modifikationen intakt und effizient an ihre Wirkorte im Patienten gelangen können. mONs zählen zu den “Arzneimitteln für neuartige Therapien” und gelten somit als biologisch aktives, genetisches Material. Dieses muss in der Schweiz in Hinblick auf mögliche Umweltrisiken während des Zulassungsverfahrens geprüft werden. Aufgrund der chemischen Modifikationen in dieser Substanzklasse, stellen mONs aber auch anthropogene Chemikalien dar. Diese Kombination von Eigenschaften führt dazu, dass es aktuell unklar ist, ob mONs in Umweltrisikooanalysen wie genetisch aktives Material (und somit analog genetisch modifizierte Organismen (GMOs)) oder wie anthropogene Chemikalien zu bewerten sind. Das Ziel der vorliegenden Studie war deshalb, wissenschaftliche Konzepte für die Umweltrisikooanalyse von mONs aus medizinischen Anwendungen zu identifizieren und zu beschreiben. Die spezifisch untersuchten Themenbereiche umfassten (i) die Analyse der momentan therapeutisch eingesetzten bzw. potenziell zukünftig einsetzbaren mONs, sowie (ii) die Beschreibung von Prozessen, welche die Verteilung, Bioverfügbarkeit, und Persistenz von mONs in relevanten Umweltkompartimenten bestimmen und (iii) möglicherweise zu (öko)toxikologischen Effekte von mONs auf Nicht-Zielorganismen führen können. Dazu wurden Kriterien für die Selektion von relevanten mONs identifiziert und Angaben zu deren Emission, Exposition und Effekten anhand der aktuellen Literatur zusammengetragen. Die wichtigsten vier Erkenntnisse dieser Studie sind (1) dass aktuell erst eine kleine Zahl von chemischen Modifikationen in 20 zugelassenen Pharmaka eingesetzt wird, die höchstens 11% der in der Literatur vorgeschlagenen Modifikationen abdeckt. (2) Prozesse, welche für Exposition und Effekte von mONs relevant sind, müssen nach deren Sequenzabhängigkeit und -unabhängigkeit analysiert werden. Dies impliziert, dass mONs in der Umweltrisikooanalyse sowohl als anthropogene Chemikalien als auch als genetisch aktives Material im Sinne von GMOs betrachtet werden müssen. (3) Eine wissenschaftliche Beschreibung der Prozesse, welche die Exposition und Effekte von modifizierten in der aquatischen Umwelt bestimmen, fehlen nahezu vollständig. Sie können nur aus den Informationen für natürliche Oligonukleotide in der Umwelt sowie einer Extrapolation für chemisch/biologische Konsequenzen, welche aus den aktuell eingesetzten chemischen Modifikationen hervorgehen, approximiert werden. (4) Die zu erwartenden Emissionen von mONs aus therapeutischer Anwendungen können nicht zuverlässig aus Angaben zur Exkretion abgeschätzt werden. Diese Studie zeigt, dass es an Grundlagen mangelt, um wissenschaftlich abgesicherte Aussagen zum Eintrag, Verhalten und (öko)toxikologische Effekte vom mONs in Umweltrisikooanalysen treffen zu können. Dieses Wissen systematisch zu generieren und zusammenzutragen sollte deshalb ein vordringliches Ziel von weitergehenden Arbeiten sein für welche wir 9 Empfehlungen abgeben.

Abkürzungsverzeichnis

ADME	Begriff aus der Pharmazie: Absorption, Distribution, Metabolismus und Elimination
ARA	Abwasserreinigungsanlage
ASO	Antisense Oligonukleotid
ATMP	Advanced Therapy Medicinal Product (Arzneimittel für neuartige Therapien)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dsRNA	Doppelsträngige RNA
EMA	European Medicines Agency
FDA	US. Food and Drug Administration
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GMO	Genetisch modifizierter Organismus (genetically modified organism)
LNP	Lipid-Nanopartikel
miRNA	micro RNA
mON	Chemisch modifizierte Oligonukleotide. Der Begriff wird in dieser Arbeit stellvertretend für therapeutisch eingesetzte bzw. einsetzbare Nukleotid-Polymere mit mindestens einer, nicht in der Natur vorkommenden chemischen Modifikation. In der englischsprachigen Literatur werden dafür Begriffe wie ONT für oligonucleotide therapeutics oder NAT für nucleic acid therapeutics verwendet.
ssRNA	Einzelsträngige RNA
SSOs	Splice-Switching Oligonukleotid
siRNAs	Small interfering RNAs
NA	Nukleinsäure (nucleic acid)
nt	Nukleotid(e)
ON	Oligonukleotid
RISC	RNA inducing silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
TFOs	Triple-helix forming oligonucleotides
ZNS	Zentrale Nervensystem

Glossar

2'-F	Kommerziell eingesetzte Modifikation, 2'-fluoro Substitution an der 2'-Position der Ribose eines Oligonukleotides.
2'-OMe	Kommerziell eingesetzte Modifikation, 2'-O-methyl Substitution an der 2'-Position der Ribose eines Oligonukleotides.
2'-MOE	Kommerziell eingesetzte Modifikation, 2'-methoxyethyl Substitution an der 2'-Position der Ribose eines Oligonukleotides.
5-MC	Kommerziell eingesetzte Modifikation, 5-Methylcytosine, ein Derivat der Nukleinbase Cytosin.
5-MU	Kommerziell eingesetzte Modifikation, 5-Methyluridine, ein Derivat der Nukleinbase Uridin.
Carriersystem	Ein Trägersystem, in diesem Bericht wird der Begriff genutzt, um Systeme, die den Transport und die Aufnahme von mONs fördern zu beschreiben.
Exon	Abschnitt eines Gens, der nach dem Spleissen die nötige Information für die Erzeugung eines Proteins beinhaltet.
Heteroduplex	Doppelsträngiges Nukleinsäuremolekül, bestehend aus zwei unterschiedlichen Nukleinsäuresträngen.
Hybridisieren	Das Binden von komplementären (auch modifizierten Oligo-) nukleinsäureketten.
Pharmaka	Substanzen, welche eine biologische Wirkung auf den Körper haben. Schliesst Medikamente ein.
Therapeutika	Substanzen für die gezielte Behandlung von Krankheiten.
intrathekal	Liquorraum zwischen dünnen Gewebeschichten, welche Gehirn und Rückenmark umgeben.
Lewissäure	Chemische Verbindung, die fähig ist, ein Elektronenpaar aufzunehmen und somit als Elektronenpaar-Akzeptor fungiert.
mutagen	Wirkungen die zu einer dauerhaften Veränderungen im Erbgut (DNA) führen.
Polymerase	Enzym verantwortlich für die Synthese von Polymeren, insbesondere DNA und RNA.
PS	Kommerziell eingesetzte Modifikation, Phosphorothioate, Einbringen eines Schwefelatoms in den Phosphodiester von Oligonukleotiden.
PMO	Kommerziell eingesetzte Modifikation, Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligonukleotide, Rückgratmodifikation von Oligonukleotiden.
Nukleosid	Ein organisches Molekül, bestehend aus Nukleobase und Ribose.
Nukleotid	Ein organisches Molekül bestehend aus Nukleobase, Pentose und einer Phosphatgruppe.

Quencher	Eine Substanz, die ein Fluoreszenzsignal unterdrückt oder abschwächt.
Spleissprozesse	Bei Eukaryonten vorkommender Prozess der prä-mRNA- Verarbeitung, das durch das Spleissosom geleitet wird.
subkutan	Medizinischer Begriff, Injektion unter der Haut.
toxisch	Giftige oder schädliche Eigenschaften eines Stoffes
genotoxisch	Schädigende Wirkung eines Stoffes auf die DNA in der Zelle
vitreal	Medizinischer Begriff, das Auge betreffend.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Motivation und Ziele

RNA-Technologien ermöglichen die gezielte Regulation der Genexpression.¹ Dieser Umstand macht RNA-Technologien attraktiv für die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen. Medizinische Behandlungsansätze mittels RNA-basierte Therapien sind schon länger bekannt und darauf basierende Therapeutika wurden vor knapp 30 Jahren als Arzneimittel erstmals zugelassen. Durch chemische Modifikationen von Nukleinsäuren in Nukleinsäureketten entstehen sogenannte modifizierte Oligonukleotide (**mONs**), die stabilisiert bzw. so verändert sind, dass sie intakt und effizient an ihre Wirkorte in Organen wie Gehirn, Herz und Lunge gelangen können. Methodische Fortschritte bei der Herstellung chemisch veränderter Nukleotidsequenzen haben zu einer stetigen Zunahme der Entwicklung von sogenannten RNA-Therapien geführt.^{2–11}

Da Oligonukleotide im Sinne einer Anwendung als Arzneimittel für neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Products, ATMP)¹² als biologisch aktives, genetisches Material gelten, ist abzusehen, dass die therapeutische Anwendung von mONs in der Schweiz eine Analyse ihrer Umweltrisiken für eine Zulassung voraussetzen. Grundlage hierfür sind u.a. Artikel 35 der Verordnung über klinische Versuche (KlinV),¹³ Artikel 81 der Arzneimittelverordnung (VAM),¹⁴ Artikel 6 der Freisetzungsverordnung (FrSV)¹⁵ sowie die in verschiedenen Schweizer Verordnungen aufgerufenen Europäischen Direktiven und Richtlinien. Umweltrisikoplanungen, wie sie neben der EU auch in den USA und Japan für die Zulassung von *unmodifizierten* Oligonukleotidsequenzen in Gentherapien angewendet werden, beruhen auf einer Beurteilung der Therapeutika als genetisch modifizierte Organismen. Diese werden typischerweise vor der Durchführung klinischer Studien erstellt.¹⁶ Das Anwenden dieser Abschätzungsverfahren für mONs würde aber darüber hinwegsehen, dass mONs zusätzlich chemisch veränderte Substanzen sind und daher auch anthropogene Chemikalien darstellen. Aus diesem Grund ist aktuell unklar, wie Umweltrisikoplanungen von mONs gestaltet werden müssen. Einerseits enthalten mONs genetische Information, die über Transkription in biologische Prozesse eingreifen und deshalb ein Biosicherheitsrisiko darstellen können. Andererseits sind mONs Chemikalien, deren Umweltrisiko anhand von Eigenschaften wie Stabilität (und mitunter Persistenz) und Toxizität

zu prüfen sind.

Sowohl über die Transport- und Transformationsprozesse, welche die Persistenz bestimmen, als auch über die verschiedenen (öko)toxikologischen Wirkmechanismen von mONs ist aktuell sehr wenig bekannt. Gleiches gilt für die Eintragsmengen von mONs in die Umwelt, welche möglicherweise über Abfallströme bei der Produktion (z.B. Industrieabwasser) und durch Ausscheidungen von Patienten während klinischer Behandlungen (z.B. über Spitalabwässer) zustande kommen. Anwendungen von RNA-Technologien in der Landwirtschaft, wie mit sogenannten RNAi-Pestiziden,^{17–19} können als Grundlagen für eine Bewertung des Verhaltens von Nukleotidsequenzen in der Umwelt genutzt werden. Allerdings ist aktuell unerforscht, ob und wie Informationen über solche *unmodifizierte* Nukleotidsequenzen für Betrachtungen von mONs, die verschiedene chemische Modifikation aufweisen, anwendbar sein könnten.

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Studie ist deshalb, wissenschaftliche Konzepte für Umweltrisikoplanalysen von chemisch modifizierten Oligonukleotiden aus medizinische Anwendungen (RNA-Therapien) zu identifizieren und zu beschreiben. Diese Konzepte sollen in nachgelagerten Studien die Ausarbeitung von Grundlagen ermöglichen, welche schliesslich in Zulassungsverfahren für therapeutisch eingesetzte mONs zu Anwendung kommen. Die spezifische Ziele dieser Studie, wie sie in Auftrag Nr. 110017262/8T10/00.5004.PZ/0026 des Bundesamts für Umwelt und dessen Abteilung Boden und Biotechnologie definiert wurden, sind wie folgt:

- (1) Identifikation von Kriterien für die Auswahl von therapeutisch eingesetzten bzw. potentiell einsetzbaren, chemisch modifizierten Oligonukleotiden, die einer Umweltrisikoplanalysen unterliegen sollten.
- (2) Beschreibung der chemischen und biologischen Prozesse, welche die Verteilung, Bioverfügbarkeit, und Stabilität (und damit möglicherweise Persistenz) von mONs in relevanten Umweltkompartimenten bestimmen.
- (3) Beschreibung der Prozesse, die für eine Abschätzung der Aufnahme von mONs in Mikroorganismen und ggf. anderer aquatischer Organismen sowie der toxikologischen Effekte von mONs auf Nicht-Zielorganismen wichtig sein können.
- (4) Zusammenstellung der Wissenslücken aus Punkten (2) und (3) sowie Ableitung von Empfehlungen für weiterführende Arbeiten.

1.2 Vorgehen, Methodik und Aufbau des Berichts

Die spezifischen Ziele wurden in dieser Studie in drei Schritten umgesetzt, die sich im Aufbau dieses Berichtes widerspiegeln. Kapitel 2 und 3 beinhalten die Identifikation der Kriterien für die Selektion von relevanten mONs (Ziel 1). Grundlage hierfür ist die weit verbreitete Einteilung der mON anhand von fünf prinzipiellen molekularbiologischen Wirkmechanismen im menschlichen Organismus.^{1,3,4,6,7,20–22} Diese Einteilung ist in der Fachliteratur ausführlich beschrieben und wird in dieser Arbeit am Schluss dieser Einführung (Kapitel 1.3) kurz zusammengefasst.

Sie ist für Umweltrisikooanalyse teilweise relevant im Bezug auf die Abschätzung potentieller (öko)toxikologischer Effekte.

Wichtiger für die Elemente der Umweltrisikooanalyse, insbesondere die Beschreibung der Exposition von mONs in der aquatischen Umwelt und ihrer Effekte, ist eine systematische Betrachtung ihrer Strukturelemente und deren chemische Modifikationen. Diese Information wurde anhand der medizinischen und (bio)chemischen Literatur in Kapitel 2.1 und 2.2 zusammengestellt. Sie erlaubt es, neben der Betrachtung von mON-Strukturen von zugelassenen Therapeutika auch über Strukturen von theoretisch möglichen mONs zu spekulieren. Gängige Verabreichungsformen für den Transfer von mONs zum medizinisch relevanten Wirkort im Organismus werden in Kapitel 2.3 beschrieben. Der Einfluss der Verabreichungsformen auf Vorkommen und Wirkung von mONs in der Umwelt wird in diesem Bericht nur konzeptionell behandelt, weil dieses Thema zu umfangreich ist, um in dieser Studie abgedeckt zu werden.

Anhand der Systematik der Strukturelemente wurden die Dossiers von zugelassenen mON Therapeutika von verschiedenen Zulassungsbehörden (Swissmedic, European Medicines Agency (EMA), US Food and Drug Administration (US-FDA)) analysiert. Diese Information wurde in einer Datenbank zusammengeführt. Die Datenbank ermöglicht, Zusammenhänge von Wirkmechanismen, Typus und Anzahl der modifizierten Strukturelemente, Verabreichungsformen und, soweit vorhanden, -mengen sichtbar zu machen. Die Analyse der aktuell zugelassenen Therapeutika erfolgt in Kapitel 2.4 und ermöglicht es uns, Ziel (1) des Projektes zu erreichen.

Mit der Diskussion von Wirkmechanismen von mONs und deren modifizierten Strukturelementen beschreibt die medizinische Literatur implizit Eigenschaften von mONs, welche auch für deren Exposition und Wirkung in der Umwelt relevant sein können. Diese Information diene als Grundlage, auf der in dieser Studie ein Konzept für die Umweltrisikooanalyse von mONs vorgeschlagen wird. Weil die mögliche Anzahl und Kombination von chemischen Modifikationen von mON, wie in Kapitel 2 beschrieben, gross und über Exposition und Effekte von mONs in der Umwelt kaum etwas bekannt ist, wurde ein Vorgehen gewählt, das es erlaubt, mit fehlendem Wissen umzugehen. Dieser Ansatz ist in Kapitel 3 beschrieben und sieht vor, aufgrund von bekannten Eigenschaften natürlicher Oligonukleotide auf diejenigen von mONs zu schliessen.

Auf der Grundlage des Konzepts von Kapitel 3 wurden schliesslich Emissionen, sowie Prozesse und Mechanismen für die Abschätzung von Exposition und Effekten von mONs in Kapitel 4 bis 6 nach Stand des Wissens aufgearbeitet. Die Beurteilung von Emissionen und Exposition einerseits und Effekten andererseits entspricht oben genannten Zielen (2) bzw. (3). Hierbei fokussierten wir im Bezug auf die Grundlagen der Expositionsabschätzung auf Prozesse, die in Abwasserreinigungsanlagen (ARA) ablaufen können, da mONs aus klinischen Anwendungen über Abwässer im Normalfall in ARA gelangen dürften. Das Wissen über toxische, genotoxische und mutagene Effekte von mON stammt aus pharmakologischen Studien. Wir fassen diese Erkenntnisse zusammen, kategorisieren diese und stellen Überlegungen zur Übertragbarkeit auf ökotoxikologische Fragestellungen an. Aufgrund des geringen Wissens über mONs in der Umwelt ist die Prozessbeurteilung unsicher und nur in verallgemeinernder (und oftmals deduktiver) Form möglich. Dieser Umstand macht eine Unterscheidung von Prozessen in verschiedenen Umweltkompartimenten wie ARAs, Fließgewässer oder Böden momentan obsolet. Schliesslich ana-

lysieren wir die in Kapitel 4 bis 6 identifizierten Kenntnisslücken in Kapitel 7, um Empfehlungen für weitere Studien im Sinne von Ziel (4) abzugeben.

1.3 Chemisch modifizierte Oligonukleotide und deren Wirkmechanismen

Weil physiologische Abläufe im menschlichen Organismus komplexe, miteinander verknüpfte Kaskaden von biochemischen Reaktionen bilden, werden bis dato verschiedene mON-basierte Therapieansätze entwickelt, getestet und eingesetzt. Die Therapieansätzen beruhen auf mON-Kategorien mit unterschiedlichen Wirkmechanismen. Diese Wirkmechanismen unterscheiden sich deshalb auch hinsichtlich der eingesetzten, chemisch modifizierten Nukleotide und somit ihrer chemischen Struktur. Die chemischen Modifikationen beeinflussen die Bindungsaffinität und genetische Zielsequenzen, die Aufnahmewahrscheinlichkeit in Zellen ausgewählter Organe und den Schutz vor Abbau (Nukleasen) des Oligonukleotids.^{6,8} Sie ermöglichen damit eine präzisere und länger anhaltenden Wirkung, um den Therapieerfolg zu ermöglichen. Infolgedessen ist anzunehmen, dass chemische Modifikationen auch eine wichtige Rolle für die Beurteilung von Prozessen spielen, die in der Umweltrisikoaanalyse abgeschätzt werden.^{17,23}

Die Einteilung in mON-Kategorien, welche in diesem Bericht benutzt wird, bezieht sich auf Definitionen des SCNAT-Berichts von Kümmin et al.¹ Sie unterscheidet fünf mON-Kategorien: Gapmers, small interfering RNA (siRNA), microRNA (miRNA), splice-switching oligonucleotides (SSOs) und Aptamere. Fachbegriffe werden in diesem Bericht meist in englischer Sprache verwendet und sind im [Glossar](#) erklärt. Die Wirkmechanismen der mON-Kategorien beruhen auf natürlichen Abwehrmechanismen (RNase H1, RISC), genetischer Regulationsmechanismen (miRNA, Spliceosom) bzw. spezifischer intermolekularer Interaktion aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Biomoleküle.¹⁰ Die fünf mON-Kategorien und ihre Wirkmechanismen sind in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt und werden wie folgt beschrieben:

1. **Gapmers** sind einzelsträngige, modifizierte Oligonukleotidsequenzen. Sie binden (hybridisieren) an komplementäre Zielsequenzen in der mRNA und bilden einen stabilen mON-RNA-Hybrid (Heteroduplex). Die Hybridisierung aktiviert die RNase H1, welche den Heteroduplex erkennt und die Phosphodiesterbindungen des mRNA-Transkripts hydrolysiert.²⁴ Dadurch wird das angestrebte mRNA-Transkript effizient deaktiviert und die damit einhergehende Genexpression unterdrückt.^{10,25}
2. Small interfering RNAs (**siRNA**) bestehen aus zwei modifizierten Nukleinsäuresträngen, dem Guide- und dem Passenger-Strang.^{6,25} Die doppelsträngige Sequenz wird vom RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) erkannt, wobei der Passenger-Strang geschnitten und freigesetzt wird. Der Guide-Strang hingegen bindet an das komplementäre RNA-Gegenstück, wodurch ein RNA-RNA-Hybrid entsteht. Letzteres löst den Abbau der Zielsequenz durch das Ago2-Enzym aus.
3. Micro RNA (**miRNA**) besteht aus kurzer, nicht kodierender RNA, die in Eukaryonten

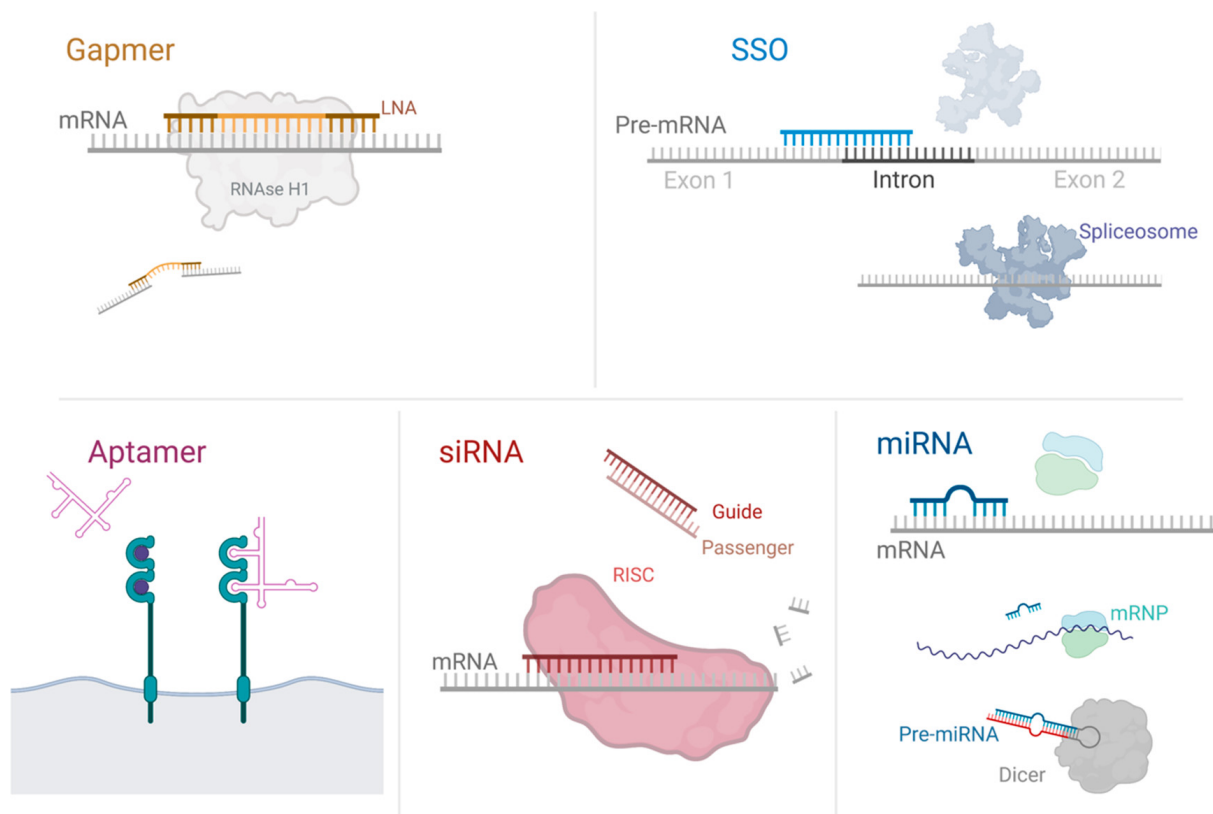


Abbildung 1.1 Einteilung von mONs in fünf Kategorien mit unterschiedlichen Wirkmechanismen. Gapmers binden an mRNA-Transkripte und das Enzym RNase H1 hydrolysiert die Sequenz. Splice-Switching Oligonucleotides (SSOs) beeinflussen das Spliceosom und das Schneiden der pre-mRNA. Aptamere binden aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur an ausgewählte Zielproteine und steuern so deren Aktivität. Small interfering RNA (siRNA) nutzen den RNA-inducing silencing complex (RISC), um genetische Zielsequenz auszuschalten. MicroRNA (miRNA) bindet an komplementäre messenger-RNA (mRNA). Der daraus hervorgehende Duplex induziert das Schneiden der Zielsequenz. Abbildung aus Bost et al.¹⁰ (CC-BY 4.0)

den Abbau von ausgesuchter mRNA initiieren. Diese mON Kategorie wird in Anti-miRNA und mimic-miRNA eingeteilt. Die Anti-miRNA bindet an eine vorhergesehene komplementäre endogene miRNA Sequenz und wird vom RISC analog zur siRNA abgebaut. Im Gegensatz dazu "imitiert" die mimic-miRNA bereits bestehende miRNA, was zu einer Förderung der Genexpression führt.^{2,11}

4. Splice-Switching-Oligonukleotides (SSOs) sind darauf ausgelegt, die Spleissprozesse zu beeinflussen, ohne direkt an das komplementäre Transkript zu binden. Stattdessen blockieren sie gezielt die Spleissstelle des Spliceosoms. Das Spliceosom ist dafür verantwortlich, Introns (d.h. nicht-kodierende Sequenzen) aus einem pre-mRNA-Transkript zu entfernen und die Exons (kodierende Sequenzen) miteinander zu verbinden. Dies führt dazu, dass Elemente in Introns und Exons entweder verstärkt oder unterdrückt werden, wodurch die Genexpression gezielt beeinflusst werden kann.^{2,6}
5. **Aptamere** sind Einzelsträngige Oligonukleotide, die aufgrund ihrer Tertiärstruktur spezi-

fische intermolekulare Wechselwirkungen mit Zielmolekülen, insbesondere Proteinen, eingehen und gezielt deren Inhibition oder Aktivierung modulieren.

Aufgrund ihrer Komplementarität zur genetischen Zielsequenz werden die einzelsträngigen mONs der Kategorien 1 sowie 3 bis 5 unter dem Begriff “antisense oligonucleotides” (**ASOs**) zusammengefasst und von doppelsträngiger siRNA unterschieden. Trotz dieser strukturellen Unterscheidung der Kategorien sind ASOs und siRNA Teil der sog. “antisense drugs” und “antisense technology”. ^{4,5,11,22}

Kapitel 2

Einteilung und Systematik von modifizierten Oligonukleotiden

2.1 Chemisch modifizierte Oligonukleotide

Gängige Einteilungen von mONs für therapeutische Anwendungen orientieren sich an deren Wirkmechanismen, so dass typischerweise fünf Kategorien wie in Kapitel 1.3 unterschieden werden. Diese Systematik eignet sich allerdings nicht für eine Beurteilung des Umweltverhaltens, insbesondere der Exposition und der Effekte auf Nicht-Zielorganismen. Letztere beruhen auf den molekularen Wechselwirkungen und (bio)chemischen Reaktionen von mONs bzw. ihrer Strukturelemente mit anorganischen Spurenstoffen in gelöster Form bzw. mit organischen oder mineralischen Partikeln und organischen (Bio)Molekülen. Als Grundlage für die Einschätzung des Umweltverhaltens beschreiben wir hier die möglichen Variationen der Strukturelemente (Kapitel 2.1), wie diese in den fünf mON-Kategorien verwendet werden können (Kapitel 2.2) und welche Verabreichungsformen dafür existieren (Kapitel 2.3). Anhand dieser systematischen Einteilung analysieren wir anschliessend die bis heute zugelassenen mON-basierten Wirkstoffe und evaluieren die Strukturen und deren Anteil an bisher verwendeten chemischen Modifikationen (Kapitel 2.4).

Allen mONs liegen chemische Veränderungen zugrunde, welche an fünf verschiedenen Strukturelementen der Nukleotideinheit vorgenommen werden können. Diese Strukturelemente sind in Abbildung 2.1) dargestellt. Sie umfassen (1) den Phosphodiester, (2) die Zuckereinheit, (3) die Substituenten an der 2' Position der Zuckereinheit, (4) die Base und (5) das Rückgrat der Nukleinsäure (Phosphodiester und Ribose). Im Rahmen dieses Projektes wurden über 60 strukturelle Modifikationen identifiziert, die im medizinisch-therapeutischen Kontext diskutiert bzw. bereits verwendet werden. Diese chemischen Modifikationen sind in der Datenbank für modifizierter Oligonukleotide (inkl. Verweise auf wissenschaftliche Literatur), der sogenannten mON-Datenbank,²⁸ für dieses Projekt systematisch zusammengestellt (siehe Anhang A.1 für eine Beschreibung des Aufbaus der mON-Datenbank). Welche Strukturelemente in einem mON modifiziert vorliegen, hängt von den fünf Kategorien bzw. der damit einhergehenden Wirkmechanismen ab. So können beispielsweise modifizierte Strukturelemente in doppelsträngiger

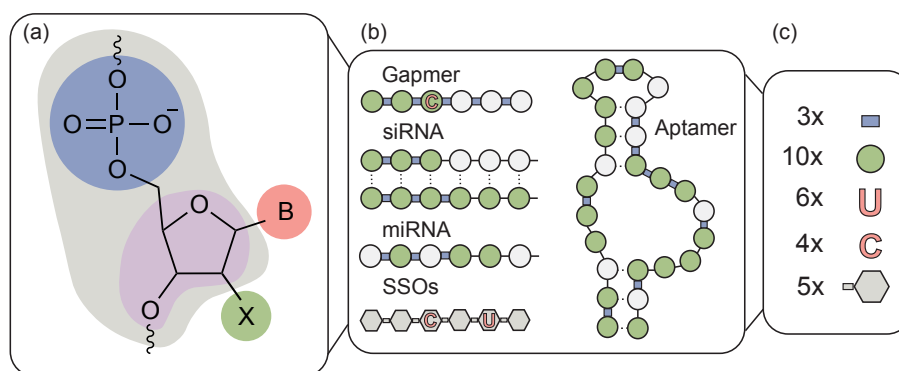


Abbildung 2.1 Grundlagen für die systematische Einteilung von chemisch modifizierten Oligonukleotiden (mONs) anhand (a) der Variationen der Strukturelemente (Phosphodiester (blau), Ribose (violett), Base (rot), Substituenten an der 2'-Position der Zuckereinheit (grün) und Nukleotid-Rückgrat (grau)), (b) Kombination von modifizierten Strukturelementen in den typischen fünf mON-Kategorien. Die farblich hervorgehobenen Nukleotide beziehen sich auf mögliche Modifikationen an den in Panel (a) gezeigten Strukturelementen. (c) Anzahl der eingesetzten Modifikationen mit symbolischer Darstellung für modifizierte Nukleotide aus Panel (b). U (Uridin) und C (Cytidin) stehen illustrativ für mögliche Modifikationen der Basen durch Methylierung von Cytosin und Uracil (Bsp. 5-MU oder 5-MC). Darstellung und Farbcodes basieren auf Zusammenstellungen aus Referenzen^{5,10,26,27}, die hier graphisch und farblich angepasst und weiterentwickelt wurden.

siRNA anders eingesetzt werden, als in einzelsträngigen ASOs (Gapmers, miRNA, SSO und Aptamere). Schliesslich können sich modifizierte Oligonukleotide auch in der Anzahl chemischer Modifikationen unterscheiden.

2.1.1 Strukturelle Modifikationen des Phosphodiesters

Die Abspaltung von Nukleotiden einer Oligonukleotidkette erfolgt durch hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindungen. Diese Hydrolyse wird durch Exo- und Endonukleasen katalysiert.²⁹ Dieser Abbau kann jedoch durch verschiedene Modifikationen an nicht-brückenbildenden Sauerstoffatomen (sog. non-bridging oxygen atoms) des Phosphodiesters verlangsamt werden. Abbildung 2.2 zeigt die bekannten Phosphodiester-Modifikationen.^{2,5,8,11,27,30–32} Die gängigste Modifikation des Phosphodiesters ist der Phosphothioester (phosphorothioate (PS)^{2,5,8,11,31,32}). Als weitere Substitutionen eines Sauerstoffatoms wurden funktionelle Gruppen wie Borhydrid und Hydroxyacetat vorgeschlagen (boranophosphate (BP)^{31,32} und phosphoacetate (PACE)³¹). Mehrfachsubstitutionen kombinieren den Einsatz eines Schwefelatoms mit Alkylgruppen, weiteren Schwefel- oder Stickstoffatomen (phosphorodithioate (PS₂),^{30,32} thiophosphoramidate (NP),^{2,31} methylphosphonate (MP)^{30,32} und methoxypropylphosphonate (MOP)).³⁰

Die Konsequenzen der Phosphodiestermodifikationen sind hauptsächlich für PS Modifikationen beschrieben. Diese umfassen eine erhöhte Stabilität gegenüber Nukleasen^{6,34} und eine verbesserte Bindung des mONs an Serumproteine. PS-mONs haben dadurch eine höhere Halbwertszeit in Plasma und Geweben von ca. 2-3 Tagen.^{8,26} Diese Modifikationen werden von den Scavenger-Rezeptoren (STAB1 und STAB2) erkannt^{5,8,35} und ermöglichen die Aufnahme in Zellen ohne Elektroporation oder Transfektion.³⁶ Die geringere Bindungsaffinität von PS-mONs

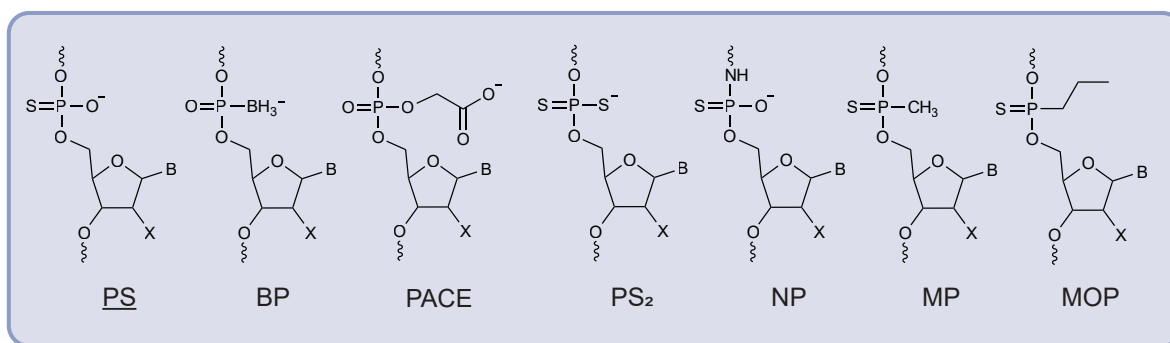


Abbildung 2.2 Sieben aktuelle bekannte Modifikationen der Struktureinheit des Phosphodiesters.²⁸ Unterstrichene Abkürzungen bezeichnen Modifikationen, welche in zugelassenen Therapeutika verwendet werden. PS: phosphorothioate, BP: boranophosphate, PACE: phosphonoacetate, PS₂: phosphorodithioate, NP: thiophosphoramidate, MP: methylphosphonate, MOP: methoxypropylphosphonate.^{2,5,8,11,27,30–33}

an ihre bestimmte Zielsequenz wird mit weiteren Modifikationen am Zucker ausgeglichen. Vergleichbare Evaluationen für die weiteren Beispiele für Modifikationen der Phosphodiester in Abbildung 2.2 fehlen. Unlängst wurde auch festgestellt, dass die Nukleaseresistenz von Modifikationen an nicht-bindenden Liganden des Phosphors (PS und Phosphoryl-guanidine) durch Verwendung stereochemisch reiner Isomere erhöht werden kann.^{37–39} Auf diese Form der strukturellen Modifikation wird bei der Beschreibung der allgemeinen mON-Modifikationen nicht speziell eingegangen.

2.1.2 Erweiterte Ribose Analoga

Die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Nukleinsäuresträngen wird unter anderem durch die Konformation der Ribose beeinflusst.³¹ Daher modulieren Ribosemodifikationen die Bindungsaffinität zu komplementären Nukleinsäuresträngen, die resultierende Konformation der Duplexstränge und, infolgedessen, ihre Interaktionen mit Enzymen.^{31,40} Das Spektrum von strukturellen Modifikationen in Abbildung 2.3 umfasst einerseits die Erweiterung der Ringsysteme. Beispiele dafür sind zahlreich, darunter die Expansion der Ribosen zu Sechsringen (hexitol nucleic acid (HNA),^{27,31,32} altritritol nucleic acid (ANA),^{8,31,32} 3'-fluorohexitol nucleic acid (FHNA),^{8,31} und cyclohexane nucleic acid (CeNA))³¹ und Siebenringen (oxepane nucleic acid (ONA)).³¹ Weitere Modifikationen beinhalten nicht-zyklische Ribosen (unlocked nucleic acid (UNA)^{8,27} oder glycol nucleic acid (GNA)),³⁰ erweiterte Ringe (tricyclo DNA (tc-DNA))^{5,8,11,31,32} und die Substitution des Sauerstoffatoms an der 1'-Position der Ribose zu einem Schwefelatom (2'-deoxy-2'-thioribonucleic acid (S-RNA)^{31,32} und 2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinonucleic acid (S-FANA)).³¹ Über die Nukleaseresistenz von Ringerweiterungsmodifikationen (HNA, ANA, FHNA, CeNA und ONA) und deren Konsequenz für eine Aufnahme ins Gewebe ist wenig be-

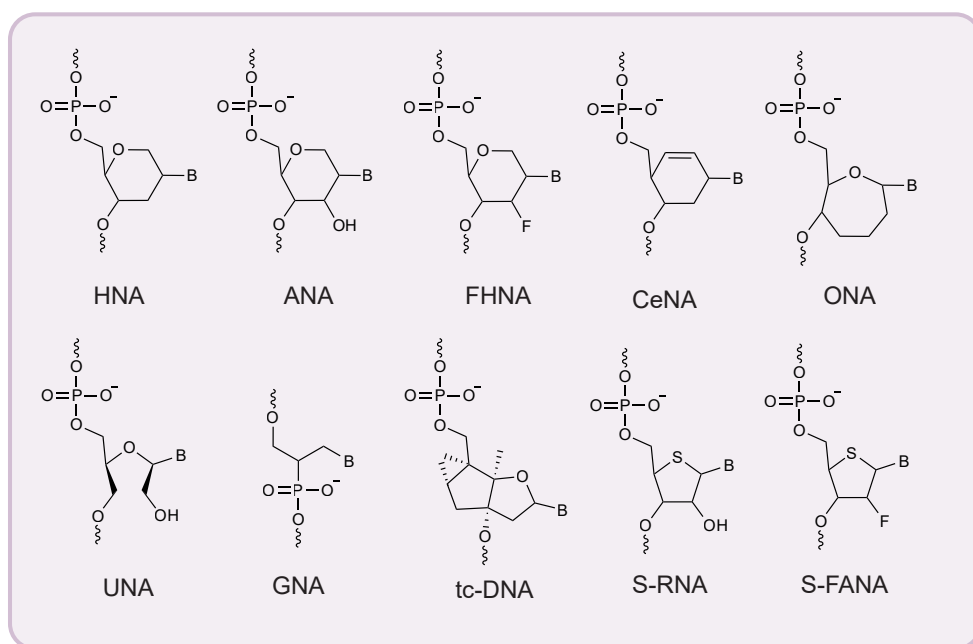


Abbildung 2.3 Zehn mögliche Ribosemodifikationen²⁸ aufgeführt als, HNA: hexitol nucleic acid, ANA: altritol nucleic acid, FHNA: 3'-fluorohexitol nucleic acid, CeNA: cyclohexane nucleic acid, ONA: oxepane nucleic acid, UNA: unlocked nucleic acid, GNA: glycol nucleic acid, tc-DNA: tricyclo DNA, S-RNA: 2'-deoxy-2'-thioribonucleic acid, S-FANA: 2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinonucleic acid.^{5,8,11,27,30,32} Keine der Ribose Analoga wird bisher in zugelassenen Therapeutika verwendet.

kennt. Die Präsenz von ONA und CeNA Modifikationen tragen zur Rekrutierung der RNase H1 bei.³¹ Derzeit werden keine der zehn Zuckermodifikationen in kommerziellen Therapeutika genutzt.

2.1.3 Modifikationen am Nukleotid Rückgrat

Modifikationen am Rückgrat der Oligonukleotidpolymere zwischen Phosphatgruppe und der Zucker-Funktionalität ergänzen die Modifikationen des Nukleinsäurerückgrats, um die Reaktionen mit Nukleasen weiter einzuschränken. Sieben gängige Modifikationen sind in Abbildung 2.4 dargestellt. Die Phosphorodiamidat Funktion mit erweitertem Sechsring (phosphorodiamidate morpholino (PMO))^{2,5,11,31,32} oder das Peptidrückgrat (peptide nucleic acid (PNA)) sind die häufigsten in der Literatur beschriebenen Rückgratmodifikationen.^{5,31,32} Des Weiteren ergibt sich auch die Veränderung der 5'-C Position mit einer Methylgruppe (5'-C-methyl with phosphate (5'-PC))⁸ oder eines Vinylphosphonates (5'-(E)-vinylphosphonate (5'-(E)-VP)).^{11,27,30} Weitere Möglichkeiten ergeben sich durch das Ersetzen des Phosphodiesters mit einem Ether (Formacetal (FA)), einem Methylene(methylimino) (MMI)) oder einem Amid (amide-linked (AL)).^{11,31,32}

Während die Modifikationen mit geringerer sterischer Auswirkung (5'-PC und 5'-(E)-VP) eher die Aktivierung des RISC begünstigen,^{8,11,30} werden PMOs und PNAs als sterische Blocker genutzt.^{5,31,41,42} Die inter-nukleotidische Bindung des PMOs stabilisiert gegen viele bekannt-

te Nukleasen,^{6,43} ohne Verluste in der Bindungsaffinität des mONs. Ähnliches gilt für PNA-mONs.⁴⁴ Zusätzlich verhindert die neutrale Ladung des Rückgrats elektrostatische Bindung von PMO-mONs an Proteine.⁴⁵ PMO-mONs werden daher schlechter ins Gewebe aufgenommen und in höheren Dosierungen eingesetzt.^{6,32,41}

2.1.4 Modifikationen an der 2'-Position der Ribose

Modifikationen der 2'-Riboseposition wirken sich wie Ribose-Analoga (Kapitel 2.1.2) auf die Konformationen der Ribose und somit Bindungsaffinität bzw. Proteininteraktionen aus.³¹ Durch diese Modifikationen wird die Faltung des Zuckerrings gezielt verändert, um die Wirkungsweise der mON zu steuern. Ribose-Analoga mit C2'-endo bzw. C3'-exo-Konformationen begünstigen die Rekrutierung der RNase H1.^{22,46} Andererseits unterbinden C3'-endo-Konformationen, wie sie in dsDNA und dsRNA vorherrschen die Rekrutierung der RNase H1, begünstigen aber die Aktivität des RISC.^{31,47} Generell gilt, dass elektronegative Substituenten in der 2'-Position zu einer C3'-endo Konformation des Zuckers führen und somit die Bindungsaffinität der mONs an Zielsequenzen verbessern.⁴⁸ Zusätzlich erhöhen die 2'-Modifikationen die Nukleaseresistenz und die Lipophilie und somit Aufnahme der mONs.^{49,50}

Abbildungen 2.5 und 2.6 zeigen Nukleotidstrukturen mit verschiedenen 2'-Substituenten. Die Anzahl der in Literatur vorgeschlagenen Zuckerrest-Modifikationen ist besonders gross (siehe auch Zusammenstellung in Wan and Seth³²). Drei häufig genannte 2'-Modifikationen sind 2'-fluoro (2'-F),^{2,5,8,11,27,30-32} 2'-O-methyl (2'-OMe),^{4,6,8,10,11,27,31} und 2'-O-methoxyethyl (2'-MOE).^{4,6,8,10,11,27,31} Alle führen zu einer C3'-endo-Konformation der Ribose,⁴⁸ welche dadurch die Bindungsaffinität des mON an Zielsequenzen erhöhen. Die 2'-OMe und 2'-MOE Modifikationen schützen vor Abbau durch Nukleasen,⁵¹ nicht aber die 2'-F Modifikation.² Weitere Modifikationen in 2'-Position und deren Abkürzungen sind 2'-Azido,³¹ 2'-O-Allyl,³¹ 2'-O-[2-(methylamino)-2-oxyethyl] (NMA),¹¹ 2'-O-benzyl (2'-O-B),³⁰ 2'-O-methyl-4-pyridine (2'-OMe-

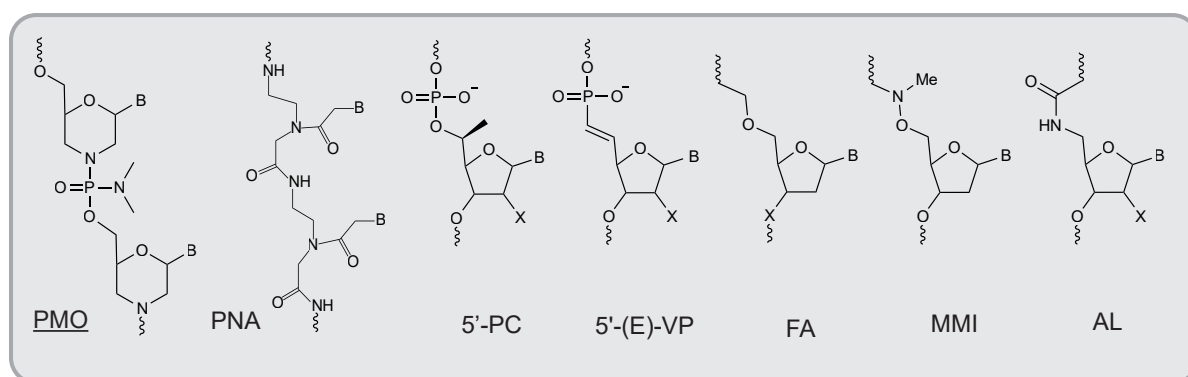


Abbildung 2.4 Sieben bekannte Rückgratmodifikationen von mONs.²⁸ Unterstrichene Abkürzungen bezeichnen Modifikationen, welche in zugelassenen Therapeutika verwendet werden. PMO: phosphorodiamidate morpholino oligo, PNA: peptide nucleic acid, 5'-PC: 5'-C-methyl with phosphate, 5'-(E)-VP: 5'-(E)-vinylphosphonate, FA: formacetal, MMI: methylene(methylimino) und AL: amide-linked.^{2,5,8,11,27,30,31}

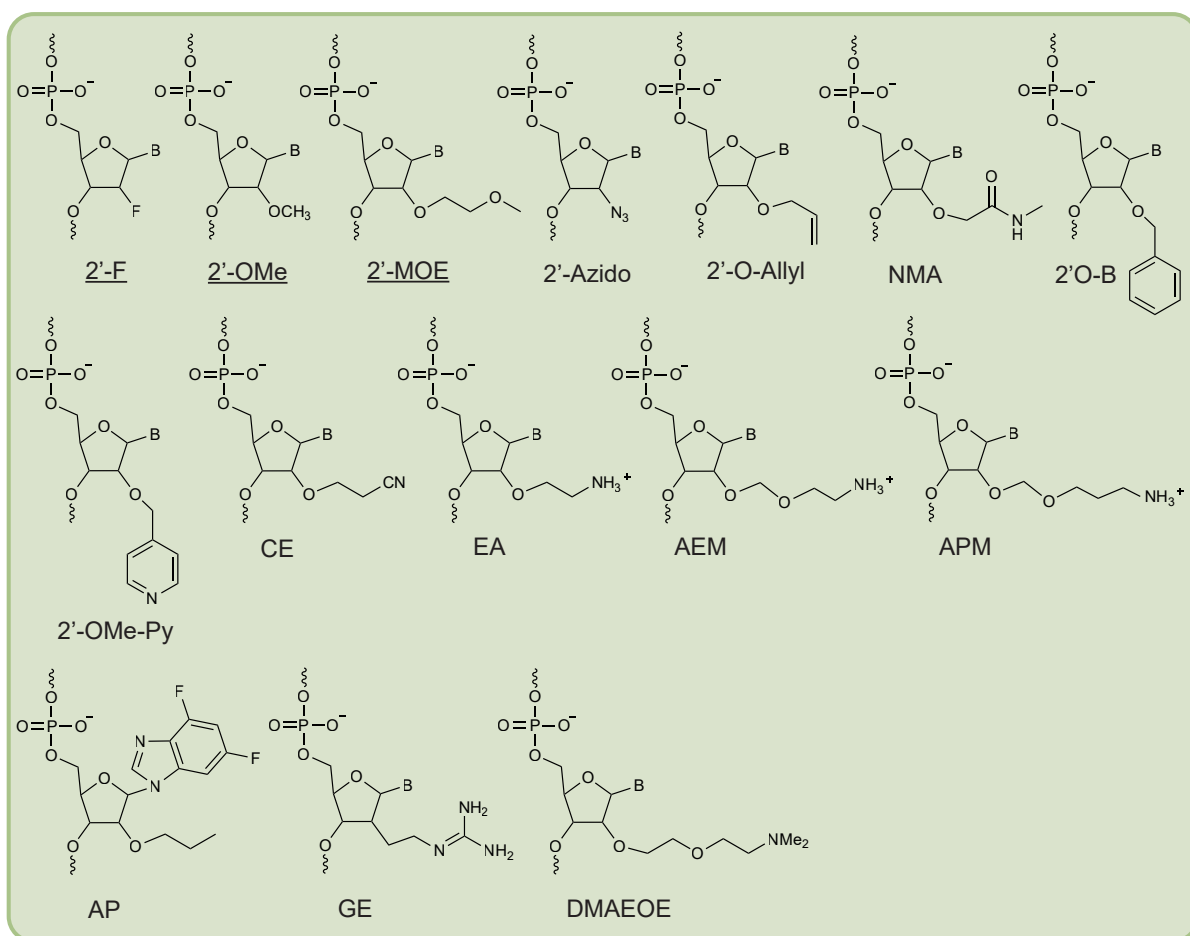


Abbildung 2.5 Auswahl von 15 Modifikationen der 2'-Position der Ribose (ohne Angaben stereochemischer Zentren; B steht für Base).²⁸ Unterstrichene Abkürzungen bezeichnen Modifikationen, welche in zugelassenen Therapeutika verwendet werden. 2'-F: 2'-fluoro, 2'-OMe: 2'-O-methyl, 2'-MOE: 2'-O-methoxyethyl, 2'-Azido: 2'-azido, 2'-O-Allyl: 2'-O-allyl, NMA: 2'-O-2-(methylamino)-2-oxyethyl, 2'-O-B: 2'-O-benzyl, 2'-OMe-Py: 2'-O-methyl-4-pyridin, CE: 2'-cyanoethyl, EA: 2'-aminoethyl, AEM: 2'-aminoethoxymethyl, APM: 2'-aminopropoxymethyl, AP: 2'-aminopropyl, GE: 2'-guanidinoethyl, DMAEOE: 2'-O-2-[(N,N dimethylamino)oxy]ethyl.^{2,4,5,8,11,26,27,30,31}

Py),^{30,32} 2'-cyanoethyl (CE),^{27,31} 2'-aminoethyl (EA),^{27,31} 2'-aminoethoxymethyl (AEM),²⁷ 2'-aminopropoxymethyl (APM),²⁷ 2'-aminopropyl (AP),^{11,27} 2'-guanidinoethyl (GE) und 2'-O-2-[2-(N,N)-dimethylaminoethoxy]ethyl (DMAEOE).^{11,27}

Andere Modifikationen schränken die konformationelle Flexibilität des Zuckerrings durch zusätzlich Ringbildung, meist mittels Substituenten der C2' Position und des C4'-Kohlenstoffs, ein (sog. constrained nucleic acids) und erhöhen die chemische Stabilität der mONs. Beispiele sind in Abbildung 2.6 gezeigt und umfassen locked nucleic acid (LNA),^{5,8,22,31,32} oxetane-LNA (OX),^{27,31} ethylene-bridged nucleic acid (ENA),^{5,32} 2',4'-carbocyclic-LNA (CLNA),²⁷ 2',4'-carbocyclic-ENA (CENA),^{27,31} 2'-deoxy-2'-N,4'-C-ethylene-LNA (AENA),²⁷ constrained bridged nucleic acid (cEt),^{2,5,31,32} 2'-N-adamantylmethylcarbonyl-2'-amino-LNA (ADA)²⁷ und 2'-N-pyren-1-ylmethyl-2'-amino-LNA (PYR).²⁷

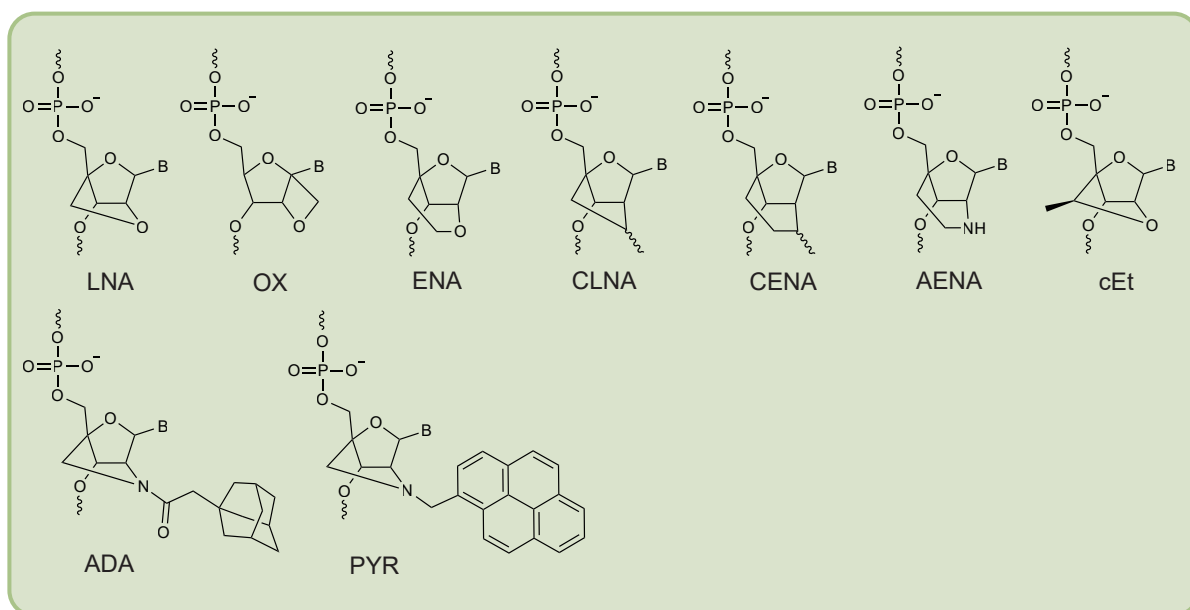


Abbildung 2.6 Neun Modifikationen an der 2'-Position, die zu sogenannten "constrained" bzw. "locked" nucleic acids führen.²⁸ LNA: locked nucleic acid, OX: oxetane-LNA, ENA: ethylene bridged nucleic acid, CLNA: 2',4'-carbocyclic-locked nucleic acid, CENA: 2',4'-carbocyclic-ENA-locked nucleic acid, AENA: 2'-deoxy-2'-N,4'-C-ethylene-LNA, cEt: constrained bridged nucleic acid, ADA: 2'-N-adamantylmethylcarbonyl-2'-amino LNA, PYR: 2'-N-pyren-1-ylmethyl-2'-amino-LNA.^{2,4,5,8,11,26,27,30,31}

2.1.5 Strukturelle Modifikation der Nukleobasen

Modifikationen der Nukleobasen sollen eine Immunabwehr gegen mONs verhindern und erhöhen ihre Nukleaseresistenz.³⁰ Zudem begünstigen modifizierter Nukleobasen die Duplex-Stabilität ohne die Interaktionen nativer Basenpaare zu beeinträchtigen.⁵² Aktuell werden zwei Modifikationen therapeutisch eingesetzt, 5-methyluridine (5-MU)^{5,30,32,52} und 5-methylcytidine (5-MC).^{2,5,31,32,52}

In Abbildung 2.7 sind weitere Modifikationen zusammengestellt. Modifikationen an Pyrimidinen (Cytosin und Uracil) sind pseudouridine (pseudo),^{11,30} 2-thiothymidine (2-thio-dt),^{8,32} 5'-fluoro-2'-deoxyuridine (FdU),³⁰ 2,4-difluorotoluylibonucleoside (rF),³⁰ und C5-thiazole.³² Modifikation der Purine (Adenin und Guanin) sind N-ethylpiperidine 6'-triazole modified adenine (N⁶-(EtPip-Trz)-A),³⁰ 5-nitroindole (5-NI)³⁰ Triazolyphenyl-thymine (5-Ph-Tzt),³² 6-phenylpyrrolocytosine (PhpC),³⁰ 2,6-diaminopurine (DAP),^{4,32} N-ethylpiperidine 7'-EAA triazole modified adenine (EAA-Trz-Pip-A),³⁰ und N6-Methyladenosine (m⁶A).³⁰ In der abasischen Modifikation fehlt die Base vollständig.^{5,31}

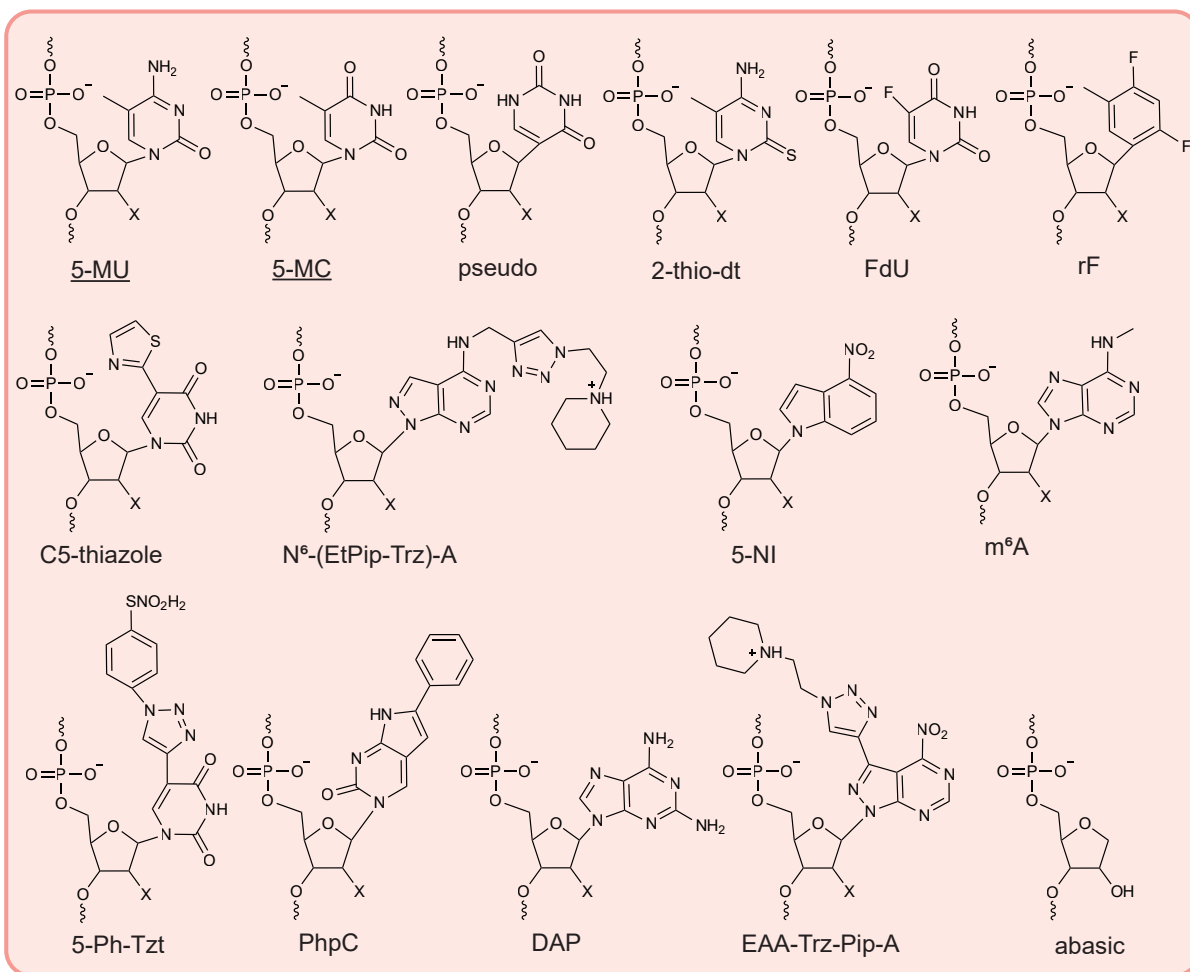


Abbildung 2.7 15 Modifikationen, die an den Nukleobasen vorgenommen werden können.²⁸ Unterstrichene Abkürzungen bezeichnen Modifikationen, welche in zugelassenen Therapeutika verwendet werden. 5-MU: 5-methyluridine, 5-MC: 5-methylcytidine, pseudo: pseudouridine, 2-thio-dt: 2-thiothymidine, FdU: 5-fluoro-2-deoxyuridine, rF: 2,4-difluorotoluylibonucleoside, C5-thiazole: C5-thiazole, N⁶-(EtPip-Trz)-A: N-ethylpiperidine 6'-triazole modified adenine, 5-NI: 5-nitroindole, 5-Ph-Tzt: 5-triazolylphenyl-thymine, PhpC: 6-phenylpyrrolocytosine, DAP: 2,6-diaminopurine, EAA-Trz-Pip-A: N-ethylpiperidine 7'-EAA triazole modified adenine, m⁶A: N6-methyladenosine und abasic: abasic RNA.^{2,5,8,11,30–32}

2.2 Kombinationen chemischer Modifikationen in mON Kategorien

Die Zusammensetzung von therapeutisch eingesetzten mONs ergibt sich in der medizinischen Praxis aus dem Kontext des Therapieansatzes und dem Wirkmechanismus des Produktes. Um später Konzepte für eine Umweltrisikooanalyse von mONs abzuleiten, diskutieren wir hier zuerst typische Zusammensetzungen von mONs *unabhängig* von deren medizinischer Anwendung. Im Anschluss leiten wir aktuell für therapeutische Anwendungen gebräuchliche Kombinationen von Modifikationen für jede Oligonukleotid-Kategorie ab, wie sie in Abbildung 2.8

schematisch zusammengestellt sind. Wie sich die 63, in diesem Bericht und in der mON-Datenbank²⁸ erwähnten Modifikationen auf die fünf mON-Kategorien verteilen kann in der mON-Datenbank/Modifikationen abgerufen werden.

2.2.1 Gapmers

Gapmers sind zur Zielsequenz komplementäre, einzelsträngige Oligonukleotide mit einer typischen Länge von 20 Nukleotiden.⁵ Insgesamt werden 14 verschiedenen chemische Modifikationen im Zusammenhang mit Gapmers erwähnt. Gapmers weisen am Anfang und Ende der Sequenz zwei bis fünf modifizierte Nukleotide auf, die vor Nukleaseabbau schützen und das Binden an gezielte mRNA vereinfachen.^{10,32,48} Änderungen am Anfang und Ende der Sequenz umfassen Modifikationen der 2'-Position der Ribose wie 2'-MOE oder 2'-OMe (Abb. 2.5)^{31,53,54} sowie constrained nucleic acids (Abb. 2.6). Allerdings findet sich bei kommerziell eingesetzten Therapeutika nur die 2'-MOE Modifikationen mit jeweils fünf Einheiten am Anfang und Ende der Sequenz.²⁸ Des Weiteren wurde gezeigt, dass mindestens vier PS-Modifikationen an den Randnukleotiden die Rekrutierung von RNase H über sterische Blockademechanismen begünstigen.⁵³

Die zentralen Nukleotide im namensgebenden "Gap" der Zielsequenz gelten fälschlicherweise als unmodifiziert. Diese weisen Phosphoester-Modifikationen PS auf. Laut Wan and Seth³² können auch Ribosemodifikationen tc-DNA und HNA (Abb. 2.3) und methylierte Nukleobasen wie 5-MU und 5-MC im "Gap" eingesetzt werden. Diese Optionen manifestieren sich auch in den zugelassenen Therapeutika. So finden sich in sieben der acht zugelassenen Gapmers fast vollständig mit PS modifizierte Oligonukleotidrückgrate. Bei einem Oligonukleotid aus zwanzig Nukleotiden sind 11 bis 19 von ihnen mit PS modifiziert.²⁸ Des Weiteren finden sich etwa vier bis sechs Nukleobasenmodifikationen 5-MU bei vier der acht zugelassenen Therapeutika. Sechs von acht zugelassenen Gapmers weisen fünf bis vierzehn 5-MC Modifikationen auf. Andere Modifikationen innerhalb der "Gap"-Region werden nicht angewendet, da die meisten Zucker-Modifikationen die RNase H-Aktivität in der Nähe der Inkorporationsstelle nicht unterstützen.⁵⁵

2.2.2 Small interfering RNA

Small interfering RNA (siRNA) weist eine Länge von 20 bis 25 Nukleotiden auf und ist das einzige doppelsträngige mON. Daher müssen im Vergleich zu einzelsträngigen mON-Kategorien weniger Modifikationen angebracht werden, um beispielsweise die Stabilität zu gewährleisten.^{32,56,57} siRNA kann am guide (antisense) und am passenger (sense) Strang modifiziert werden. Da die beiden Stränge unterschiedliche Aufgaben übernehmen, werden die beiden Stränge unabhängig voneinander modifiziert.³¹ Eine typische Modifikationsstrategie ist das Minimieren der Modifikationen am guide strand.²¹

Die mON-Datenbank enthält aktuell 13 verschiedene Modifikationen für siRNA. Durch Modifikationen der 2'-Positionen der Ribose, nimmt diese eine C3' Endo Konformation an, was die Aktivität des RISC begünstigt.^{10,31} Deshalb sind 2'-OMe, 2'-MOE, 2'-F (Abb. 2.5) und LNA (Abb. 2.6) gängige Modifikationen. Typischerweise werden 4 bis 12 2'-F- und 2'-OMe-

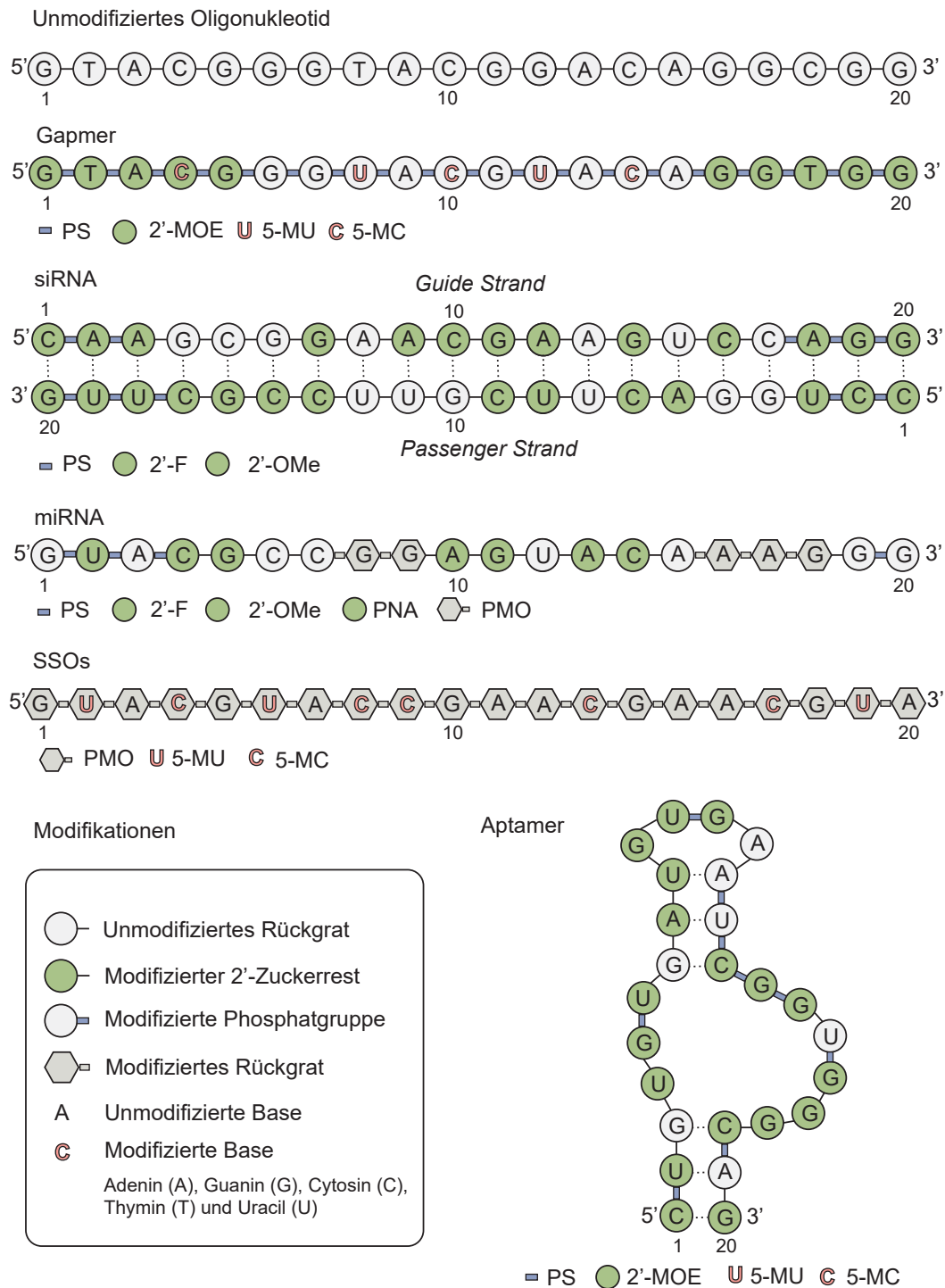


Abbildung 2.8 Kombination von chemischen Modifikationen für fünf verschiedene mON-Kategorien basierend auf Scheidat et al. ²⁸. Buchstaben repräsentieren die Basen, die miteinander über den Zuckereinheit (Kreise/Sechsecke) und dem Phosphodiester (Strich) verbunden sind. Modifikationen am 2'-Zuckerrest (grün), Phosphodiester (blau), Nukleotid Rückgrat (grau) und an den Basen (rote Buchstaben). Die Farben beziehen sich auf die Strukturelemente aus Abbildung 2.1.

Substituenten eingesetzt.^{56,58,59} Bei fünf von acht zugelassenen Therapeutika finden sich 2'-F Modifikationen und bei sieben von acht die 2'-OMe Modifikationen. 2'-MOE und LNA werden nicht eingesetzt.²⁸ Als Nukleaseschutz erfolgen PS-Modifikationen in ähnlichem Ausmass,³¹ weshalb bei fünf von acht zugelassenen siRNA-Therapeutika die PS-Modifikation aufzufinden ist. Die PS-Modifikation wird dabei sechsmal eingesetzt. Am 3'-Ende jedes Strangs befinden sich zwei überhängende phosphorylierte Basen.⁵⁶ Basenmodifikationen 5-MU und 5-MC (Abb. 2.7) erhöhen die Bindungsaffinität des guide Strangs. Allerdings verwendet keines der zugelassenen Medikamente diese Modifikation. Weil siRNA einen hydrophilen Charakter aufweisen, werden GalNAc-Modifikationen eingesetzt, um die zelluläre Aufnahme zu begünstigen.^{10,59} Solche Modifikation zur verbesserten Aufnahme der mONs in Zellen (sogenannte "delivery") werden in Kapitel 2.3 eingeführt. Der GalNAc-Ligand wird kommerziell nur bei der siRNA eingesetzt. Fünf der acht zugelassenen Therapeutika sind mit dem Liganden ausgestattet.

2.2.3 Micro RNA

Die Micro RNA (miRNA) gilt als die neueste mON-Kategorie. Sie ist aktuell (Stand Juni 2025) noch nicht für therapeutische Anwendungen zugelassen. Anti-miRNA-Oligonukleotide (AMOs) werden so entworfen, dass sie perfekt mit der Ziel-miRNA übereinstimmen, weshalb Bindungseigenschaften mit Zielsequenzen entscheidend sind.^{10,60} Die meisten der insgesamt 7 Modifikationen, die in miRNA-Studien untersucht wurden, betreffen Modifikationen an der 2'-Position der Ribose. Beispiele sind 2'-OMe, 2'-MOE, 2'-F und LNA (Abb. 2.6 und 2.5). Alle erhöhen die Bindungsaffinität und Nukleaseresistenz der AMOs.^{31,61} Hinzu kommen Rückgratmodifikationen (PMO, PNA, Abb. 2.4) und solche des Phosphodiesters (PS, Abb. 2.2).^{31,60}

2.2.4 Splice-Switching Oligonucleotides

Splice-switching oligonucleotides (SSOs) haben eine typische Länge von 20 bis 30 Nukleotiden.⁶² Der gängige Ansatz besteht in der Stabilisierung des Phosphodiester-Rückgrats durch PS-Modifikationen. Da diese, wie in den Abschnitten 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben, auch zur Rekrutierung von RNase H1 führen, ist es erforderlich, SSOs an allen 2'-Positionen der Ribose zusätzlich zu modifizieren.⁶² Häufig verwendete Modifikationen sind LNAs, 2'-OMe sowie 2'-MOE.²¹ Eine alternative Strategie ist die vollständige Substitution des Oligonukleotid-Rückgrats durch PMOs oder PNAs, wodurch die Rekrutierung der RNase H1 oder des RISC verhindert wird.¹⁰

Die beiden Strategien für Modifikation werden in den zugelassenen SSO-basierten Therapeutika angewandt. Bisher stehen sechs SSOs zur Verfügung, von denen zwei an jedem Phosphodiester eine PS-Modifikation und eine 2'-MOE Modifikation aufweisen. Vier Therapeutika weisen ein komplett modifiziertes PMO-Rückgrat auf. Des Weiteren können auch die methylierten Basen 5-MC und 5-MU angebracht werden. In der Regel werden etwa fünf bis sieben 5-MC und zwei 5-MU Modifikationen in zugelassenen SSOs verwendet.²⁸

2.2.5 Aptamers

Auch an Aptameren werden verschiedene Modifikationen angebracht. Sie umfassen PS, 2'-F und 2'-OMe-Modifikationen.⁶³ Unmodifizierte Aptamere weisen an sich eine hohe Resistenz gegenüber dem Abbau durch Nukleasen auf, was auf Bildung dreidimensionaler Strukturen zurückzuführen ist.⁶⁴ Zur Zeit ist nur ein Aptamer im klinischen Kontext zugelassen. Er weist 2'-F und 2'-MOE Modifikationen auf.

2.3 Carriersysteme für die Verabreichung von mONs

Sogenannt unformulierte bzw. nackte Oligonukleotide gelten als nicht stabil und weisen geringe Halbwertszeiten auf.¹ Trotz chemischer Modifikationen von mONs (z.B. am Phosphodiester), welche die mONs stabilisieren, werden mONs in ca. 50% der zugelassenen Therapeutika mittels Carriersystemen verabreicht.²⁸ Neben der mON Stabilisierung, dienen die Carriersysteme dazu, die Aufnahme bzw. den Transport der mONs in Gewebe der Zielorgane zu verbessern. Grundsätzlich werden zwei chemische Strategien für Carriersysteme verfolgt: (i) die Konjugation der mON am Anfang bzw. Ende des Nukleotidstrangs, (ii) Einbringen des mON in Vesikeln wie Lipid-Nanopartikel und Liposomen oder in Polymer-basierte Nanopartikel.^{5,10} Eine schematische Darstellung dieser Strategien ist in Abbildung 2.9 aus Roberts et al.⁵ zu finden.

2.3.1 Konjugate

Unter den verschiedenen möglichen mON-Konjugaten wird der Zucker *N*-Acetylgalactosamine (GalNAc) am häufigsten in zugelassenen Therapeutika verwendet.^{26,65} Es wurde gezeigt, dass das am 3'-Ende angebrachte GalNAc die Aufnahmewahrscheinlichkeit Oligonukleotid-basierter Pharmaka verbessert. GalNAc bindet an den Asialoglykoprotein-Rezeptor 1 (ASGR1, ASPGR), der v.a. in Leberzellen exprimiert wird. Im Anschluss wird das mON internalisiert. Durch die Senkung des pHs im Inneren des Endosoms wird das Konjugat abgespalten und das mON durch noch nicht bekannte Prozesse aufgenommen.^{26,66} Weitere Konjugate umfassen Lipide wie Cholesterin, zellpenetrierende Peptide und Antikörper.

2.3.2 mON Verabreichung mit Vesikeln

Bei der Verabreichung von mONs in Vesikeln bzw. Polymer- oder Liposom-basierten Nanopartikel (LNPs) schützen vesikuläre Membranen mONs vor Nukleasen.^{5,10,65,68,69} Die Oberflächen von Vesikeln sind geladen und mit Polymeren wie z.B. Polyethylenglycol (PEG) modifiziert. Die Ladungen, welche die Fusion der Vesikel mit Zellmembranen begünstigen, entstehen durch ionisierbare und kationische Lipide. Die Größe der LNPs kann eine wichtige Rolle für die Ausscheidung von mONs spielen, da diese vom Menschen grössenabhängig ausgeschieden werden. Exosome weisen im Vergleich zu Lipid-Nanopartikeln eine veränderte Membranzusammensetzung auf. Sie sind aktuell (Stand Juni 2025) noch nicht mit mONs eingesetzt worden.

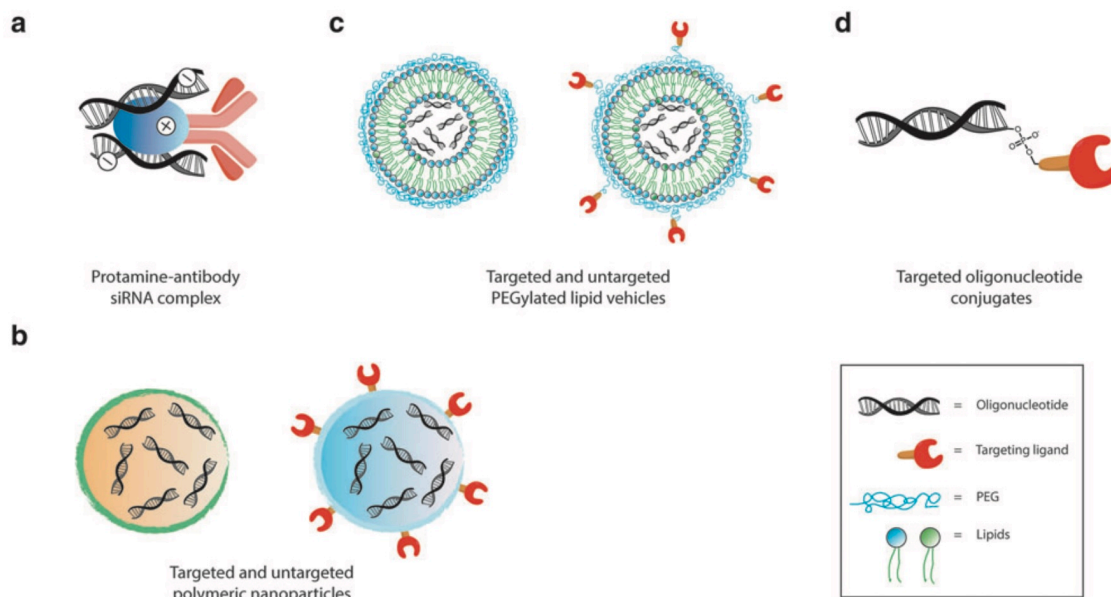


Abbildung 2.9 Schematische Darstellung von Beispielen für Verabreichungsformen von mONs als siRNA. Konjugation mit (a) Antikörpern, (b) Nanopartikel, (c) partikuläre Lipide (mit/ohne Polymere), (d) Konjugaten wie *N*-Acetylgalactosamine (GalNAc). Ausschnitt aus Figur 2 von Johannes and Lucchino⁶⁷. (CC-BY-NC 4.0)

2.4 Analyse der zugelassenen Therapeutika

Information über die zugelassenen Therapeutika sind für diesen Bericht in der mON-Datenbank²⁸ zusammengestellt worden. Eine Beschreibung des Aufbaus dieser Datenbank ist in Anhang A.1 zu finden. Die mON-Datenbank umfasst 28 Pharmaka mit Produktnamen und der Bezeichnung des aktiven Inhaltsstoffes. Seit 1998 wurden 20 mON-Pharmaka durch die US-amerikanische Arzneimittelbehörde FDA zugelassen, 13 davon auch durch die europäische EMA und somit auch für die Schweiz. 6 weitere Produkte befinden sich gegenwärtig im Zulassungsverfahren. Einzig dem Aptamer Macugen wurde 2004 die Zulassung von der FDA und EMA verweigert. 15 verschiedenen Firmen sind an der Entwicklung zugelassener Pharmaka beteiligt, wobei die Unternehmen Ionis Pharmaceuticals und Alnylam Therapeutics an mindestens vier Produkten beteiligt sind.

Die 20 FDA-zugelassenen Pharmaka sind den jeweiligen mON-Kategorien in Tabelle 2.1 zugeteilt. Bisher wurden kein Produkt auf der Grundlage von miRNA zugelassen, noch gibt es ein entsprechendes Zulassungsverfahren. Gapmers und siRNA machen ca. zwei Drittel der zugelassenen Produkte aus. Zugelassene mONs bestehen aus 13 bis maximal 58 Nukleotiden, wobei längere Nukleotidsequenzen mit einer Ausnahme in die siRNA Kategorie fallen. Sie bestehen hälftig aus RNA und DNA. Insgesamt werden lediglich 7 strukturelle Modifikationen in zugelassenen Therapeutika eingesetzt: PS in der Phosphodiester-Einheit, PMO im Rückgrat, 2'-F, 2'-OMe, 2'-MOE in der 2'-Position der Ribose, sowie 5-MC und 5-MU in der Nukelobase-Einheit. Ribose Analoga (Abb. 2.3) wurden bisher nicht verwendet.

Tabelle 2.1 Zusammensetzung der zugelassenen mON-Therapeutika nach mON Kategorie, Art und Anzahl (n) der strukturelle Modifikationen. Letztere beziehen sich auf Strukturelemente gemäss Abbildung 2.1 und Verabreichungsform (Delivery, Abb. 2.9).^a

Kategorie	n	Phosphodiester	Ribose Analoga	Rückgrat	2'-Position Ribose	Base	Delivery
Gapmer	8	PS			2'-MOE	5-MC 5-MU	GalNAc
siRNA	6	PS			2'-F 2'-OMe		GalNAc LNP
miRNA	0						
SSO	5	PS		PMO	2'-MOE	5-MU	
Aptamers	1	PS			2'-F 2'-OMe	5-MC	LNP PEG
Verwendete vs. theoretisch mögliche Modifikationen							
in Praxis	2	0	1	3	2	3	
Theorie ^b	7	10	7	24	15	- ^c	

^a Strukturen und deren Abkürzungen sind in Abb. 2.2 bis 2.7 ersichtlich.

^b Minimum an möglichen Modifikationen gemäss Zusammenstellung in mON-Datenbank.²⁸

^c Eine Abschätzung der theoretisch möglichen Verabreichungsformen wird in dieser Arbeit nicht vorgenommen. Sieben Variationen von Verabreichungsformen sind in Abb. 2.9 gezeigt.

2.4.1 Strukturelle Modifikationen in Pharmaka

Die PS Modifikation des *Phosphodiester*s finden sich in 13 der 21 Medikamente. Die minimale Anzahl PS Modifikationen beträgt 4 bis 6 Modifikationen pro mON wobei bei 7 Pharmaka sämtliche Phosphodiester-Gruppen mit PS modifiziert sind. Die PS-Modifikationen kommen vorwiegend bei Gapmers, siRNAs und SSOs zum Einsatz. Die PMO-Modifikation am mON *Rückgrat* wird in vier Pharmaka eingesetzt, bei denen es sich ausschliesslich um SSOs handelt. Die PMO-Modifikation erstreckt sich dabei über das gesamte Rückgrat. Die drei Modifikationen an der *2'-Position der Ribose* verteilen sich wie folgt auf die mON Kategorien: 2'-F wird fast ausschliesslich bei siRNAs verwendet und stets in Kombination mit 2'-OMe. Typischerweise kommen 9 bis 21 Modifikationen pro mON vor und diese betreffen den guide (sense) strand häufiger als den passenger (antisense) strand der siRNA. In sieben Pharmaka wird 2'-OMe eingesetzt; sechs davon in Kombination mit 2'-F (siRNA), ein weiteres bei einem Aptamer. Die 2'-MOE Modifikation wird in Gapmers und SSOs eingesetzt. Dabei fällt bei Gapmers auf, dass 2'-MOE an je fünf der modifizierten Nukleotide an beiden Enden der rund 20 Nukleotide langen Sequenz vorkommt. Modifikation mit *Nukleobasen* beschränken sich auf 5-MC und 5-MU wobei diese vorwiegend in Gapmers und SSOs genutzt werden. Sie werden mit 4 bis 14 Modifikatio-

nen pro mON eingesetzt. Für eine tiefergehende Evaluation der kombinierten Verwendung von strukturellen Modifikationen sei auf die mON-Datenbank (Anhang A.2) verwiesen.

Um die Verabreichung von mONs zu verbessern, setzen nur 9 der 21 Pharmaka auf Konjugate (7 GalNAc), Vesikel (2 LNP bzw. PEG Nanopartikel) und eines auf ein Lipid (Palmitoyl lipid). Die Mehrheit der mON wird also gegenwärtig in nackter Form verwendet. Diese Präferenzen können in Beziehung mit der klinischen Anwendung stehen. Mit einer Ausnahme, dienen mONs, die in Form von Konjugaten oder in Vesikeln verabreicht werden, der Behandlung der Leber und werden subkutan (Haut) oder intravenös (Blutbahn) verabreicht. Daneben werden nackte mON Therapeutika vitreal oder intrathekal zur Behandlung von Auge, Skelettmuskulatur, oder des zentralen Nervensystems eingesetzt.

2.4.2 Theoretisch mögliche Modifikationen

Aus Tabelle 2.1 geht auch hervor, dass den 7 derzeit verwendeten chemischen Modifikationen mindestens 57 weitere gegenüberstehen, die in keinem der derzeit zugelassenen mON Therapeutika verwendet werden. Theoretisch mögliche Modifikationen betreffen alle fünf Strukturelemente. Besonders zahlreich sind Optionen für die Modifikation an der 2'-Position der Ribose und die Verwendung von Ribose-Analoga. Diese Zahlen legen nahe, dass prinzipiell eine wesentlich grössere strukturelle Diversität von mONs möglich ist und die aktuell zugelassenen Pharmaka höchstens 11% der chemisch möglichen Varianten ausschöpfen. Welche Teile der strukturellen Varianten in zukünftigen Pharmaka zum Einsatz kommen ist u.a. eine Frage ihrer therapeutischen Wirksamkeit versus toxischer Nebenwirkungen, die in diesem Bericht nicht behandelt werden kann.

Kapitel 3

Konzepte für die Umweltrisikobanalyse

Die Analyse der chemischen Zusammensetzung und Struktur von mONs sowie ihrer Verabreichungsformen bildet die Grundlage für das Ableiten von Konzepten für die Umweltrisikobanalyse. Die medizinischen Wirkmechanismen von mONs, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, spielen in dieser Risikoabschätzung eine untergeordnete Rolle. In diesem Kapitel beschreiben wir, welche Ansätze für eine Abschätzung der Emissionen, der Exposition in der aquatischen Umwelt und den Effekten von mONs auf Nicht-Zielorganismen relevant sind (Kapitel 3.1). Die aktuelle Wegleitung “Gentherapie GVO Umweltdaten” von Swissmedic⁷⁰ gibt in deren Anhang 5 für den Fall von “nicht auszuschliessenden” Emissionen von mONs in die Umwelt vor, Informationen zu “Wechselwirkungen zwischen dem Versuchspräparat und der Umwelt” vorzulegen. Diese umfassen u.a. die “Verbreitung von mONs in der Umwelt” und den “erwarteten Mechanismus und Resultat der Interaktion mit Wirtsorganismen”, was eine Abschätzungen von Exposition und Effekten von mONs in der Umwelt impliziert.

Es ist aktuell unklar, wie die Eigenschaften von mONs zu beschreiben sind, so dass ihr Umweltverhalten und die biologischen Effekte adäquat charakterisiert sind. Bisher wurden keine entsprechenden Untersuchungen mit mON über die relevanten *Prozesse* in der Umwelt durchgeführt. Weil solch grundlegenden Prozesskenntnisse, mit deren Hilfe Exposition und Effekte von Risikoanalysen von mONs abgeschätzt werden könnten, nicht vorliegen, leiten wir in Kapitel 3.2 ein Vorgehen ab, um in diesem Bericht mit fehlenden Untersuchungen und Daten umzugehen. Schliesslich legen wir den Umfang fest, in welchem wir Daten über chemische und strukturelle Modifikationen von mONs aus Kapitel 2 verwenden, um die relevanten Prozesse für Expositionsabschätzungen und Effektbeurteilungen in diesem Bericht zu beschreiben.

3.1 Ansätze und Annahmen für die Umweltrisikobanalyse

3.1.1 Beurteilung aus Sicht von Chemikalien- vs. Biosicherheit

Umweltrisikobanalysen von mONs stehen vor einer grundlegenden, konzeptionellen Herausforderung. Einerseits sind mONs *anthropogene Chemikalien*, welche aufgrund von Exposition und (Öko)Toxizität unerwünschte Wirkungen auf Mensch und Umwelt haben können.⁷¹ Andererseits stellen mONs *genetisches* und *genetisch aktives Material* dar, das neben der beabsichtigten Steuerung der Genexpression im Menschen auch in weitere biologische Prozesse eingreifen kann. Was für die Umweltrisikobanalyse eine Herausforderung darstellt, wird für die Entwicklung von Gentherapien als Vorteil gesehen. Die pharmakologische Wirkung, d.h. das Modulieren der Genexpression durch die Nukleotidsequenz der mON, kann damit unabhängig von dianophoren Eigenschaften, die für das “Verhalten” der Wirkstoffe im Körper ausschlaggebend sind, betrachtet werden.⁸ Letzteres wird als “ADME”-Eigenschaft, als Akronym für absorption, distribution, metabolism, and excretion, beschrieben. Dieses Zusammenspiel von genetisch kodierter Wirkung und ADME unterscheidet mONs also sogenannte “informational drugs” von herkömmlichen Pharmaka. Die konzeptionelle Trennung von pharmakologischer Wirkung und ADME-Eigenschaften scheint sich aber für die Entwicklung und Anwendung von therapeutischen mONs nicht durchgesetzt zu haben. Stattdessen werden Attribute der mONs als sequenzabhängig bzw. sequenzunabhängig eingeteilt^{72,73} und verschiedentlich als “sequence vs. chemistry-dependent” bezeichnet.⁵ Weil natürliche Nukleotide und ihre Sequenzen *a priori* keine biologisch nachteiligen Effekte haben, impliziert die Sequenzunabhängigkeit einen direkten (kausalen) Zusammenhang zwischen der chemischen Modifikation des Oligonukleotids mit dem beobachteten Verhalten bzw. toxischen Effekt. Während ADME-Eigenschaften als weitgehend sequenzunabhängig gelten, kommt die pharmakologische Wirkung, insbesondere aber auch toxische Nebeneffekte, aufgrund von sequenzabhängigen *und* -unabhängigen Effekten zustande.

Diese Unterscheidung mittels Sequenz(un)abhängigkeit bietet sich deshalb auch für Umweltrisikobanalysen an. Sie ermöglicht, sowohl die Prozesse, welche Transport und Transformationen von mONs in der Umwelt und somit deren Exposition bestimmen, als auch die (öko)toxikologischen Effekte von mONs auf Nicht-Zielorganismen systematisch zu untersuchen. Tabelle 3.1 fasst die relevanten Prozesse zusammen, die in Kapiteln 5 und 6 für mON-Kategorien spezifisch evaluiert werden. Für die Beurteilung der Exposition der Umwelt durch mONs sind dies die Adsorption der mONs an organische und mineralische Bestandteile der Umweltmatrix, abiotische Abbaureaktionen (Hydrolyse, Oxidation) in natürlichen Systemen und (Ab)Wasserbehandlungsanlagen (Chemische Oxidation, in der Schweiz weitgehend mit Ozon als Oxidations- und Desinfektionsmittel) sowie enzymatische Abbaureaktionen. Diese Prozesse können näherungsweise als sequenzunabhängig angenommen werden.⁷⁴ Damit wird der Umstand ausgeklammert, dass Nukleotidsequenzen bzw. auch die Positionierung von Modifikationen innerhalb der mONs die räumliche Struktur von natürlichen und modifizierten Oligonukleotiden bestimmen. Allerdings existieren solche Information für mONs (noch) nicht.

Andererseits können mONs sowohl sequenzabhängig als auch sequenzunabhängig biologische Wirkungen hervorrufen. Daher müssen beide Möglichkeiten entsprechend in der Umwelt-

Tabelle 3.1 Einteilung von Prozessen für die Abschätzung von Exposition und Effekten von mONs nach Sequenzunabhängigkeit und -abhängigkeit und links zu Kapitel der Umweltrisikoaanalyse.

Exposition	Abschnitt	Effekte	Abschnitt
Sorption	5.1	Direkte (Geno)Toxizität	6.1
Abiotischer Abbau	5.2	(Geno)Toxizität	6.2.1
Chemische Oxidation	5.3	Toxischen Nebenwirkungen	6.2.2
Enzymatischer Abbau	5.4	Off-/non-target Effekte bei Nichtzielorganismen	6.2.3
Aufnahme	5.5	Effekte auf Nichtzielorganismen mit komplementären Zielstrukturen	6.2.4
		Gentransfer	6.2.5

risikoaanalyse berücksichtigt werden. Die Aufnahme von mONs ist eine Voraussetzung für deren Effekte und wird hier der Beschreibung von Effekten zugeteilt. Dieser Prozess ist ebenso sequenzunabhängig wie die direkte Toxizität von mONs. Letztere werden durch die beobachteten toxischen Nebenwirkungen von chemischen Modifikationen in Therapien impliziert. Sequenzabhängige Effekte von mONs in der Umwelt umfassen toxische Effekte auf Nicht-Zielorganismen (sog. non-target effects), genotoxische und mutagene Wirkungen, und die Möglichkeit einer Inkorporation ins Erbgut und Verbreitung durch Vererbung und Gentransfer. Je nach genomischer Datenlage könnten einzelne sequenzabhängige Phänomene mithilfe bioinformatischer Methoden für eine probabilistische Charakterisierung von Effekten abgeschätzt werden.

3.1.2 Rolle der Verabreichungsformen

Die Verabreichungsformen von mONs für drug delivery umfassen neben den nackten mONs sowohl Konjugate als auch Carriersysteme mit Nanopartikel (LNPs, Polymere) und extrazellulärer Vesikel (Kapitel 2.3). Eine Emission von Therapeutika würde folglich dazu führen, dass mONs in der Umwelt in verschiedenen Formen entsprechend der eingesetzten Verabreichung vorkommen können. Damit muss die Exposition von mONs in der Umweltrisikoaanalyse für jede Verabreichungsform separat betrachtet werden. Einerseits unterscheiden sich nackte mONs, deren Konjugate und Carriersysteme systematisch bezüglich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften, was wiederum ihren Transport und ihre Aufnahme in Organismen beeinflusst. Andererseits muss für eine Abschätzung von Abbaureaktionen bzw. Effekten die Elimination des Konjugatteils eines mONs bzw. die Freisetzung des mONs aus dem Carrier als weiterer Prozess charakterisiert werden. Für Umweltrisikoaanalysen implizieren verschiedene Verabreichungsformen daher eine Zunahme der zu beurteilenden Reaktionen und Prozesse.

Im vorliegenden Bericht wird darauf verzichtet, die Konsequenzen der Verabreichungsformen für Exposition und Effekte explizit zu betrachten und die Komplexität bzw. Unsicherheit der Prozessbeurteilung weiter zu erhöhen. Erstens sind viele der erwähnten Prozesse, die das Verhalten von Konjugaten und Carriersysteme sowie die Freisetzung von mON daraus, ebenso

wie das Verhalten von nackten mONs, nicht bekannt. Zweitens ist die Mehrheit der nicht nackt verabreichten, zugelassenen Therapeutika mit dem GalNAC-Konjugat versehen. Dieses Konjugat wird im menschlichen Körper effizient vom mON abgespalten.⁵ Eine Fokussierung auf die Beurteilung des Umweltverhaltens und der Wirkung nackter mONs ist damit wahrscheinlich für den Moment für zugelassene mON-Therapeutika am zweckdienlichsten.

3.2 Vorgehen für Beschreibung von Emission, Exposition und Effekten

3.2.1 Getrennte Betrachtung von Exposition und Effekten

Beispiele für Umweltrisikoplanungen von mON-Therapeutika auf Grundlage der in Tabelle 3.1 aufgezählten Prozesse existieren derzeit nicht. Hinweise für ein Vorgehen für Umweltrisikoplanungen können aber aus Arbeiten über medizinische und landwirtschaftlichen Anwendungen von mONs abgeleitet werden.^{23,27} Diese Studien bestätigen, dass Prozesse, welche die Persistenz von mONs und deren biologische Effekte bestimmen, separat auf Sequenz(un)abhängigkeiten untersucht und beurteilt werden können. Die Arbeiten weisen zudem darauf hin, dass chemische Modifikationen sowohl individuell als auch in Kombination Verhalten und Wirkung von mONs beeinflussen können.

So untersuchten Howard et al.²³, wie die Wirksamkeit von siRNA in der Schädlingsbekämpfung durch chemische Modifikationen verbessert werden kann. Die Autoren zeigen beispielsweise, dass Modifikationen an verschiedenen mON-Strukturelementen (siehe Abb. 2.1), am Phosphodiester und der 2'-Position der Ribose, die Persistenz von siRNA gegenüber unmodifizierter siRNA in gleichem Ausmass erhöht. Experimente mit modifizierter und unmodifizierter siRNA, welche aber nicht für die RNA der Zielorganismen codierte, führte zu keiner Zunahme der Mortalität. Daraus wurde geschlossen, dass die beabsichtigte Toxizität sequenzabhängig ist und chemischen Modifikationen alleine keine toxische Wirkung verursachen. Nach demselben Ansatz haben Bramsen et al.²⁷ mit 21 Modifikationen mehr als 2'100 siRNA Varianten synthetisiert. In Zellassays konnte damit separat auf die Konsequenzen der Modifikationen und deren Kombination für Aktivität, Stabilität oder Toxizität der siRNA Varianten geschlossen werden.

Aus diesen Studien lässt sich folgern, dass auch in Umweltrisikoplanungen von mONs die Konsequenzen von chemischen Modifikationen und Nukleotidsequenzen auf Exposition und Effekte isoliert und im Vergleich mit unmodifizierten ONs evaluiert werden können. Weil auch Kombinationen von chemischen Modifikationen die Eigenschaften und Wirkung von mONs bestimmen, sind Evaluationen einzelner Modifikationen lediglich als Approximationen an das effektive Verhalten zu betrachten.

3.2.2 Vorgehen unter Berücksichtigung limitierter Information

Für eine Analyse der in Tabelle 3.1 aufgeführten Prozesse zur Beurteilung von Exposition und Effekten von mONs leiten wir folgendes Vorgehen ab.

- (i) Die relevanten Prozesse von Tabelle 3.1 sollen isoliert analysiert werden unter Berücksichtigung von Sequenzabhängig und -unabhängigkeit.
- (ii) Weil Informationen zu den Prozessen in Tabelle 3.1 für mONs vielfach fehlen, müssen Erkenntnisse von unmodifizierten, d.h. natürlichen Nukleotiden, sofern vorhanden, als Referenz herangezogen werden. Auf dieser Grundlage wird abgeleitet, welche Auswirkungen die verschiedenen chemischen Modifikationen auf die Prozesse haben (können).
- (iii) Ohne spezifische Untersuchungen und Daten ist die Unterscheidung der 5 mON Kategorien bzw. der Wirkmechanismen (Kapitel 1.3) von mONs in der Umweltrisikoaanalyse nicht sinnvoll. Stattdessen werden lediglich ASOs (einzelnsträngige ON) und siRNA (doppelsträngiges ON) unterschieden. Die typischen Sequenzlängen der hier diskutierten mONs beträgt 20-50 Nukleotide.
- (iv) Eine Analyse der relevanten Prozesse für die über 60 möglichen, chemischen Modifikationen ist wissenschaftlich nicht durchführbar, da deren Auswirkungen auf Nukleasestabilität, Bindungsaffinität der ON-Sequenzen und Toxizität selbst im medizinischen Kontext nicht vollständig bekannt sind (und daher schon gar nicht darüber hinaus). Stattdessen konzentrieren wir uns auf die Interpretation der 7 aktuell in zugelassenen Therapeutika eingesetzten Modifikationen. Diese beinhalten Modifikationen des Phosphodiesters (PS), des Nukleotidrückgrats (PMO), der 2'-Position der Ribose (2'-F, 2'-MOE, 2'-OMe) und der Base (5-MC, 5-MU, siehe Tabelle 2.1). Kombinationen chemischer Modifikationen werden nicht berücksichtigt.
- (v) Weil Spitalabwässer (und kommunale Abwässer) der wahrscheinlichste Eintragspfad für mONs aus therapeutischen Anwendungen in die Umwelt darstellt, werden o.g. Prozesse, wenn nötig, im Kontext von Abwasserreinigungsanlagen diskutiert.
- (vi) Wissenslücken, die sich bei der Analyse der relevanten Prozesse aus Punkt (iv) zeigen, werden separat in Kapitel 7 diskutiert.

3.2.3 Emissionen

Die Abschätzung von mON Emissionen beschränkt sich auf zugelassene mON Therapeutika. Diese Betrachtung folgt deshalb ebenfalls Punkt (iv) der Vorgehensweise für die Prozessbeurteilung für Exposition und Effekten. Wie im folgenden Kapitel 4 ausgeführt, ermöglichen die verfügbaren Informationen zu ADME-Eigenschaften qualitative Betrachtung von Emissionsszenarien für mON mit 7 benannten Modifikationen aus Tabelle 2.1.

Kapitel 4

Emissionen

4.1 Geltungsbereich

Für eine Abschätzung möglicher Emissionen von mONs in die Umwelt betrachten wir den therapeutischen Einsatz von Präparaten in Kliniken und Spitälern. Dabei gehen wir von Szenario B2 von Swissmedic⁷⁰ aus, in welchem mON Therapeutika von PatientInnen ausgeschieden und über die Kanalisation in Kläranalgen gelangen können. Auf Emissionen aus der chemischen oder biotechnologischen Produktion von mONs im Normal- oder Störfall sowie aus einer allfälligen Entsorgung nicht eingesetzter Präparate werden hier nicht eingegangen. Es sei hier darauf hingewiesen, dass aktuelle Produktionsverfahren mit Ausbeuten von $< 50\%$ und Produktreinheiten von $< 90\%$ operieren,³⁷ was zukünftige Untersuchungen von mON Emissionen aus Produktionsprozessen rechtfertigen würde.

Modifizierte Oligonukleotide können im Rahmen pharmakokinetischer Studien (ADME) qualitativ hinsichtlich ihrer renalen und fäkalen Exkretion beurteilt werden. Die verfügbaren Angaben aus Zulassungsdossiers von FDA, EMA und Swissmedic für zugelassene Therapeutika sind in der mON-Datenbank zusammengetragen.²⁸ Sie umfassen Zielorgane (wie Auge, Darm, Leber, Niere, Skelettmuskel und ZNS), Behandlungsdosen (in mg bei einer 70 kg schweren Person) mittels Aktivsubstanz, Applikationsintervalle, mON Halbwertszeiten im Organismus und prozentuale Exkretionsmengen. Alle Angaben zur Ausscheidung von mONs beziehen sich auf intakte, ganzkettige mONs. Zu Transformationsprodukten, inklusive möglicher Sekundärmetabolite, liegen keine Angaben vor.

4.2 Analyse von Angaben zu Exkretionsmengen und -anteilen

Eine erste Unterscheidung für Emissionsabschätzungen kann aufgrund der zu behandelnden Organe gemacht werden. Vitreale Applikation von mONs im Auge erfolgen in geringeren Mengen als die aller anderen Therapien. Da das Auge weitgehend vom systemischen Blutkreislauf isoliert ist, sind Exkretionen zudem geringer als bei subkutanen, intravenösen und intrathekalen Injektionsrouten. Für die Emissionsabschätzung ergibt sich, dass die Emission von vitreal verabreichten mONs aus diesen Gründen als gering einzustufen ist.

Für andere Applikationswege fasst Tabelle 4.1 die für eine Umweltrisikooanalyse relevanten Exkretionsdaten aus ADME-Eigenschaften nach mON-Kategorien unter Berücksichtigung der eingesetzten chemischen Modifikationen und deren Anzahl zusammen. Bei mindestens drei Pharmaka pro mON Kategorie geben wir Standardabweichungen der Anzahl Modifikationen an, um deren Variabilität aufzuzeigen. Da keine miRNA Therapeutika zugelassen sind, sind auch keine Angaben zu deren Exkretion verfügbar. Ausser zu Aptameren sind für alle mON-Kategorien prozentuale Exkretionsangaben in den Zulassungsdossiers vorhanden. Der Anteil ausgeschiedener Gapmers und siRNA beläuft sich auf maximal 27%, wobei hier Minima und Maxima aus den Zulassungsdossiers aufgeführt werden. Auffallend ist die grosse Variabilität von Exkretionsanteilen für die 5 zugelassenen SSOs. Diese sind in Tabelle 4.1 nach SSOs mit PS und PMO Modifikationen aufgeteilt. Während der Anteil der Exkretion von SSO mit PS Modifikationen sehr gering (0.5%, Nusinersen) ist, kann es bei SSOs mit der Rückgratmodifikation PMO zu fast vollständiger Ausscheidung kommen ($\leq 99\%$, zB Viltolarsen).

Die Angaben für SSOs zeigen, dass die Anzahl der Modifikationen pro Strukturelement nicht entscheidend sein muss für das Ausmass der anteilmässigen Exkretion. Stattdessen scheint die Art bzw. die Struktur der Modifikation eine wichtigere Rolle zu spielen. Sowohl PS als auch PMO Modifikationen kommen in hoher Zahl in SSOs vor, die Exkretion ist bei PMO-modifizierten SSOs deutlich höher. Eine vergleichbare Tendenz ist auch beim Vergleich von Gapmers und siRNA sichtbar. Während Gapmers vier Modifikationen an Phosphodiester, 2'-Position der Ribose und Nukleobase aufweisen, sind es nur drei Modifikationen in siRNA. Trotzdem ist sowohl das Maximum als auch der Gesamtbereich der Exkretionsanteile bei siRNA höher.

Bei diesen Betrachtungen gilt es zu berücksichtigen, dass der der Betrachtung zugrundeliegende Datensatz (20 Pharmaka) klein ist. Korrelationen von Struktur und Anzahl chemischer Modifikationen mit Exkretionsanteilen der Wirkstoffe sollten daher vorsichtig interpretiert werden. Die Beobachtungen können jedoch zur Formulierung von Arbeitshypothesen für zukünftige Untersuchungen und Datenerhebungen dienen. Schliesslich weisen wir darauf hin, dass diese Zusammenstellung für mONs gilt, die nackt oder mit GalNAc-Konjugaten verabreicht werden. Allfällige Konsequenzen der verwendeten Carriersysteme auf die Exkretion können hier nicht untersucht werden, da die Exkretionsmengen für drei in LNP verabreichten Produkte nicht angegeben sind. Des Weiteren wurden in den Zulassungsdokumenten auch nicht der Anteil intakter mONs in LNPs untersucht.

Tabelle 4.1 Exkretion von 20 mON-Pharmaka nach mON-Kategorie mit Angabe der durchschnittlichen Anzahl chemischer Modifikationen (mit Standardabweichung). *n* bezeichnet die Anzahl zugelassener Pharmaka pro mON-Kategorie. Die Kategorie der SSOs wurde nach Modifikationen des Phosphodiester bzw. der Rückgratmodifikation aufgetrennt.

mON-Kategorie	<i>n</i>	PS	PMO	2'-F	2'-OMe	2'-MOE	5-MC	5-MU	Exkretion (%)
Gapmer	8 ^b	17 ± 3 ^a				10	8 ± 3	5 ± 1	1 - 15
siRNA	6	6 ± 1		13 ± 4	29 ± 9				1 - 27
SSO (PS)	1	17				18	4	7	0.5
SSO (PMO)	4		24 ± 4				8 ± 2	7	27 - 99
Aptamers	1			21	14		1		n.a. ^c

^a Durchschnittliche Anzahl der Modifikation pro Pharmaka, für welche quantitative Angaben für die Verwendung dieser Modifikation vorliegen, Angaben von Standardabweichungen nur für Modifikationen, die ≥ 3 mal vorkommen; ^b für eines der Gapmer Therapeutika liegen keine Angaben zur Art und Häufigkeit der Modifikation vor; ^c n.a. = not available.

Kapitel 5

Exposition

In diesem Kapitel “Exposition” beschreiben wir Prozesse, welche die (bio)verfügbare Konzentration von Nukleinsäuren wie mONs bestimmen. Typischerweise entspricht diese Konzentration der in der Umwelt im Wasser gelösten Konzentration. Diese Prozesse umfassen sowohl die Sorption als auch die Transformation. Die Sorption beschreibt die Verteilung der Nukleinsäuren zwischen der wässrigen Phase und den Umweltphasen wie organischen sowie mineralischen Partikeln oder Fraktionen von Sedimenten und Klärschlamm. Die Stärke der Sorption definiert auch das Transportverhalten von Nukleinsäuren. Die Transformation umfasst chemische und biologische Reaktion der (m)ONs. Mögliche Transformationsreaktionen beinhalten die (m)ON Hydrolyse und Oxidation. Hydrolysereaktionen können die Nukleinsäuren in kürzere Nukleotidsequenzen oder einzelne Nukleotide zerlegen. Diese Reaktionsprodukte können unter Umständen wie die Ausgangssequenzen weiterhin biologische Effekte hervorrufen (siehe Kapitel 6). Oxidationen verändern die chemische Struktur der Nukleotide.

In dieser Arbeit beurteilen wir die Exposition anhand von drei Prozessen, welche bei Emissionen in/aus Kläranlagen relevant sind: *Sorption*, abiotischer Abbau durch *Hydrolyse oder Oxidation mit Desinfektionsmitteln* sowie *enzymatische Abbaureaktionen*. Diese Prozesse wurden mit wenigen Ausnahmen bisher nicht für mONs untersucht. Deshalb sind die Prozesse im Folgenden auf Basis des Wissens über nicht-modifizierte Nukleinsäuresequenzen zusammengefasst. Anschliessend spekulieren wir über den Einfluss der sieben bekannten chemischen Modifikationen in zugelassenen Pharmaka auf diese Prozesse. Während abiotische Prozesse sehr allgemein diskutiert werden (müssen), können über enzymatische Reaktionen anhand von bioinformatischen Methoden spezifischere Aussagen getätigt werden, vorausgesetzt genomische Informationen zu relevanten Enzymen liegen vor. Schliesslich betrachten wir Aufnahmemechanismen von ONs in eukaryontische und prokaryontische Zellen.

5.1 Sorption

Die Adsorption (= Sorption an Oberflächen) längerkettiger Nukleinsäuren an natürlich vorkommende Partikel ist bereits seit den 1980 Jahren intensiv untersucht worden. Dabei standen Böden- und insbesondere ihre mineralischen Bestandteile im Fokus der Untersuchungen.^{75–78}

Es gibt jedoch auch Studien zur Nukleinsäureadsorption an aquatische und marine Sedimente sowie an Klärschlamm. Die Hintergründe und Ziele dieser Studien reichten von einer generellen Abschätzung des Einflusses der Adsorption auf die Stabilität von Nukleinsäuren in natürlichen Systemen (z.B. der Schutz adsorbierter Nukleinsäuren vor Nukleasen in der Bodenlösung),^{79–81} über den Einfluss der Adsorption auf den Transfer von DNA Molekülen zwischen Mikroorganismen (insbesondere horizontaler Transfer von Antibiotikaresistenzgenen),⁸² bis hin zu Betrachtungen des Einflusses der Adsorption auf die Stabilität und den Transport von Transgenen, die aus genetisch modifizierten Organismen freigesetzt werden können.^{83,84} Über die vergangenen zehn Jahre hat das Interesse an dem Prozess der Nukleinsäureadsorption erneut zugenommen, zum einen im Bezug auf die Verwendung von “environmental DNA” (eDNA) zur Analyse der Spezieszusammensetzung oder dem Nachweis bestimmter Spezies in beprobten Ökosystemen und zum anderen im Bereich der ökologischen Risikoabschätzung von genetisch modifizierten RNAi Pflanzen.^{17,85–87} Letztere produzieren kurze, doppelsträngige siRNA-Moleküle, um gezielt bestimmte Pflanzenschädlinge (z.B. Insekten) abzuwehren. Diese Studien sind für die vorliegende Arbeit besonders relevant, da die betrachteten Nukleinsäuren ebenfalls kurzkettig sind (etwa 20 - 50 Nukleotide).

5.1.1 Adsorptionsverhalten von Nukleinsäuren

Bezüglich des Adsorptionsverhaltens sind länger-kettige DNA und RNA Moleküle aufgrund ihres negativ-geladenen Phosphodiester-Rückgrats als Polyelektrolyte zu betrachten. Die Adsorption solcher Polyelektrolyte an geladene Partikeloberflächen wird maßgeblich durch elektrostatische Wechselwirkungen kontrolliert. Elektrostatische Anziehung von Nukleinsäuren an positiv geladene Oberflächen, z.B. von Eisen- und Aluminiumoxidpartikeln, resultiert in hoher Affinität und damit starker Adsorption. Elektrostatische Abstossung von negativ geladene Oberflächen - z.B. denen von organischen Partikeln, Silikaten, und den basalen Flächen von Tonmineralen - hingegen verhindert die Adsorption. Die elektrostatischen Wechselwirkungen werden durch die Ionenstärke und Ionenzusammensetzung und durch den pH-Wert der Lösung beeinflusst. Höhere Ionenstärken führen zur Ladungsabschirmung und somit zur Verringerung elektrostatischer Wechselwirkungen, wohingegen geringere Ionenstärken den entgegen gesetzten Effekt haben. Der pH der Lösung beeinflusst den Protonierungsgrad variabel-geladener funktioneller Gruppen auf Partikeloberflächen und somit deren Ladungsdichte. Divalente Kationen in Lösungen erlauben es, die elektrostatische Abstossung durch das Ausbilden sogenannter Kationenbrücken zwischen den Nukleinsäuren und den negativ geladenen Partikeloberflächen zu überwinden.^{88–90}

Im Vergleich zu elektrostatischen Wechselwirkungen werden van der Waals Interaktionen zwischen Nukleinsäuren und Partikeln als weniger bedeutend angesehen. Das Ausbilden von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinsäuren und Oberflächen ist prinzipiell möglich. Diese Brücken können sowohl mit der Phosphodiestergruppe als auch mit den Nukleinsäurebasen ausgebildet werden. Es ist zu erwarten, dass letztere insbesondere bei der Adsorption einzelsträngiger Nukleinsäuren eine Rolle spielen, da die H-Akzeptor- und Donorgruppen in den Basen

in diesen frei verfügbar sind und nicht, wie in doppelsträngigen Nukleinsäuren, bereits stabile Wasserstoffbrücken mit einem Komplementärstrang bilden.

Neben diesen Physisorptionsprozessen können Nukleinsäuren über die Phosphatgruppe auch kovalente Bindungen mit bestimmten Mineraloberflächen ausbilden, was insbesondere für Eisenoxide und Aluminiumoxide dokumentiert ist.^{91–93} Diese Chemisorptionsprozesse resultieren ebenfalls in einer starken Festlegung der Nukleinsäuren an die entsprechenden Oberflächen.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Adsorption von Nukleinsäuren an Partikeloberflächen ist oftmals mittels Gleichgewichtssorptionsmodellen beschrieben worden, z.B. dem Langmuir-Modell.^{94,95} Diese Modelle sind jedoch zumindest für die Adsorption langkettiger Nukleinsäuren nur als approximativ und deskriptiv zu betrachten, da einige Grundannahmen der Modelle nicht zutreffen. Zum einen ist die Adsorption von Nukleinsäuren an viele Oberflächen nicht reversibel, da eine Desorption das gleichzeitige Lösen aller Wechselwirkungen (inklusive möglicher kovalenter Bindungen) bedingt. Zum anderen können langkettige Nukleinsäuremoleküle unterschiedliche räumliche Konformationen auf den Oberflächen einnehmen, von kompakten ‘aufgerollten’ bis hin zu länglich-lineare Strukturen.⁹⁶ Welche Konformation adsorbierte Nukleinsäuren an Partikeloberflächen annehmen hängt von vielen Faktoren ab, wie beispielsweise der Ionenstärke der Lösung. Änderungen der Konformationen führen zu variablen Adsorptionskapazitäten der Oberflächen, welche nicht von den einfachen Gleichgewichtsmodellen beschrieben werden können.

5.1.2 Adsorptionsverhalten modifizierter Oligonukleotide

Bisher gibt es keine Adsorptionsstudien von in Pharmaka eingesetzten mONs an Partikeloberflächen. Daher kann das Adsorptionsverhalten der mONs nur basierend auf existierenden Adsorptionsstudien von längerkettigen Nukleinsäuren abgeschätzt werden. Bei dieser Abschätzung ist zu berücksichtigen, dass mONs a) kurzkettiger (20-50 Nukleotide) sind im Vergleich zu den meisten in Adsorptionsstudien untersuchten Nukleinsäuren und b) vier der fünf mON Kategorien (partiell) einzelsträngig vorliegen (also Gapmer, miRNA, SSO und Aptamer; Abb. 2.8), und c) in der Struktur modifiziert sind (sowohl an der Phosphatgruppe, am Rückgrat, an der 2'-Position des Zuckerrestes, oder der Nukleobase; Tabelle 2.1). Unter der Annahme einer Molmassenverteilung eines Nukleotids von ca. 300 - 600 g/mol (die Variation ist massgeblich auf die Base zurückzuführen), haben mONs mit 20 Nukleotiden ein ungefähres Molgewicht von 6'000-12'000 g/mol (einzelsträngig) bzw. von 12'000 – 24'000 g/mol (ohne Berücksichtigung etwaiger weiterer Massenzunahme durch die Carriersysteme/Delivery; Tabelle 2.1). Diese Molekulargewichte rechtfertigen die Betrachtung der mONs als Polyelektrolyte und damit der oben beschriebenen Adsorptionscharakteristika. Wir schätzen den Einfluss der strukturellen Modifikationen wie folgt ab.

Modifikationen der Phosphatgruppe. Die Thiophosphodiestergruppen (PS) tragen weiterhin eine negative Ladung und erhalten somit die negative Gesamtladung dieser mONs und damit auch die übergeordnete Bedeutung der elektrostatischen Wechselwirkungen in der Adsorption dieser mONs. Aufgrund der geringeren Elektronegativität des Schwefels im Vergleich

zum Sauerstoff ist zu erwarten, dass Wasserstoffbrücken zwischen Partikeloberflächen und Thio-phosphodiestergruppe im Vergleich zur Phosphodiestergruppe abschwächt sind. Der Einfluss der PS Gruppe auf die Adsorptionscharakteristik der mONs im Vergleich zu den entsprechenden unmodifizierten ONs nimmt zudem mit abnehmendem Modifikationsgrad ab.

Modifikationen des Rückgrats. Das Verwenden der Phosphorodiamidatgruppe in Kombination mit dem Morpholinoring (PMO) resultiert in einem ungeladenen, polaren Molekülrückgrat. Daher ist zu erwarten, dass sich die Adsorption von PMO modifizierten SSOs deutlich von unmodifizierten ON gleicher Länge unterscheidet. Die Stärke und Reversibilität der Adsorption von PMO-SSOs lässt sich ohne experimentelle Daten nur schwer abschätzen.

Modifikationen in der 2'-Position der Ribose. Die Modifikationen an der 2'-Position des Riboserings umfassen 2'-F, 2'-OMe und 2'-MOE. Es ist zu erwarten, dass diese Modifikationen die Gesamtadsorptionscharakteristik nur leicht verändern, da sie weder die Gesamtladung des mONs verändern noch die Wasserstoffbrückenbindungen, die in einzelsträngigen mONs von den Basen dominiert werden, beeinflussen. Aufgrund der Grösse der 2'-MOE-Gruppe sind mögliche sterische Effekte auf die Adsorption nicht auszuschliessen. Allerdings betrifft diese Modifikation nur die endständigen Nukleotide in Gapmeren (Tabelle 2.1).

Modifikationen der Basen. Die beiden möglichen Basenmodifikationen 5-MC und 5-MU beeinflussen weder die Ladung des Gesamtmoleküls noch die H-Brückenbindungseigenschaften dieser Basen. Daher ist zu erwarten, dass diese Modifikationen die Adsorptionseigenschaften nur untergeordnet verändern.

5.2 Abiotische Hydrolyse

Abiotische Hydrolysen an Oligonukleotiden können sowohl an der Phosphodiesterbindung, der *N*-glykosidischen Bindung (also zwischen der (Desoxy)Ribose und der Base), als auch an der Base selbst ablaufen. Diese Hydrolysereaktionen unterscheiden sich in ihrer Reaktivität und somit in ihrer Bedeutung für die Stabilität natürlicher und modifizierter Oligonukleotide in technischen und natürlichen Systemen.

5.2.1 Hydrolyse der Phosphodiestergruppe

Hydrolysen an der Phosphodiestergruppe führen zu einem Bindungsbruch im Rückgrat unter der Bildung von zwei entsprechend verkürzten Oligonukleotidsträngen mit zwei neuen Endgruppen: ein Strang mit einer freien 5'-OH Endgruppe der (Desoxy)Ribose und einem zweiten Strang mit einer Phosphomonoester-Gruppe an der 2'-OH Gruppe der Desoxyribose (DNA-basierte ONs) oder an der 2'-OH und 3'-OH Endgruppe der Ribose (RNA-basierte ONs) (siehe Abbildung 5.1). Die Reaktivität der Phosphodiestergruppe in abiotischen Hydrolysen ist massgeblich davon abhängig, ob die ON DNA- oder RNA- basiert sind und ob sie ein- oder doppelsträngig

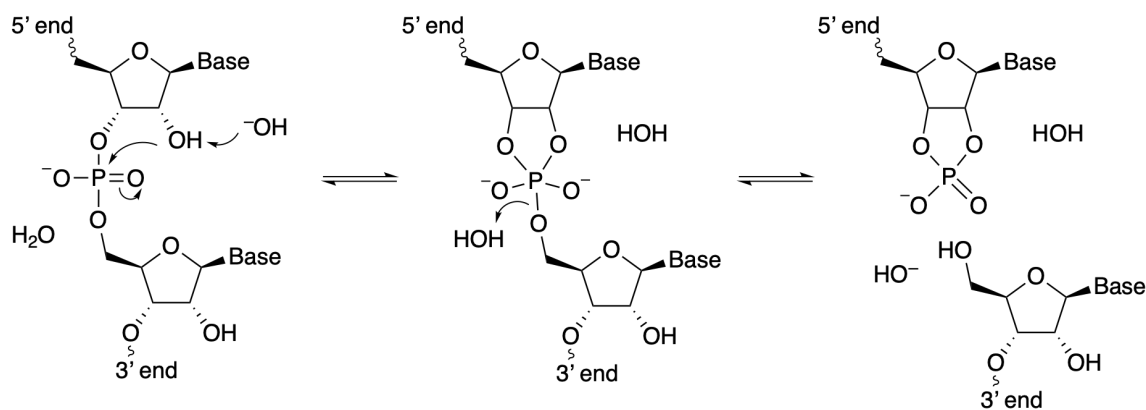


Abbildung 5.1 Mechanismus der intramolekularen RNA-Hydrolyse durch eine basenkatalysierte Transesterasereaktion.⁹⁷

vorliegen. Die abiotische Hydrolyse DNA-basierter Oligonukleotide unter neutralen pH Bedingungen ist extrem langsam mit abgeschätzten Ratenkonstanten bei 25°C in der Größenordnung von $k_{\text{obs}} = 10^{-15} \text{ s}^{-1}$ und entsprechenden Halbwertszeiten von ca. 30'000'000 Jahren.^{98–100} Abgeschätzte Reaktionsratenkonstanten unter sauren und alkalischen Bedingungen sind ebenfalls niedrig (ca. $k_{\text{obs}} = 10^{-13} \text{ s}^{-1}$ bei pH 4 und 12). Dieser Abbauweg kann somit für DNA-basierte ONs in technischen und natürlichen Systemen vernachlässigt werden. Im Vergleich dazu zeigen RNA-basierte Nukleotide eine deutlich höhere Reaktivität, die auf die freie 2'-OH Gruppe in der Ribose zurückzuführen ist.⁹⁷ Diese Hydroxylgruppe agiert unter basenkatalyse als intramolekulares Nukleophil unter Angriff auf den Phosphor in der benachbarten, an die 3'-OH Gruppe der Ribose gebundene Phosphodiestergruppe. Es bildet sich ein fünf-bindiger Phosphotriester als Intermediat, der einer Rückgrat-Bindungsspaltung unterliegen kann, unter Bildung der oben genannten Produkte. Die Ratenkonstanten dieser Hydrolysereaktion liegen über den umweltrelevanten pH-Bereich von ca. pH 4 bis pH 8 in der Größenordnung von 10^{-7} bis 10^{-6} s^{-1} und somit ungefähren Halbwertszeiten zwischen 80 und 8 Tagen. Dieser Abbauweg ist daher für einzelsträngige RNA-basierte ONs im Abwasser relevant, da durchschnittliche Verweilzeiten von Abwässern in Kläranlagen bei ca. 14 Tagen liegen. Doppelsträngige RNA-basierte ONs weisen hingegen eine deutlich geringere Hydrolysereaktivität auf: die Ratenkonstanten sind in etwa um eine Größenordnung geringer.^{101,102} Diese Stabilisierung ist auf die rigidere Sekundärstruktur der dsRNA im Vergleich zur ssRNA zurück geführt worden. Somit können dsRNA basierte ONs in Kläranlagen bezüglich der abiotischen Hydrolyse an der Phosphodiestergruppe als stabil betrachtet werden.

Eine Reihe von Studien zeigt, dass gelöste Metallionen, insbesondere starke Lewisäuren, die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung in RNA und RNA-Modellverbindungen katalytisch beschleunigen können.^{103–107} Diese Katalyse ist auf die Assoziation der Metallionen mit der Phosphatgruppe und der damit einhergehenden elektrophilen Aktivierung des Phosphors für den nukleophilen Angriff der benachbarten 2'-Hydroxylgruppe zurückzuführen. Die Bedeutung dieser Katalyse für den Abbau in Kläranlagen und nachgelagerten Gewässern ist jedoch unklar: in oben zitierten Untersuchungen wurden Metallionen im millimolaren Konzentrationsbereich

getestet und somit deutlich oberhalb des typischen nano- bis mikromolaren Konzentrationsbereichs dieser Ionen in Klärschlamm und Gewässern.¹⁰⁸ Zudem ist zu erwarten, dass diese Metallkationen stark an negativ-geladene Gruppen in der organischen Klärschlammmatrix binden^{16,109} und somit nur ein geringer Anteil in Komplexen mit mON zu erwarten sind. Eine Ausnahme sind möglicherweise Kläranlagen, in denen Eisensalze zur Ausfällung des Schlammes zum Einsatz kommen. Da Eisen ebenfalls katalytisch aktiv ist,¹¹⁰ erscheint eine erhöhte Hydrolyserate von RNA-basierten ONs in solchen Schlämmen plausibel. Die katalytische Rolle von Eisenmineraloberflächen im Abbau von RNA-basierten ONs ist in Kläranlagen vermutlich vernachlässigbar, aufgrund der zu erwartenden geringen Mineralfrachten in Klärschlämmen und der kompetitiven Belegung der Mineraloberflächen durch Bestandteile der Klärschlammmatrix.

5.2.2 Implikationen für mONs

Basierend auf den Erkenntnissen zur abiotischen Phosphodiester-Hydrolyse in unmodifizierten ONs ist davon auszugehen, dass dieser Reaktionsweg nur für die Betrachtung einzelsträngiger RNA-basierter mONs relevant ist (Gapmer, miRNA, SSOs, Aptamer), nicht jedoch für doppelsträngige RNA-basierte mONs (siRNA). Für letztere sind enzymatisch-katalysierte Hydrolysen relevant. Es ist zu erwarten, dass die Modifikationen an der 2'-OH Gruppe der Ribose in RNA-basierten mONs (also 2'-MOE in Gapmers, 2'-F in siRNA und Aptameren und 2'-OMe in siRNA, SSO, und Aptameren) die Phosphodiester-Hydrolyse deutlich verlangsamen. Die abiotische Hydrolyse an der Phosphodiestergruppe in mONs mit Modifikationen an der 2'-OH Gruppe läuft vermutlich nur sehr langsam ab und ist daher in einer Risikoabschätzung nicht als wesentlicher Abbauweg zu betrachten. Eine Ausnahme sind möglicherweise erhöhte mON Hydrolyseraten in mit Eisensalzen-behandelten Schlämmen.

5.2.3 Abiotische Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung

Die Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung führt zu einer Abspaltung der Base von der (Desoxy)Ribose unter Bildung einer freien 1'-OH Gruppe. Dieser Reaktionsweg hat in der Strukturaufklärung von Oligonukleotiden eine grosse Rolle gespielt. Diese Reaktion erfolgt ca. 100 bis 1000-mal schneller für 2'-Desoxyribosylgruppen im Vergleich zu entsprechenden 2'-Ribosylgruppen.¹¹¹ Jedoch benötigt diese Reaktion starke Katalyse durch Säure (oder Base): Ratenkonstanten bei pH 1 und 37°C erreichen Grössenordnungen von 10^{-4} bis 10^{-3} s^{-1} für 2'-Desoxyribosylgruppen (sind jedoch selbst unter diesen Bedingungen nur ca. 10^{-8} bis 10^{-6} s^{-1} für Ribosylgruppen). Die Ratenkonstanten dieser Reaktion nehmen linear ab mit abnehmender Protonenkonzentration in Lösung: selbst für reaktive 2'-Desoxyribosylgruppen sind die Ratenkonstanten bei pH 5 bereits auf 10^{-7} bis 10^{-6} s^{-1} gesunken, was Halbwertszeiten von ca. 80 bis 8 Tagen entspricht.¹¹¹ Es ist daher davon auszugehen, dass mONs, insbesondere wenn sie RNA-basiert sind, bei neutralem pH in technischen und natürlichen Systemen bezüglich der abiotischen Hydrolyse ihrer *N*-glykosidischen Bindungen als stabil betrachtet werden können.

5.2.4 Abiotische Hydrolyse der Nukleobasen in Oligonukleotiden

Abiotische hydrolytische Desaminierungen können in den Nukleosiden (und ihrer entsprechenden Nukleotide) mit freien Aminogruppen (also Adenosin, Cytosin, und Guanin) ablaufen unter Bildung von Ammonium und Nukleosiden mit den Basen Hypoxanthin, Uracil und Xanthin. Jedoch laufen diese Hydrolysen nur sehr langsam ab, mit ungefähren Ratenkonstanten von ca. $2 \cdot 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ für Adenosin (37°C) und ca. $1 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ für Cytidin (37°C), was Halbwertszeiten von Jahren bis wenigen Monaten entspricht. Diese Reaktionen sind daher ebenfalls für den Abbau von ONs in Kläranlagen zu vernachlässigen.

5.3 Chemische Oxidation

Die Verwendung von chemischen Oxidationsmitteln in der Tertiärstufe der Abwasserbehandlung kann zum oxidativen Abbau von Oligonukleotiden führen. Häufig verwendete Oxidationsmittel sind Chlor (Cl_2), Chlordioxid (ClO_2), und Ozon (O_3).

Chlorung: Bei der Chlorung reagiert das zugegebene Chlor mit Wasser zu hypochloriger Säure (HClO) und Salzsäure (HCl). HClO und dessen Anion Hypochlorite (ClO^-) reagieren mit den Amingruppen der Basen unter Bildung von Chloraminen.¹¹² Es ist gezeigt worden, dass die Reaktivität von Modellpolynukleotiden mit HOCl in der Nukleosid-Reihenfolge Cytidin (C) > Adenosin (A) = Guanosin (G) > Uridin(U) = Thymin (T) abnimmt.^{112,113} Diese Reihenfolge wurde auf die Anwesenheit der exozyklischen Amingruppe in C, A und G zurückgeführt. Diese Amingruppe kann sowohl direkt mit HOCl reagieren unter Bildung von Chloraminen, als auch Chlor von weniger stabilen Chloraminen der Ring-NH-Positionen aufnehmen.¹¹² Die gebildeten Chloramine wiederum wandeln sich in Radikalstickstoffverbindungen um, die mit dem Stickstoff in benachbarten Basen zu Stickstoff-basierten Dimerradikalen reagieren können.¹¹³

Reaktion mit Chlordioxid (ClO_2): ClO_2 agiert als Oxidationsmittel unter Aufnahme eines Elektrons und der Bildung des Chlorit-Anions (ClO_2^-). ClO_2 reagiert in DNA und RNA selektiv mit Guanin-haltigen Nukleotiden (wohingegen alle anderen Nukleotidbasen nicht oxidiert werden).^{114,115} Diese selektive Reaktivität kann auf das im Vergleich zu den anderen Nukleosiden niedrige Reduktionspotentials von Guanosin zurückgeführt werden.^{116,117}

Reaktion mit Ozon (O_3): Die Reaktion von Ozon mit RNA und DNA ist vielfach beschrieben.^{118,119} Ozon ist ein starkes Elektrophil das über Cycloaddition mit den Alkengruppen der Nukleotidbasen reagiert unter Bildung eines primären Ozonids, das anschliessend in verschiedene Crige-Produkte zerfällt.^{120,121} So führt die Reaktion von Ozon mit Basen der DNA zu einer Reihe von Produkten mit unterschiedlichen oxidativ-veränderten Basen.¹²² Die Zucker- und Phosphateinheiten von Oligonukleotiden reagieren nicht direkt mit Ozon, können aber durch Radikalsauerstoffspezies angegriffen werden, die im Ozonabbau entstehen. Die Reaktion von Ozon mit dem Virostatikum Zidovudin, ein Desoxythymidin-Derivat, und mit Thymin

resultiert in der Bildung verschiedener Oxidationsprodukte, in denen die Heterozyklen der Basen oxidativ gespalten wurde.¹²³ Analoge Umwandlungen unter Verlust der Basen sind für alle Oligonukleotidbasen zu erwarten.

Photolyse von ONs: Die stickstoffhaltigen Basen der Oligonukleotide absorbieren UVC-Licht (Wellenlängen von 205-280 nm) und können somit direkt photolytisch umgewandelt werden.^{124–127} Dabei weisen Pyrimidin-Basen (Thymin (T), Cytosin (C), und Uracil (U)) eine höhere Photoreaktivität mit UVC-Licht auf als die Purin-Basen (Adenin (A) und Guanin (G)).^{4,128} Neben den Reaktivitätsunterschieden der Basen hat auch die ON-Struktur einen Einfluss auf die Photolyseraten: die Ratenkonstanten nehmen in der Reihenfolge ssDNA > ssRNA $\approx$ dsRNA > dsRNA ab.¹²⁹ Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass unter UV-Bestrahlung ssRNA in Lösung etwa 24-fach schneller photolytisch umgewandelt wird als dsRNA, wohingegen dieser Unterschied bei DNA Molekülen weniger ausgeprägt zu sein scheint (ungefähr 4-fach schnellere Photolyse von ssDNA als dsDNA).¹²⁹

5.3.1 Implikationen für mONs

In der Abwasserbehandlung der Schweiz folgt auf die Primärstufe (mechanische Reining), die Sekundärstufe (biologische Reinigung) und die Tertiärstufe (chemisch-physikalische Behandlung, hauptsächlich zur Entfernung von Phosphat) die sogenannte vierte Reinigungsstufe, in der mittels chemischer Oxidationsmittel und/oder UV-Licht und Aktivkohlefilter sogenannte Mikroverunreinigungen aus dem Wasser entfernt werden. Da sowohl die chemische Oxidation also auch die UV-Photolyse zu Reaktionen an den Basen der mONs führen ist zu erwarten, dass sowohl Modifikationen am Zucker als auch an der Phosphatgruppe die Reaktivität der mONs nicht stark verändert im Vergleich zu den entsprechend nicht-modifizierten ONs. Die Basenmethylierung in 5-MC und 5-MU modifizierten ONs moduliert voraussichtlich deren Reaktivität mit obigen Oxidationsmitteln und UV-Licht, wird diese aber nicht zum Erliegen bringen. Die vierte Stufe der Abwasserbehandlung in der Schweiz wird somit voraussichtlich eine sehr effektive Barriere für mONs darstellen, und somit deren ungewollten Austrag aus Kläranlagen in Oberflächengewässer stark reduzieren. Diese Schlussfolgerung Bedarf jedoch einer experimentellen Validierung.

5.4 Enzymatischer Abbau

5.4.1 Enzymklassen und katalysierte Reaktionen

Natürliche Oligonukleotide unterliegen in verschiedenen Umweltkompartimenten einem raschen enzymatischen Abbau.¹³⁰ Im Vergleich zur Vielzahl an Studien über natürliche Oligonukleotide, existieren aber nur wenige Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von mONs. Weil die Enzymkatalyse in der Regel sowohl substrat- als auch enzymespezifisch ist, beschreiben wir hier Abbauprozesse von natürlichen Oligonukleotiden auf der Grundlage der beteiligten Enzymklassen. Das Verständnis von Enzymklassen ermöglicht es, die Auswirkungen chemischer

Modifikationen in mONs für den enzymatischen Abbau systematisch zu erörtern.

Relevante Enzymklassen nach gängiger Systematik¹³¹ sind Hydrolasen und Lyasen, welche Phosphodiesterbindungen durch zwei verschiedene chemische Mechanismen spalten können. Diese Enzymklassen werden im biochemischen Kontext unter dem Begriff der Nukleasen zusammengefasst. Je nach Typ können Nukleasen sowohl doppelsträngige als auch einzelsträngige Oligonukleotide sowie RNA und DNA spalten. Hydrolasen spalten Oligonukleotide durch eine Hydrolyse der Phosphodiesterbindung¹³² in kleinere Oligonukleotideinheiten und benutzen dazu u.a. Mg^{2+} , Zn^{2+} und Ni^{2+} als Kofaktoren für die Aktivierung von H_2O als Nukleophil. Gegenüber der abiotischen Reaktion, können diese Enzyme die Hydrolyse um bis zu 16 Grössenordnungen beschleunigen.¹³³ Die Enzym-Substrat-Spezifität der Nukleasen der Hydrolase-Familie ist im Detail untersucht und wird im Folgenden beschrieben, um deren Potenzial für den Abbau von mONs einzuschätzen. Lyasen folgen dagegen einem basenkatalysierten Eliminierungsmechanismus.¹³⁴ Über die Substratspezifität von Nukleasen der Lyase-Familie in der Umwelt ist wenig bekannt. Einige Lyasen sind in der Lage, sowohl unmodifizierte ONs als auch hairpin-mONs mit 5'-Fluorophoren und 3'-Quenchern zu spalten, um deren Aktivität in Echtzeit nachzuweisen.¹³⁵ Schliesslich können Nukleotidasen für weitere Abbauschritte relevant sein, indem sie Oligonukleotide, nach deren Reaktion mit Nukleasen durch Dephosphorylierung in Nukleoside umsetzen.¹³⁶ Diese Enzyme werden hier aber nicht im Detail diskutiert.

5.4.2 Systematik der Nukleasen anhand ihrer Enzym-Substrat-Spezifität

Die Substratspezifität von Nukleasen ergibt sich u.a. aus der *Zucker-* bzw. *Ribosespezifität*. Zuckerunspezifische Nukleasen können sowohl Oligonukleotide mit Ribosen (RNA) als auch Desoxyribosen (DNA) spalten und haben deshalb ein breites Substratspektrum.¹³⁷ (Abb. 5.2) Im Gegensatz dazu differenzieren zuckerspezifische Ribosen zwischen RNA und DNA. Die Spezifität zeigt sich auch in den intermolekularen Interaktionen der Enzyme mit Oligonukleotiden, die bei sequenzspezifischen Nukleasen höher ist.¹³⁸ Obwohl experimentelle Daten zur Substratspezifität von Nukleasen und mONs fehlen, ist davon auszugehen, dass zuckerunspezifische Nukleasen stärker zum Abbau von mONs in der Umwelt beitragen können.

Eine weitere Ausprägung der Substratspezifität führt zur Unterscheidung von *Exo-* und *Endonukleasen*. Während Exonukleasen die Spaltung ausschliesslich am 3'- oder 5'-Ende der Oligonukleotide katalysieren, können Endonukleasen diese Reaktion entlang der Oligonukleotidsequenz durchführen. Diese Präferenz kann Auswirkungen auf die Länge der Produktsequenzen haben. Restriktions-Endonukleasen sind prokaryotische Enzyme, die DNA-Regionen schneiden DNA-Bereiche an sog. "Restriktionsstellen" mit einer Länge von vier bis acht Basenpaaren. Zumindest im Fall von mONs, die in molekularbiologischen Labors verwendet werden, werden die Sequenzen auf das Vorhandensein von Restriktionsstellen geprüft, indem etablierte Restriktionsenzym-Datenbanken verwendet werden.¹³⁹ Restriktionsstellen könnten von mONs ausgeschlossen werden, um ihre Halbwertszeit zu verlängern und ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber mikrobiellen enzymatischem Abbau zu verbessern.

Zusätzlich zu den Restriktionsendonukleasen ist eine weitere zunehmend interessante Un-

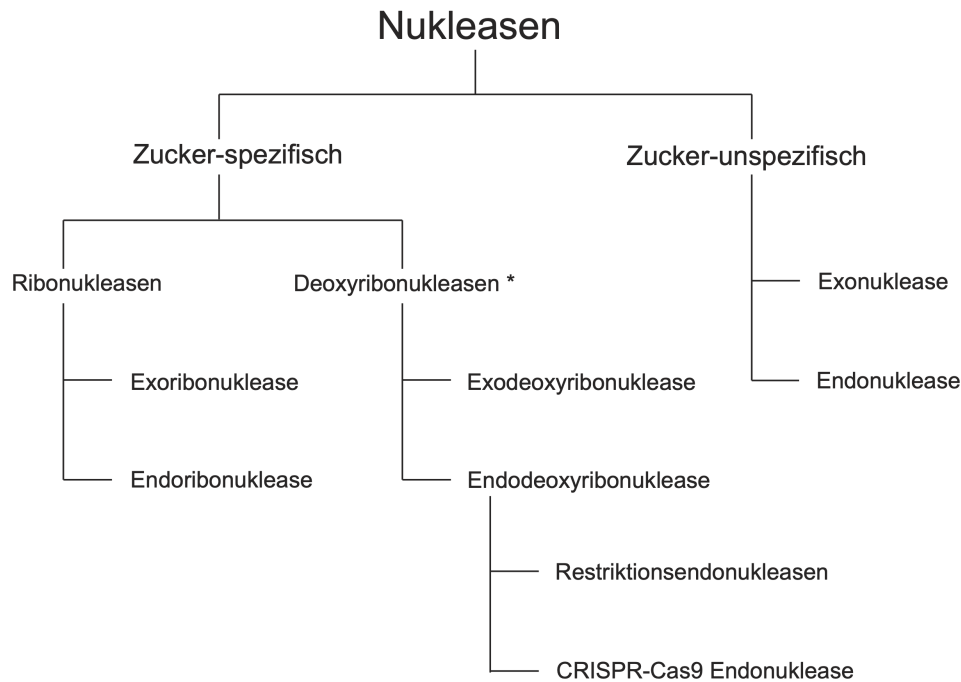


Abbildung 5.2 Einteilung von Nukleasen nach Spezifität der Enzyme-Substrat-Wechselwirkungen. Nukleasen können als Zucker-spezifisch oder unspezifisch eingeteilt werden. Des Weiteren gibt es Exonukleasen, die jeweils am Ende der Nukleinsäurekette ansetzen (also am 3' oder 5' Ende) oder Endonukleasen, die beliebig innerhalb der Sequenz schneiden. Zuckerspezifische Nukleasen können in Ribonukleasen (abhängig von der Ribose) oder in Deoxyribonukleasen (abhängig von der Deoxyribose) eingeteilt werden. Zusätzlich sind Schadensspezifische Nukleasen (*) Endo- oder Exodeoxyribonukleasen und Restriktionsnukleasen sowie CRISPR-Cas Nukleasen Endodeoxyribonukleasen.

terfamilie die der CRISPR-Cas-Endonukleasen. Diese Unterklasse von Endonukleasen, deren Entdeckung 2020 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde, ermöglicht eine präzise Genbearbeitung und findet breite Anwendung in Bereichen wie Landwirtschaft und Medizin.¹⁴⁰ Eine Studie zeigte, dass verschiedene modifizierte Oligonukleotide (mONs) die Aktivität von CRISPR-Cas12-Systemen verändern. Insbesondere zeigten 2'-O-Methyl-mONs eine normale CRISPR-Spaltungsaktivität, während 2'-Fluor-mONs die Aktivität von CRISPR-Cas12a moderat hemmten.¹⁴¹ PS-modifizierte mONs blockierten die CRISPR-Aktivität vollständig, insbesondere wenn sie in ihrer Länge der CRISPR-RNAs entsprachen (etwa 42–43 Nukleotide), was etw der durchschnittlichen Länge zugelassener mONs entspricht. Laufende Arbeiten untersuchen, wie 2'F-, 2'-OMe- und PS-Modifikationen der CRISPR-RNAs die Geneditierungsaktivität und -spezifität beeinflussen,¹⁴⁰ was CRISPR-RNAs als mögliche zukünftige Quelle mON-basierter Therapeutika positioniert.

Schadensspezifische Desoxyribonukleasen erkennen und spalten DNA an Stellen mit sogenannten “Schäden”, die beispielsweise durch chemische oder strahlungsbedingte Modifikationen wie Hydroxylierungen oder Alkylierungen auftreten. Inwieweit schadensspezifische Desoxyribonukleasen mit mONs reagieren können, ist bislang wenig erforscht. Einige spezialisierte chemische Modifikationen wie Triazol-Verknüpfungen¹⁴² oder Veränderungen der Basen und des

Rückgrats¹⁴³ wurden kürzlich in therapeutischen mON-Kandidaten eingeführt. Sie sollen mit strukturellen DNA-Schäden wie cross-linking oder Basenläsionen vergleichbar sein¹⁴⁴ und deshalb Nuklease-Aktivität auslösen. Daraus kann geschlossen werden, dass Modifikationen wie die Nukleobasen-Methylierungen 5-MC oder 5-MU (siehe Kapitel 2.1.5) eine Aktivierung von schadensspezifische Nukleasen hervorrufen könnten. Diese Methylierungen gleichen Schäden durch DNA-Alkylierung und lösen dadurch gezielte Reparaturmechanismen am mON aus.¹⁴⁵

5.4.3 Umweltrelevanz von Nuklease-Klassen

Die oben beschriebenen Nuklease-Typen sind allgemein verbreitet¹⁴⁶ und deshalb vermutlich in Böden, Abwässern und aquatischen Systemen anzutreffen¹⁴⁷. Diese Annahme bestätigt die Studie von Howard et al.²³, in welcher mehrfache und unterschiedlich häufige PS- und 2'-F-Modifikationen zur Erhöhung der Persistenz gegenüber unmodifizierten Nukleotiden von siRNA Pestiziden eingesetzt wurden. Damit zeigt die Studie indirekt auf, dass geläufige chemische Modifikationen den Abbau von mON durch Nukleasen hemmen.

Howard et al.²³ haben dazu verschiedene Nukleasegemische aus landwirtschaftlichen Böden und Insekten (Saliva der grünen Reisswanze, Darmnukleasen des Kartoffelkäfers) isoliert und damit die Integrität von siRNA im Vergleich zu Kontrollexperimenten ohne die Enzymextrakte getestet. In einem weiteren Experiment wurden zwei RNase III/Dicer-Enzyme aus *Giardia intestinalis* und *Escherichia coli* untersucht. Verschiedene Organismen besitzen Dicer-ähnliche Proteine, welche zucker-spezifische Endonukleasen darstellen, die zur Spaltung von doppelsträngiger siRNA beitragen. Mit beiden Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass PS- bzw. 2'-F-modifizierte siRNA weniger schnell als unmodifizierte abgebaut wird. Ob diese erhöhte Stabilität der mONs auf eine erschwerte Öffnung des Doppelstrangs oder eine langsamere Spaltung des Phosphodiesters aufgrund chemischer Modifikationen zurückzuführen ist, wurde nicht explizit festgestellt.

5.4.4 Auswirkungen chemischer Modifikationen auf Nukleaseaktivität

Aus den enzymatischen Mechanismen des Oligonukleotidabbaus lassen sich Hinweise für die Reaktivität von Nukleasen mit chemisch modifizierten Strukturelementen der mONs ableiten. Diese Reaktivität hängt aber von spezifischen Enzym-Substrat-Kombinationen zusammen, wie die wenigen, untersuchten Beispiele zeigen.

Einerseits katalysieren Nukleasen die Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats. Allerdings hängt dies auch von der Anzahl und Position von chemischen Modifikation wie PS- und PMO (Abb. 2.2 und 2.4) ab, welche zu einer Inhibition der Nukleaseaktivität führen könnten. So zeigte die Untersuchung eines aus 25 PMO-Substitutionen bestehenden ASOs, dass dieses mON von keiner der 13 getesteten Hydrolasen abgebaut werden konnte.⁴³ Dieses Erkenntnis ist für die Beurteilung der mON-Kategorie der SSOs relevant, welche aktuell als einzige PMO-Modifikationen aufweist (Tabelle 2.1).⁶² Andererseits verringert sich durch die Modifikation einzelner Strukturelemente des Rückgrats tendenziell die Stabilität gegenüber nukleolytischem Abbau. So wurde gezeigt, dass PS-Modifikationen an den beiden Enden der mONs wirksam den enzymati-

schen Abbau durch Exonukleasen hemmen, während dieser Effekt bei einzelnen terminalen PS-Modifikationen nicht ausreichte.¹⁴⁸ Modifikationen an einzelnen 2'-Positionen der Ribose (2'-F, 2'-OMe und 2'-MOE) bieten einen partiellen Schutz vor Abbau durch Nukleasen. Während diese Modifikationen das primäre Phosphodiester-Rückgrat oder die Nukleobase nicht verändern, beeinflussen sie die dreidimensionale Struktur der mONs. Das sogenannte Zuckerpuckern ("sugar puckering")⁴⁶ aufgrund von 2'-Substitutionen am Ribosering führt zu strukturellen Änderungen, welche die Aktivität von Nukleasen hemmen kann. Allerdings gilt diese Einschränkung nicht allgemein. Enzyme wie die RNase H schneiden mONs trotz der unterschiedlichen Konformation, welche durch Modifikationen wie LNA (welche aktuell nicht in Pharmaka verwendet wird), 2'-OMe und PS hervorgerufen werden.¹⁴⁹

Einen wichtigen Hinweis auf die enzymatische Spaltung von mONs mit den typischen, chemischen Modifikationen liefert die Arbeit von Moody et al.³⁷, welche neue Synthesewege für mONs mittels sogenannter Enzymkaskaden vorschlägt. In diesem Kontext werden bakterielle Endonukleasen der EndoV-Familie eingesetzt, um modifizierte Stränge von Oligonukleotiden von unmodifizierten Einheiten zu trennen. Diese Endonukleasen können Phosphodiesterbindungen zu Nukleotiden mit PS-, 2'-F, 2'-OMe, 2'-MOE und LNA Modifikationen effizient spalten. Um die Grenzen der Aktivität von EndoV-Nukleasen zu testen, beobachteten Moody et al.³⁷ den verlangsamten Abbau eines 18-LNA-mers. Diese LNA-Modifikation kommt in (aktuell nicht zugelassenen) Pharmaka höchstens an drei aufeinanderfolgenden Nukleotiden vor. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass verschiedene EndoV-Endonukleasen potenziell klinisch relevante mONs abbauen können. Ob die bakteriellen Nukleasen der EndoV-Familie aus dieser Studie auch in der Umwelt aktiv sind, ist vorerst unklar, weist aber auf ein Potenzial für die Abbaubarkeit vieler der aktuell eingesetzten chemischen Modifikationen hin. Allerdings können Nukleasen ausgeprägte Substratspezifitäten aufweisen. Beispiele sind die selektive Aktivität gegenüber einzel- oder doppelsträngiger DNA und RNA.¹⁵⁰

5.5 Aufnahme von mONs und Aufnahmebarrieren

5.5.1 Prokaryonten

Prokaryonten koppeln die Aufnahme von Nukleotiden und Basen an die gleichzeitige Sekretion von Nukleasen, was ihnen ermöglicht, extrazelluläre DNA im Boden und Sediment als Nahrungsquelle zu nutzen.⁷⁷ Die Aufnahme von mONs in prokaryontische Zellen erfolgt über verschiedene Mechanismen, abhängig von den unterschiedlichen Carriersystemen und der Art der Zelle.¹⁵¹ Einige prokaryontische Zellen sind von Natur aus kompetent, das heisst sie sind in der Lage, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Weltweit wurden über 80 verschiedene Bakterienarten als natürlich kompetent dokumentiert,¹⁵² aber der Anteil der Zellen innerhalb einer Population, die zu einem bestimmten Zeitpunkt zur Aufnahme freier DNA fähig sind, ist weder innerhalb noch zwischen den Arten einheitlich.¹⁵¹ Gramnegative Bakterien stehen vor grösseren Herausforderungen bei der Oligonukleotidaufnahme, da die Oligonukleotide durch zwei Membranen transportiert werden müssen.¹⁵¹

Darüber hinaus wurden zwar die molekularen Komponenten, die an der DNA-Aufnahme beteiligt sind, bei verschiedenen Arten charakterisiert, aber ihre Interaktion mit DNA und die genauen Mechanismen hinter der natürlichen Kompetenz bleiben weiterhin ungeklärt.¹⁵¹ Während grampositive Bakterien vor diesem Schritt eine zelloberflächengebundene Nuklease zur Spaltung der DNA nutzen,¹⁵³ fehlt ein vergleichbarer Mechanismus bei gramnegativen Bakterien.¹⁵¹ Für mONs, die gegenüber manchen Nukleasen resistenter sein können, könnte das Fehlen einer effektiven DNA-Fragmentierung jedoch gerade bei Grampositiven ein Problem darstellen, trotz ihrer vermeintlich "einfacheren" Zellwandstruktur.

Bei vielen grampositiven Bakterien, wie beispielsweise *Bacillus*, ist die DNA-Aufnahme ein struktureller und nicht-sequenzspezifischer Prozess.¹⁵⁴ Es ist jedoch bekannt, dass bestimmte Bakterien bevorzugt unmodifizierte ONs aufnehmen, deren Sequenzen definierten Aufnahme-Sequenzen entsprechen (die in den Genomen bestimmter Bakterien häufiger vorkommen).¹⁵⁵ Empirische Studien demonstrierten, dass ein konserviertes Motiv von etwa drei bis vier Basen-paaren erforderlich ist, um die Aufnahme von Oligonukleotiden zu ermöglichen.¹⁵⁵

Dadurch wird das Risiko von adversen Effekten (unerwünschte Nebenwirkungen die bspw. Morphologie, Wachstum, Physiologie und Entwicklung) in einer prokaryontischen Zelle minimiert. Die Möglichkeit, dass mONs anderweitig aufgenommen und eingebaut werden, z.B. durch Konjugation oder Transduktion, wird weiter in (Abschnitt 6.2.5) diskutiert.

5.5.2 Eukaryonten

Die Aufnahme von mONs in eukaryontische Zellen ist generell ineffizient, wie experimentell im Fall von PMOs gezeigt wurde.¹⁵⁶ Weitere Abklärungen zu diesem Thema müssen später noch in diesen Bericht aufgenommen werden (z.B. OECD¹⁵⁷). Im Gegensatz zu Prokaryonten können eukaryontische Zellen keine freie DNA direkt aufnehmen. Stattdessen muss ein Prozess wie die Endozytose erfolgen, bei dem die Plasmamembran sich einstülpt und Vesikel (Endosomen) bildet, was die mON-Sequenz vor biomolekularen Prozessen schützt. Fluoreszenzbasierte Studien zeigten jedoch, dass einige mONs, z.B. mit kationischen oder lipophilen Modifikationen von eukaryotischen Krebszelllinien in unterschiedlichem Masse aufgenommen wurden,¹⁵⁸ wobei die Aufnahme von moderater bis hin zu effizienter Endozytose schwankte.¹⁵⁹ Die Freisetzung eines im Endosomen eingeschlossenen mONs in das Zellinnere ist jedoch nur bedingt wahrscheinlich. Allerdings können verschiedene mON-Carriersysteme (Abschnitt 2.3) das Binden der mONs an Zelloberflächenrezeptoren vereinfachen und somit die Aufnahmewahrscheinlichkeit erhöhen.

Kapitel 6

Effekte

In diesem Kapitel werden potenziell schädliche Wirkungen von mONs erörtert, die im Rahmen der Umweltrisikoaanalyse relevant sein könnten. Aufgrund der komplexen molekularbiologischen Interaktionsmöglichkeiten von mONs mit zellulären Nukleinsäuren und Proteinen, sind verschiedene Effekte und verschiedene Wirkmechanismen bekannt. In der Literatur sind toxische, genotoxische und mutagene Effekte basierend auf verschiedensten Wirkmechanismen beschrieben worden. Die Erkenntnisse stammen mehrheitlich aus der pharmakologischen und humanbiologischen Forschung und basieren daher auf Arbeiten mit Zellkulturen und wenigen Tiermodellen (Ratte, Maus, Affen). Die Humantoxizität von mONs ist daher gut beschrieben und im Rahmen der Zulassungsprüfung der Pharmaka umfassend beurteilt worden. Umwelt- oder ökotoxikologisch orientierte Arbeiten wurden dagegen noch kaum durchgeführt.

Wie in Kapitel 3 aufgezeigt, werden wir in unserer Diskussion zwischen sequenzabhängigen und sequenzunabhängigen Effekten unterscheiden. Dies erlaubt einerseits die Berücksichtigung von Effektkategorien (öko)toxikologischer Art, die in der Umweltrisikoaanalyse von Pharmaka etabliert sind. Andererseits können Effekte berücksichtigt werden, die mit den spezifisch molekularbiologischen Interaktionen von mONs und deren Abbauprodukten in Zusammenhang stehen, wie sie eher für die Risikoanalyse von genetisch modifizierten Organismen (GMO) etabliert wurden. Diese Einteilung ist auch im Bezug auf die Beurteilung der Übertragbarkeit von Erkenntnissen auf zukünftige oder derzeit in Zulassung befindliche mON Pharmaka von Bedeutung. Während sequenzabhängige Effekte naturgemäss meist sehr spezifisch sind, da die notwendige Interaktion mit Zielstrukturen in der Zelle von der exakten Nukleotidsequenz oder der Positionierung der Modifikationen innerhalb des mONs abhängig ist, sind sequenzunabhängige Effekte eher auf mONs die dieselben oder ähnliche Modifikationen enthalten übertragbar. Andererseits besteht grundsätzlich die Möglichkeit, sequenzspezifische Interaktionen mit nicht-Zielstrukturen aufgrund von bioinformatischen Analysen vorherzusagen. Der einfachste Fall wäre demnach die Suche nach komplementären Sequenzen im Genom von Umweltorganismen, die mit dem ON oder mON hybridisiern könnten.¹⁶⁰ Erfahrungen oder Forschungsergebnisse zur Effizienz dieses Ansatzes fehlen aber weitestgehend.

Neben Effekten der intakten mONs werden in der Literatur auch Effekte der monomeren Bestandteile von mONs, also der Nukleosid- beziehungsweise Nukleotid-Analoga, beschrieben.¹⁶¹

Für die Umweltrisikooanalyse ist daher auch das Verhalten der monomeren Abbauprodukte grundsätzlich zu berücksichtigen. Die Literatur zu mON-Monomeren umfasst auch Studien zu Pharmaka die direkt auf Nukleosid- und Nukleotid-Analoga basieren (siehe Abschnitt 6.1.1). Viele der dort beschriebenen Modifikationen werden in den derzeit zugelassenen mON Pharmaka nicht verwendet. Angesichts des Fehlens von Forschungsergebnissen zu Effekten in Umweltorganismen haben wir uns entschieden, auch Erkenntnisse zu diesen Modifikationen in Abschnitt 6.1.1 teilweise mit zu berücksichtigen, um das Effektpotential von mONs möglichst umfassend zu charakterisieren.

6.1 Sequenzunabhängige Effekte

In diesem Abschnitt behandeln wir Effekte, die nicht von der Nukleotidsequenz abhängig sind bzw. der dadurch bedingten Sekundär- oder Tertiärstruktur eines mONs. Bei unmodifizierten ONs (unmodifizierte einzel- oder doppelsträngige DNA und RNA) werden gemeinhin keine sequenzunabhängigen toxischen Effekte erwartet. Diese sind in lebenden Zellen stets vorhanden und können leicht und ohne toxische Abbauprodukte abgebaut werden (siehe Kapitel 5.4). Auch bei unmodifizierten Nukleosiden und Nukleotiden sind toxische Wirkungen nur bei sehr hohen Konzentrationen bekannt (z.B. Adenosin¹⁷⁷). Die hier beschriebenen Effekte gehen also direkt auf die chemischen Modifikationen der mON bzw. der enthaltenen Monomere zurück.

6.1.1 Toxizität und Genotoxizität

Toxische Effekte von modifizierten Nukleosiden sind in der Literatur häufig beschrieben worden. Humantoxische Wirkungen modifizierter Nukleoside oder Nukleosidanaloga sind vor allem aus ihrer Anwendung in der AIDS-Therapie und anderen antiviralen Medikamenten bekannt.^{161,178,179} Die Toxizität der antiviralen Nukleosidanaloga basiert in erster Linie auf ihrer Interaktion mit der mitochondrialen DNA-Polymerase, was dazu führt, dass Nukleosidanaloga während der Reproduktion in die mitochondriale DNA eingebaut werden. Dies wiederum verursacht einen vorzeitigen Abbruch der DNA-Synthese und letztendlich eine beeinträchtigte Funktion der Mitochondrien. Die mitochondriale Toxizität dieser Analoga hängt stark von der spezifischen Modifikation ab.¹⁸⁰

Toxische Effekte sind auch von fluorierten Nukleotiden bekannt. 5-Fluorouracil (5-FU), ein Pyrimidin und Uracil-Analog, ist wegen seiner starken zytotoxischen Wirkung bekannt und findet, mit diversen Modifikationen, in der Krebstherapie Anwendung. Die Wirkung basiert auf der Störung der DNA- und RNA-Synthese.¹⁸¹ Die bisher diskutierten, in der Virus- oder Krebstherapie verwendeten modifizierten Nukleoside und Nukleotide werden jedoch in der Regel nicht in therapeutische mONs eingebaut.²⁸ Ebenso sind die in therapeutischen ONs verwendeten Modifikationen nicht wie antivirale Pharmaka darauf ausgelegt, mit der DNA- und RNA-Verarbeitung zu interagieren, und bei einigen Modifikationen, wie PS ist es unwahrscheinlich, dass sie in die DNA eingebaut werden.¹⁶¹

Berman et al.¹⁶¹ diskutieren die Genotoxizität von mONs und weisen dabei ebenfalls auf

Tabelle 6.1 Zusammenfassung der Literaturrecherche zur Toxizität und Genotoxizität von Modifikationen, welche in zugelassenen Oligonukleotid-Therapeutika verwendet werden. Es ist zu beachten, dass Toxizität in vielen Fällen stark von der spezifischen Sequenz bzw. Struktur de mON und der Kombination mit weiteren Modifikationen im selben Oligonukleotid beeinflusst wird. Daher sind die aufgeführten Informationen nicht unbedingt allgemeingültig.

	PS	PMO	2'-F	2'-MOE	2'-OMe	5-MC	5-MU
<i>Oligonukleotide</i>							
Toxizität	Ja ^{26,162,163}	Niedrig ¹⁶⁴	Ja ¹⁶⁵	Niedrig ¹⁶⁶⁻¹⁶⁸	Niedrig ¹⁶⁹	NA	Nein ^a
Genotoxizität	Nein ¹⁶²	Nein ¹⁷⁰	Evt. ¹⁷¹	Nein ¹⁷²	Nein ^{166,173}	Nein ¹⁷³	NA
<i>Monomere</i>							
Toxizität	NA	NA	Ja, z.T. stark ¹⁷⁴	NA	NA	NA	NA
Genotoxizität	NA	NA	Evt. ¹⁷¹	Niedrig ¹⁷⁵	NA	NA	NA

^a 5-Methylcytidin ist eine natürlich vorkommende methylierte Modifikation und wird nicht als toxisch angesehen.¹⁷⁶ NA = not available.

die potenzielle Genotoxizität der Monomere hin, die nachweislich interzellulär gebildet werden können. Modifizierte Nukleotide können bei der DNA-Synthese in neugebildete DNA eingebaut werden, was zu verschiedenen Schäden oder Mutationen an der DNA führen kann. Obwohl die Autoren aufgrund der Eigenschaften der in mON Pharmaka verwendeten Modifikationen diese Risiken als nur hypothetisch einschätzen, empfehlen sie Genotoxizitätstests für diese. Solche Prüfungen würden auch relevante Daten für eine Umweltrisikoanalyse liefern.

2'-F-modifizierte Nukleoside, die auch in mONs verwendet werden, weisen je nach der Modifikation an weiteren Strukturelementen unterschiedliche Toxizität auf, wobei für Menschen bzw. Tiermodelle sichere Varianten bekannt sind.¹⁷⁴ In einigen Studien wurde auch Immuntoxizität für solche Verbindungen festgestellt. Weitergehende Studien zur Umwelttoxizität dieser Verbindungen liegen aber nicht vor.

Grundsätzlich können modifizierte Nukleoside und Nukleotide also erhebliche toxische und genotoxische Wirkungen aufweisen. Gemäss aktueller Literatur erscheint aber die Toxizität von Monomeren typischer mONs gering zu sein. Diese Erkenntnis basiert allerdings im wesentlichen auf Studien an Zellkulturen und wenigen Tier-Modellen. Daher können unbeabsichtigte Wechselwirkungen von monomeren Bestandteilen von mONs mit DNA- oder RNA Polymerasen verschiedenster Organismen mit toxischen Auswirkungen nach gegenwärtigem Wissensstand nicht ausgeschlossen werden.

6.1.2 Sequenzunabhängige Toxizität von mONs

mONs mit Rückgrat-Modifikationen können unabhängig von der Basenfolge toxische Effekte auslösen. Im Fokus sind hierbei insbesondere PS Modifikationen von verschiedenen zugelassenen mON-Therapeutika.^{28,182} PS-modifizierte mONs interagieren mit diversen Proteinen und einige dieser Interaktionen können über eine Wirkungskaskade toxische Effekte auslösen.²⁶ Obwohl diese Effekte nicht per se sequenzabhängig sind, können positionsabhängige Modifikationen diese toxischen Effekte stark einschränken oder gar beseitigen.²⁶ Toxische Effekte bei Rhesus-Affen wurden auf die Komplementaktivierung (ein Mechanismus der Immunantwort) zurückgeführt. PS Modifikationen können demnach also zu Immuntoxizität führen.¹⁶²

Toxizität von PS-modifizierten mONs erscheint insgesamt aufgrund der dokumentierten Erkenntnisse als ein relevanter Mechanismus sequenzunabhängiger toxischer Effekte. Die Literatur beruht auch hier auf Studien an Zellkulturen und Tiermodellen. Spezifische Studien zur Wirkung auf Umweltorganismen oder zur Umwelttoxizität sind nicht bekannt.

6.2 Sequenzabhängige Effekte

Unter sequenzabhängigen Effekten verstehen wir solche Effekte von ON oder mON, die abhängig von der Abfolge der Nukleotide sind und somit vom spezifischen Informationsgehalt der Nukleotidsequenz bestimmt sind oder von dieser beeinflusst werden. Die therapeutische Wirkung von mON-basierten Therapeutika ist selbst in solchen sequenzabhängigen Effekten begründet. Typischerweise beruht diese auf der spezifischen Bindung an Zielstrukturen meist via Hybridisierung

an zelluläre Nukleinsäuren oder im Fall von Apatmeren über die Bindung an Proteinstrukturen (siehe Kapitel 1 und Abbildung 1.1). Neben dem gewünschten Bindungsverhalten besteht stets die Möglichkeit, unerwünschter und unvorhergesehener Interaktionen, inklusive der Auslösung von Mutationen oder Veränderungen in der Keimbahn, entweder im behandelten Organismus selbst (Nebenwirkungen) oder in Nicht-Zielorganismen, die mit der Substanz in der Umwelt in Kontakt kommen und diese aufnehmen. Im Bereich der sequenzabhängigen Effekte können wiederum eine Reihe verschiedener Mechanismen unterschieden werden.

6.2.1 (Geno)Toxizität von Modifikationen

Für die Modifikationen in den aktuell zugelassenen Therapeutika (PS, PMO, 2'-F, 2'-MOE, 2'-OMe, 5-MC, 5-MU) wurde spezifisch nach Literatur zur Toxizität und Genotoxizität von Nukleotiden und Oligonukleotiden mit diesen Modifikationen gesucht. Die Ergebnisse der Literaturrecherche sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Diese (unvollständige) Literaturübersicht zeigt deutlich, dass die potenziellen Toxizitäts- und Genotoxizitäts-Risiken der Modifikationen sehr unterschiedlich bewertet werden. Es ist grundsätzlich davon auszugehen, dass diese Bewertungen für die Human- und Zelltoxizität sich in der Tendenz auch auf andere Organismen übertragen lassen. Insofern können diese Informationen aus der pharmakologischen Forschung ein nützlicher Ausgangspunkt für die weitere Umweltrisikobewertung von mON sein, oder sie können der Priorisierung von umwelttoxikologischen Studien dienen.

6.2.2 Sequenzabhängigkeit von toxischen Nebenwirkungen

Es wurde in verschiedenen Studien beobachtet, dass toxische Effekte von mONs sequenzabhängig sein können, bzw. von der Positionierung der Modifikationen innerhalb des mONs abhängig ist. Croft et al.¹⁶³ untersuchten in einer umfangreichen Studie die Toxizität von 277 Varianten von PS und 2'-OMe modifizierten Oligonukleotiden auf zwei Krebszelllinien. Die Autoren stellten dabei fest, dass die Toxizität eine Sequenzabhängigkeit zeigte und höhere Toxizität korrelierte mit der Bildung von hairpin Strukturen (Sekundärstruktur durch Selbst-Hybridisierung innerhalb der Oligonukleotide) und mit einem höheren Purin-Gehalt. Shen et al.¹⁶⁵ fanden, dass PS und 2'-F-modifizierte Gapmere bei Mäusen zytotoxische Wirkungen (Hepatotoxizität) aufweisen und dass die Toxizität abhängig von der mON Sequenz ist. Weitere Untersuchungen führten zu der Annahme, dass die Toxizität durch die Bindung des mONs an intrazelluläre Proteine verursacht wird und nicht auf die Hybridisierung zurückzuführen ist. Man kann aus diesen und ähnlichen Ergebnissen schliessen, dass sequenzabhängige Effekte von mONs variieren können, dass diese aber auf komplexe Interaktionen zurückgeführt werden können (interne Strukturbildung oder mON-Protein Interaktionen) die wahrscheinlich bioinformatisch schwer vorhersehbar sind. Die Übertragbarkeit von Risikoeinschätzungen zwischen Sequenzvarianten eines mONs ist jedenfalls nicht, oder nur eingeschränkt, gegeben.

6.2.3 Sequenzspezifische off- und non-target Effekte bei Nichtzielorganismen

Gelangen mON Pharmaka in die Umwelt und werden von Umweltorganismen aufgenommen, kann die spezifische Interaktion des mON Wirkstoffes auch bei diesen Organismen auftreten, sofern entsprechende homologe zelluläre Zielstrukturen vorhanden sind. Die Wahrscheinlichkeit solcher Interaktionen nimmt vermutlich tendenziell bei geringerem Verwandtschaftsgrad der Organismen mit dem Zielorganismus (meist *Homo sapiens*) ab. Dies hängt aber auch mit der Verbreitung entsprechender genetischer Mechanismen bei anderen Arten und dem Grad der Konservierung der Gensequenz ab. Bei Schädlingsbekämpfungsmitteln auf Oligonukleotidbasis ist genau dies ein entscheidendes Risiko: Die Aufnahme des Wirkstoffs und die negativen Auswirkungen auf Nichtzielorganismen, z. B. auf andere Insekten als den zu bekämpfenden Schädling (OECD 2020). Die tödliche Wirkung des Wirkstoffs kann bei Nichtzielarten eintreten, wenn diese die gleiche oder ein hinreichend ähnliche molekulare Zielstruktur enthalten, was entweder zu tödlichen oder Wachstums-hemmenden Wirkungen führt.¹⁸³

Der Hauptunterschied von ON-Pestiziden zu mON Pharmaka ergibt sich aus der Art der Anwendung und den beabsichtigten Wirkungen. Bei ON-Pestiziden erfolgt die Anwendung direkt in der Umwelt, der Wirkstoff wird in ausreichender Konzentration verwendet, um den anvisierten Schädling zu bekämpfen, daher werden auch viele andere Organismen einer potenziell wirksamen Dosis ausgesetzt. Anders verhält es sich bei mON Pharmaka, deren Transportwege in die Umwelt passiver über primär den medizinischen Einsatz, und daher sehr viel eingeschränkter sind (siehe Kapitel 4 und 5). Wir erwarten daher eine sehr viel geringere Exposition. Zweitens sind die beabsichtigten Wirkungen der Pharmaka natürlich gerade nicht eine Schädigung des Zielorganismus, sondern eine gezielter therapeutischer Eingriff durch Ausschaltung (silencing), Regulierung oder Aktivierung der Genexpression in einem erkrankten Individuum. Oligonukleotid-Pestizide greifen für ihre letale Wirkung in zentrale Prozesse des Stoffwechsels ein (z.B. Proteinsynthese), bei Pharmaka sind es diverse aber allgemein nicht letale Prozesse die beeinflusst werden.

Zusammenfassend ergibt sich das Risiko von mONs für Nichtzielorganismen vor allem aus ihrer potenziellen Aufnahme und spezifischen molekularen Wirkung bei Organismen mit konservierten Zielstrukturen, wobei die Wahrscheinlichkeit mit zunehmendem phylogenetischem Abstand tendenziell abnimmt, jedoch nicht ausgeschlossen werden kann. Studien, die entsprechende Effekte von mON Pharmaka bei Nichtzielorganismen belegen oder ihre Abwesenheit dokumentieren, wurden nicht gefunden.

6.2.4 Sequenzspezifische Effekte bei Nichtzielorganismen mit komplementären Zielstrukturen

Neben dem ursprünglichen Zielgen bzw. der anvisierten Zielsequenz oder Zielstruktur im menschlichen Genom, Transkriptom oder Proteom können mONs grundsätzlich auch mit anderen Zielstrukturen (DNA, RNA, Proteine) interagieren, wenn Strukturen existieren, welche Abschnitte enthalten, die mit dem mON sequenzspezifisch interagieren können. Zum Beispiel können dies andere Gene oder mRNAs sein, die komplementäre Sequenzen zum mON aufweisen und so für eine Hybridisierung zur Verfügung stehen. Schon in der therapeutischen Anwendung (also beim

Patienten) besteht die Möglichkeit, dass zusätzliche Zielstrukturen (z.B. die mRNA anderer Gene) mit dem mON interagieren (z.B. hybridisieren). Alternativ kann es sich um Proteine handeln, mit denen das mON aufgrund komplementärer dreidimensionaler Strukturen und Bindungsstellen spezifische Wechselwirkungen eingeht. Diese off-target Effekte sind ein wichtiges Element der Risikoevaluation für mONs.¹⁶⁰ Solche off-target Effekte können auch in Nichtzielorganismen auftreten, wenn ein mON aufgenommen wird. Zur Unterscheidung vom etablierten Begriff “off-target” schlagen wir vor, diese Effekte als “non-target” Effekte zu bezeichnen. Da mONs eher kurz sind, Interaktionen auch bei nur teilweisen Sequenzübereinstimmungen möglich sind,¹⁶⁰ und Modifikationen der mONs zum Teil dafür entworfen sind die Bindungen an Zielstrukturen zu stabilisieren, muss diese Möglichkeit in Betracht gezogen werden, auch wenn die Wahrscheinlichkeit im Einzelfall sehr gering sein dürfte. Ob off-target Interaktionen für eine Umweltrisikoevaluation relevant sind, hängt wohl sehr stark davon ab, ob entsprechend hohe Dosen bei Organismen in der Umwelt erwartet werden können (d.h. nach Emission, Exposition und Aufnahme in die Zelle), die entsprechende Wirkungen hervorrufen.

Neben der regulativen Wirkung von mONs sind aber noch andere Interaktionen denkbar, die zum Beispiel zur Mutagenese führen. Solche genotoxischen oder mutagenen Effekte sind möglicherweise schon bei geringeren Expositionen relevant. Angesichts der enormen Sequenzvielfalt in der Umwelt dürfte das Potenzial für solche Wechselwirkungen bestehen. Das es grundsätzlich möglich ist, dass solche Interaktionen dann zu negativen Effekten führen, zeigen die Erkenntnisse zur Induktion von Mutationen oder anderen Effekten, die durch ON und mON ausgelöst werden können. Hier diskutieren wir im folgenden insbesondere den Mechanismus der Triple-Helix Bildung und Mutagenese durch ortsspezifische homologe Rekombination (site specific homologous recombination).

Sequenzabhängige Effekte durch Triple Helix Bildung

Die Triple-Helix ist eine Nukleinsäurestruktur, bei der ein dritter Strang der DNA oder RNA an die grosse Furche einer doppelsträngigen DNA-Helix (dsDNA) bindet und so eine dreisträngige Struktur, eine sogenannte Triplex, bildet (Siehe Abbildung 6.1). Diese Wechselwirkung ist in der Regel sequenzspezifisch und beruht auf Hoogsteen- oder Reverse-Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen, die sich von den Watson-Crick-Basenpaarungen der normalen dsDNA unterscheiden.¹⁸⁴ Verschiedene Motive werden mit der Bildung stabiler Triple-Helices in Verbindung gebracht. Die Verwendung von Triple-Helix formende Oligonukleotide (TFO) bedingt das Vorhandensein von Oligopyrimidin-Oligopurin-Sequenzen in der DNA-Zielsequenz und ist durch die relativ geringe Stabilität der Dreifachhelixstruktur (im Vergleich zur Doppelhelix selbst) beschränkt.

Indem die dreifach-helikale Struktur auf der DNA den Transport von RNA-Polymerasen blockiert, können entsprechende ON und mON zum gene-silencing eingesetzt werden.¹⁸⁵ TFOs sind somit eine eigene ON bzw. mON-Wirkstoffklasse. Aus dieser Klasse sind allerdings noch keine zugelassenen Pharmaka bekannt.²⁸

Modifikationen sind insofern relevant, als mON wesentlich stabilere Triple-Helix Bindungen

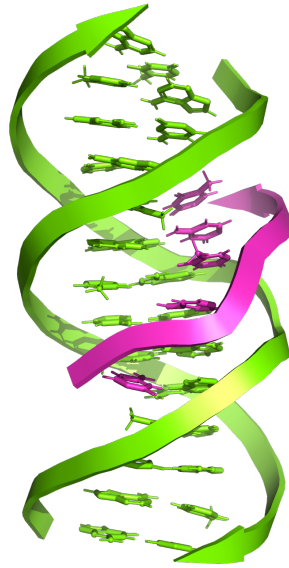


Abbildung 6.1 Triple-Helix-DNA-Struktur (PDB: 1BWG). Die Abbildung zeigt das Entstehen eines Triple-Helix durch das Binden eines mONs (pink) und eine vorherrschende doppelsträngige DNA-Struktur (grün). mONs bilden wesentlich stabilere Triple-Helix-Bindungen als unmodifizierte ONs. CC BY-SA 4.0 (Wikimedia Commons).

eingehen als unmodifizierte ON. Verschiedene Modifikationen an Basen (z.B. 5-MC), Zucker (z.B. 2'-OMe, LNA) und am Rückgrat (PS, PNA) werden eingesetzt und können erheblich zur Stabilisierung der Triple-Helix Struktur beitragen.¹⁸⁶ Somit besteht im Zusammenhang mit Triple-Helix Bildung neben möglichen unbeabsichtigten Auswirkungen auf die Genexpression auch ein Mechanismus für sequenzspezifische mutagene Wirkungen von mONs. Diese Modifikationen werden teils auch in aktuell zugelassenen mON genutzt.²⁸ Somit besteht das Potenzial, dass auch solche Oligos Triple-Helix Bindungen eingehen können, wenn strukturell passende Zielstrukturen in einem Genom vorhanden sind. Insofern kann Triple-Helix Bildung ein möglicher Mechanismus sein, der in Organismen mit entsprechenden Zielsequenzen unbeabsichtigte Veränderungen der Genexpression oder auch Mutationen auslösen könnte.

Induktion von Mutationen durch homologe Rekombination

Grundsätzlich ist homologe Rekombination, also der Einbau einer Fremd-DNA in das Genom einer Zelle auch mit recht kurzen ON Sequenzen möglich. In *E. coli* wurde die Mindestlänge einer homologen Region zwischen zwei ansonsten nicht homologen zirkulären Duplexmolekülen, die eine Rekombination ermöglicht, durch Plasmid-Phagen-Kointegration in vivo gemessen und auf 20 bis 40 Nukleotidpaare geschätzt.⁸⁰ Swingle et al.¹⁸⁷ demonstrierten die RecA (Phagen-Rekombinase) -unabhängige Rekombination von ON, wenn auch mit geringer Effizienz und merken an, dass dieser Mechanismus auch in Archaea und Eukaryonten konserviert ist. Oligonukleotide können in der Genetik für die ortsgerichtete Mutagenese in vitro und in vivo verwendet werden.^{188–190} Auch diese Verfahren basieren auf homologer Rekombination des

Oligonukleotids mit dem Genom des Zielorganismus und der Aktivität von zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen. Dabei handelt es sich jedoch um gezielte, hochgradig konstruierte in vitro- oder in vivo Verfahren. Modifikationen können wiederum die Bindung verstärken und damit die Effizienz der Transformation verbessern, oder spezifisch zur Induktion von Mutationen beitragen.¹⁹⁰ Wang et al.¹⁹¹ verwendeten mON mit 20-Fluor-Uridin, 5-Methyl-Deoxy-Cytidin, 2,6-Diaminopurin oder Isodeoxy-Guanosin, um die Erkennung und Reparatur von Fehlpaarungen zu vermeiden. Diese Strategie erhöhte die Effizienz des transienten Allel-Ersatzes um das bis zu 20-fache. Diese Studien belegen grundsätzlich die Möglichkeit, dass mONs auch über homologe Rekombination Mutationen induzieren können.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sequenzabhängige Effekte sehr spezifische Interaktionen voraussetzen. Insgesamt erscheint die Wahrscheinlichkeit über diese Mechanismen massgebliche negative Effekte in Umweltorganismen oder Ökosystemen auszulösen eher gering, aber dies ist auch im Gesamtzusammenhang mit einer Bewertung der Einträge, Persistenz, Exposition, und Anreicherung zu stellen.

6.2.5 Transformation und Gain-of-Function durch Gentransfer

Gentransfer, d.h. die Weitergabe von genetischer Information an andere Organismen ist eine wichtige Risikokategorie bei gentherapeutischen Ansätzen, die längere (kodierende) Sequenzen beinhalten welche entweder Teil des Wirkmechanismus sind oder als genetische Marker verwendet werden (z.B. Antibiotikaresistenzen). Bei manchen Verfahren können kodierende Sequenzen auch als Elemente eines carriers in das Genom gelangen (z.B. virale DNA, wenn Viren als carrier verwendet werden). Für den horizontalen Gentransfer sind verschiedene Mechanismen relevant: neben der direkten Aufnahme von DNA aus der Umwelt (möglich unter bestimmten Bedingungen und in bestimmten Organismen - Kompetenz) und ihrem Einbau (z.B. durch homologe Rekombination) in das Genom der aufnehmenden Zelle (Transformation) ist auch der aktive Transfer von Plasmiden (relativ kurze zirkuläre DNA) zwischen prokaryontischen Zellen relevant (Konjugation). Die homologe Rekombination ist aufgrund der geringen Länge der mON Therapeutika und der notwendigen Überlappung mit der chromosomalen DNA (ca. 15 bp) nicht sehr wahrscheinlich. Weiterhin kann kodierende DNA auch durch Viren bzw. Phagen übertragen werden (Transduktion).¹⁹²

Diese Mechanismen sind für die Risikobewertung bei GMO wichtig.⁸³ Hier muss unter anderem das Risiko berücksichtigt werden, dass sich künstlich veränderte Gensequenzen via horizontalem Gentransfer auf andere Organismen ausbreiten und dort dem Organismus neue, potenziell unerwartete Eigenschaften verleihen, mit potenziell negativen Auswirkungen auf Ökosysteme oder im Fall von Krankheitserregern auf die Gesundheit von Menschen, Tieren oder Pflanzen. Zusammen mit dem neuen Träger der genetischen Funktion könnte sich diese unter Umständen unkontrolliert in der Umwelt ausbreiten. Bei GMO ist natürlich auch das Risiko der Freisetzung des GMO selbst relevant, inklusive des Risikos der unerwünschten Proliferation dieses Organismus in der Umwelt. Zu diesen Themen existiert eine umfangreiche Literatur.

Die Sequenzen der mON sind kurz und kodieren nicht für Proteinsequenzen bzw. Funktionen

unabhängig von der regulativen Wirkung für den therapeutischen Zweck. Ihre Wirkung liegt vielmehr in der Interaktion mit Zielmolekülen in der Zelle des behandelten Organismus. Abgesehen von möglicherweise durch mON oder modifizierte Nukleotide induzierte Mutationen (siehe oben) werden auch keine Veränderungen am Genom des behandelten oder exponierten Organismus verursacht, die ihrerseits durch Gentransfer weiterverbreitet werden könnten. Selbst für den Fall, dass ein mON sich in ein konjugatives Plasmid oder ein Phagenpartikel inkorporiert, ist aufgrund der nicht vorhandenen Transkribierbarkeit der mON-Sequenz eine Kausalkette zu negativen Auswirkungen nur schwer vorstellbar. Für die hier im Zentrum stehenden kurzkettigen modifizierten Oligonukleotide sind diese Effektkategorien daher nicht relevant.

6.2.6 Bioinformatische Effektabschätzung

In aktuellen Arbeiten wurden bioinformatische Ansätze zur Abschätzung des hybridisierungsabhängigen off-target-Risikos von mON-Therapeutika *in silico* als Teil eines Risikobewertungs-Workflows vorgeschlagen.¹⁶⁰ Während sich dieser vorgeschlagene Workflow in Abbildung 6.2 auf die Risikobewertung für klinische Anwendungen konzentriert und somit die Interaktionen mit anderen Genen und Zelltypen im menschlichen Körper berücksichtigt, könnte derselbe Ansatz prinzipiell genutzt werden, um das Nicht-Ziel-Bindungspotenzial in Umweltorganismen zu bewerten. Im Kern beinhaltet der Ansatz den Abgleich von Oligonukleotid-Sequenzen mit Transkriptomdaten, um Bereiche der Sequenzkomplementarität zu identifizieren.¹⁶⁰ Aufgrund der hohen Rate an falsch-positiven Ergebnissen ist dies am besten mit einer experimentellen Verifizierung durch RNA-Sequenzierung (RNASeq) vereinbar, um komplementäre Sequenzen zu priorisieren und *in silico* vorhergesagte off-target-Effekte zu bestätigen (Abb. 6.2). Zusätzliche Entwicklungen sind jedoch noch erforderlich, um einen solchen Arbeitsablauf in der Umwelt-Risikobewertung anwenden zu können.

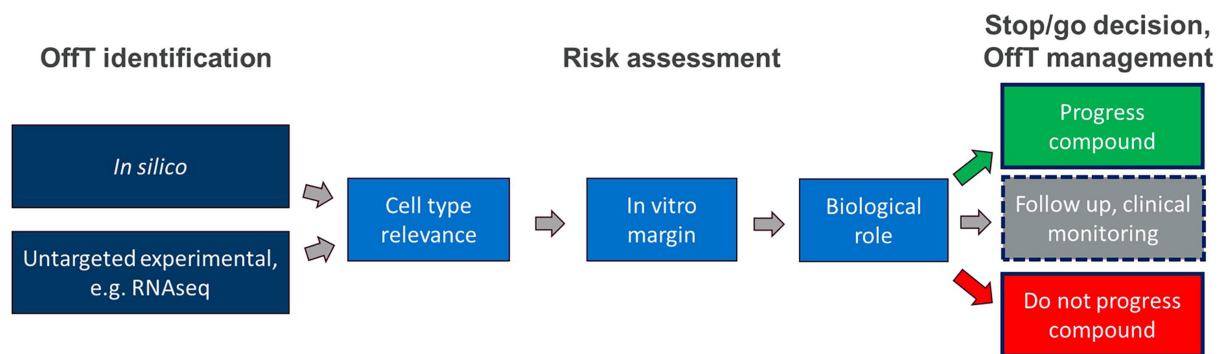


Abbildung 6.2 Workflow aus Andersson et al.¹⁶⁰ als möglicher Ansatz für eine bioinformatisch-basierte Risikobewertung von sog. hybridisierungsabhängigen off-target effects (OffT).

6.2.7 Vergleich der Effektkategorien von mON mit anderen gentechnischen Anwendungen

Basierend auf der Diskussion in diesem Kapitel können wir Parallelen und Unterschiede bei erwartbaren Effekten bzw. Risikobewertung von mONs im Vergleich zu anderen biologischen

oder gentherapeutischen Risiken zusammenfassen (Tabelle 6.2).

Die Tabelle zeigt zum Beispiel sehr deutlich, dass die Risikokategorien von mON und genveränderten Organismen (GMO) fundamental, das heisst in den meisten Kategorien, sich unterscheiden. Es gibt mehr Gemeinsamkeiten aber ebenfalls noch Unterschiede zu den Effektkategorien von anderen nukleinsäurebasierten Materialien wie z.B. freie Nukleinsäuren (z.B. DNA mit Risikofaktoren wie Genmodifikationen, Antibiotikaresistenzgenen, u.ä.), RNA-Vakzinen, In-vivo Gentherapien, etc. Es erscheint daher sinnvoll, die Risikobeurteilung von mON im Rahmen einer Umweltverträglichkeitsprüfung, eventuell zusammen mit anderen nicht eigenständig replikationsfähigen Nukleinsäurebasierten Materialien, auf eine eigene Grundlage zu stellen.

Diese Zusammenstellung zeigt, dass bei mONs erhebliche Unterschiede zur Risikoanalyse z.B. von GMO, mRNA-Vakzinen (sog. längere therapeutische NA-Konstrukte) oder Gentherapien (ONs, mONs) in Betracht gezogen werden sollten. Es wird zudem deutlich, dass die Modifikationen der mON in einigen Effektkategorien neue oder veränderte Risiken im Vergleich zu ähnlichen, nicht-modifizierten genetischen Materialien verursachen. Diese Aspekte sollten bei einer Prüfung von mON daher insbesondere beachtet werden.

Tabelle 6.2 Vergleich verschiedener Effektkategorien mit Relevanz für die Risikoanalyse verschiedener genetisch aktiver oder gentechnologischer Materialien im Vergleich zu mONs. Die Spalte Abschnitt gibt Verweise zu den entsprechenden Kapitel an.

#	Effektkategorien	GMO	Freie unmodifizierte DNA/RNA	Längere therapeutische NA-Konstrukte	ONs	mONs	Abschnitt
1	Direkte Toxizität	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja ^{179,180}	6.1.1, 6.2.1, 6.2.2
2	Negative Auswirkungen auf Nicht-Zielorganismen	Ja	Nein	Nein	Ja	Selten oder Nein	6.2.3, 6.2.4
3	Funktionale Modifikation via Triple-Helix-Bildung	Nein	Ja	Ja	Selten ¹⁶¹	Potenziell veränderte Stabilität	6.2.4
4	Transfer genetisch kodierter Funktionen (veränderter Phänotyp)	Ja	Ja	Potenziell Ja	Nein	Könnte HGT beeinflussen	6.2.5
5	Funktionaler Gentransfer via Konjugation	Ja, falls bakteriell	Nein	Nein (Plasmid?)	Nein	Nein	6.2.5
6	Gentransfer via Transduktion	Ja, nur bei viraler Übertragung	Nein	Ja, bei viraler Übertragung	Nein	Nein	6.2.5
7	Gentransfer via Transformation	Indirekt	Indirekt	Ja, recA-	Ja, recA-abhängig	Nein	6.2.5
8	Induktion von Mutationen	Nein	Selten	Nein (mRNA)	Ja (Genom-Editing)	Ja ^{161,189}	6.1.1, 6.2.1, 6.2.2
9	Unkontrollierte Proliferation	Ja	Nein / selten	Nein	Nein	Nein	6.2.5

Kapitel 7

Erkenntnisse, Wissenslücken und Empfehlungen für weitere Forschung

7.1 Allgemeine Erkenntnisse

In dieser Studie wurden drei Themenbereiche definiert, mit welchen die konzeptionellen Grundlagen für die Durchführung von Umweltrisikoplanalysen von mONs geschaffen werden sollen (Abschnitt 1.1). Diese Themenbereiche umfassen (i) die Analyse der momentan therapeutisch eingesetzten bzw. potentiell zukünftig einsetzbaren mONs, sowie (ii) die Beschreibung von Prozessen, welche die Verteilung, Bioverfügbarkeit, und Persistenz von mONs in relevanten Umweltkompartimenten bestimmen und (iii) möglicherweise zu (öko)toxikologischen Effekte von mONs auf Nicht-Zielorganismen führen können. Die wichtigsten Erkenntnisse in diesen Themenbereichen, basierend auf welchen wir anschliessend Empfehlungen für weiterführende Arbeiten machen, sind wie folgt:

- (1) In den aktuell zugelassenen mON Pharmaka der Kategorien Gapmers, siRNA, SSO und Aptameren wird eine *kleine Zahl von chemischen Modifikationen* eingesetzt (Tabelle 2.1). Diese sieben Modifikationen machen höchstens 11% der in der wissenschaftlichen Literatur vorgeschlagenen Modifikationen aus. Mit der Weiterentwicklung und entsprechender Zulassung weiterer Pharmaka, ist von einer grösseren strukturellen Vielfalt von mONs zu rechnen, deren Exposition und Effekte es in Rahmen von Umweltrisikoplanalysen zu beurteilen gilt. Es ist damit zu rechnen, dass die Anzahl zugelassener therapeutischer mONs in den nächsten Jahren stark zunehmen wird: allein im Zeitraum dieser Studie (September 2024 - Juni 2025) sind zwei neue Produkte zugelassen worden.
- (2) Prozesse, welche für Exposition und Effekte von mONs in der aquatischen Umwelt relevant sind, müssen nach deren Sequenzabhängigkeit und -unabhängigkeit beurteilt werden (Tabelle 3.1). Deshalb müssen mONs in der Umweltrisikoplanalyse *sowohl als anthropogene Chemikalien als auch als genetisches oder genetisch aktives Material* im Sinne von GMOs betrachtet werden. Das Umweltverhalten und die (Öko)Toxikologie von mONs können

folglich nicht mit bestehenden Evaluationsverfahren der Umweltrisikoaanalyse adäquat erfasst werden.

- (3) Eine wissenschaftliche *Beschreibung der mON-spezifischen Prozesse*, welche die Exposition und Effekte von mONs in der aquatischen Umwelt bestimmen, fehlen nahezu vollständig. Hier gemachte Abschätzungen beruhen auf dem bestehendem Verständnis für natürliche Oligonukleotide in der Umwelt sowie einer *Extrapolation für chemisch/biologische Konsequenzen*, welche aus den aktuell eingesetzten chemischen Modifikationen hervorgehen. Für die Beurteilung von Exposition und Effekten impliziert diese Einschränkungen folgendes:
 - (a) Diese chemischen Modifikationen in mON betreffen Strukturelemente, welche für Sorption und Transformation relevant sind und können deshalb die Stabilität und Persistenz von mON gegenüber natürlichen Oligonukleotiden prinzipiell erhöhen. Trotzdem ist davon auszugehen, dass Sorption und v.a. enzymatischer Abbau, die Exposition von mONs in der Umwelt limitiert.
 - (b) Es ist davon auszugehen, dass mONs zu diversen (öko)toxikologisch relevanten Effekten auf Nichtzielorganismen führen können, die sowohl den Chemikalien- als auch den GMO-Charakter der mONs widerspiegeln. Ein Vergleich verschiedener Effektkategorien zeigt wie sich mONs von GMOs fundamental unterscheiden (Tabelle 6.2).
- (4) Die zu *erwartenden Emissionen* von mONs aus therapeutischer Anwendungen können nicht zuverlässig aus ADME Eigenschaften abgeschätzt werden, da diese Studien teilweise sehr grosse Schwankungsbereiche angeben (Tabelle 4.1). Wichtige Faktoren für eine Emissionsabschätzung wie die Präsenz von mONs als nackte Nukleotide bzw. in der therapeutischen Verabreichungsform als Konjugate oder mON-vermittelnde Vesikel wurden hier nicht untersucht. Gleiches gilt für die Untersuchungen zum Nachweis von mONs in der Umwelt, welche wir hier nicht geprüft haben.

7.2 Wissenslücken und Empfehlungen

Unsere Studie offenbart, dass es an wissenschaftlichen Grundlagen und somit auch spezifischen Informationen zur Emission, Exposition und Effekten von mON in der aquatischen Umwelt mangelt. Dieses Wissen systematisch zu generieren und zusammenzutragen sollte deshalb ein vordringliches Ziel von weitergehenden Arbeiten sein, um wissenschaftlich abgestützte Aussagen zum Eintrag, Verhalten und (öko)toxikologische Effekte vom mONs treffen zu können. Unsere Beschreibung von Wissenslücken und Empfehlungen folgt deshalb dem Konzept dieses Berichts und Kapiteln 4 bis 6 und gliedert sich nach Emissionen, Exposition und Effekten (Tabelle 7.1). Ein zusätzliches und essentielles Element für die Beurteilung von mONs ist der analytisch-quantitative Nachweis von mONs in der Umwelt und deren zeitliche Dynamik in Sorptions- und Abbauprozessen. Obwohl nicht Teil der Zielsetzung dieser Studie, evaluieren wir hier auch die aktuell zur Verfügung stehenden (bio)analytischen Ansätze für eine zukünftige Quantifizierung von mONs in wässrigen Medien.

7.2.1 Emissionen

Die Quantifizierung von mON Emissionen in die Umwelt setzt einerseits Kenntnisse der Eintragspfade und -mengen voraus. Andererseits muss bekannt sein, ob mONs nackt bzw. in der therapeutisch verwendeten Verabreichungsform (Lipid-Nanopartikel, Vesikel) vorliegen und ob mONs allenfalls als Sekundärmetabolite oder Transformationsprodukte eingetragen werden.

Die Emissionsabschätzung in dieser Studie baute auf vorhandenen Informationen zur therapeutischen Anwendung der mONs auf. Die vorliegenden Daten zum Exkrektionsverhalten aus ADME Eigenschaften zeigen grosse Unsicherheiten und können so interpretiert werden, dass einzelne Pharmaka den menschlichen Körper “kaum” (1% der Dosis) bis “vollständig” (99%) verlassen (Tabelle 4.1). Es ist deshalb unklar, welcher Anteil der verabreichten Pharmaka als Emission in die Umwelt gelangen. Angaben zu Produktionsausbeuten und Produktreinheit (Abschnitt 4.1) legen zudem nahe, Emissionen aus der pharmazeutischen Produktion als möglichen Eintragspfad zu untersuchen, da mON-ähnliche Zwischen- und Nebenprodukte anfallen und in Abfallströmen entsorgt werden müssen. Es ist anzunehmen, dass beide Eintragspfade (also aus therapeutischer Anwendung und aus chemisch/biotechnologischer Produktion) in ARAs erfolgen. Es ist deshalb im Sinne einer Massenflussanalyse zu prüfen, welche Mengen an mON im therapeutischen Kontext verschrieben bzw. verwendet werden, um angesichts der unsicheren Kenntnisse der Exkretionsanteile, Grössenordnungen der in Spitalabwasser eingeleiteten Mengen abzuschätzen (Empfehlung 1(a), Tabelle 7.1). Vergleichbare Abschätzungen sind für mON-ähnliche Zwischen- und Nebenprodukte notwendig (Empfehlung 1(b)). Des Weiteren muss festgestellt werden, welche mON-Anteile in nackter Form bzw. in Carriersystemen aus der Verabreichung in die Umwelt eingetragen werden (Empfehlung 2). Für eine Quantifizierung der in ARAs eingeleiteten Mengen und der Eliminationsleistung von ARAs inklusive synthetischer Zwischen- und Nebenprodukte müssen mONs und Hauptabbauprodukte analytisch quantifiziert werden können (Empfehlung 3). Solche Abklärungen setzten entsprechende (bio)analytische Analysemethoden voraus.

7.2.2 Exposition

Auch für die generelle Beschreibung der Exposition von mONs gilt es, die relevanten Prozesse (also Sorption, enzymatischer und chemisch-oxidativer Abbau sowie die Aufnahme in Nicht-Zielorganismen) erstmalig zu untersuchen. Für jeden dieser Prozesse muss der Einfluss der Verabreichungsform aus therapeutischen Kontext zudem festgestellt werden. Beispiele sind die Unterscheidung von Sorption bzw. Transport von mON in nackter Form von demjenigen von Konjugaten und Vesikeln, eine Retardation des enzymatischen Abbaus aufgrund einer geringeren Verfügbarkeit von gelösten, nackten mONs in der wässrigen Phase. Die Empfehlung zur Untersuchung der Aspekte der Verabreichungsform gilt generell und wird im Folgenden impliziert.

Tabelle 7.1 Empfehlungen für weitere Forschung nach Emissionen, Exposition und Effekten.

Kategorie	Nr.	Empfehlung
Emissionen	1	Quantifizierung der Massenflüsse (a) von mONs aus therapeutischer Anwendung sowie (b) mON-ähnliche Zwischen- und Nebenprodukte aus chemisch/biotechnologischer Produktion in ARAs.
	2	Identifikation der mON-Emissionsanteile als nackte mONs Form bzw. in Carriersystemen für die Verabreichung.
	3	Quantitativer und experimenteller Nachweis der emittierten mONs in Ein- und Ausfluss von ARAs
Exposition	4	Experimentelle Studien über die Sorption von mONs in experimentellen Systemen, welche die Verfahrensschritte und Prozesse in ARAs, insbesondere der Flockung abbilden.
	5	Effektivität der vierten Reinigungsstufe in ARAs zur Entfernung der mONs experimentell zu validieren.
	6	Nachweis des enzymatischen Abbaus von mON mittels bekannter Nukleasen unter typischen Umweltbedingungen.
	7	Untersuchung der Enzym-Substrat-Spezifität des enzymatischen Abbaus.
Effekte	8	Erforschung der toxischen und mutagenen Wirkungen von mON auf Nicht-Zielorganismen und Modellökosysteme.
	9	Machbarkeitsstudie über die bioinformatische Vorhersage von Wirkungen von mON in Umweltorganismen.

Sorption

Aufgrund fehlender Adsorptionsdaten der mONs kann deren Adsorptionsverhalten bisher nur anhand der existierenden Literatur über die Adsorption (längerkettiger) Nukleinsäuren ohne chemische Modifikationen abgeschätzt werden. Zukünftige systematische experimentelle Untersuchungen des Einflusses der chemischen Modifikationen auf die Adsorptionseigenschaften sind nötig für ein detaillierteres Verständnis und können u.a. in bereits bestehenden Modellsystem mit relevanten Sorbentien wie organisches Material und Mineraloxide untersucht werden (Empfehlung 4). Die grösste Unsicherheit in der Abschätzungen der Adsorptionseigenschaften der mONs besteht für PMO-modifizierte SSOs, da diese Modifikation die Ladungs- und Polaritätseigenschaften des Rückgrats deutlich verändern im Vergleich zu natürlichen Oligonukleotiden.

Für das in dieser Studie verwendete Emissionsszenario in ARAs muss geprüft werden, ob die Adsorption der mONs an Abwasserflocken zu einer Stabilisierung der mONs und damit einhergehenden Verringerungen des enzymatischen Abbaus führen. Einerseits würden so gebundene

mONs bei der in der Schweiz üblichen thermischen Verwertung des Klärschlammes eliminiert. Andererseits kann ein Teil, gebunden an Restfeststoffe im Kläranlagenauslauf, auf diesem Weg in natürliche aquatische Systeme gelangen. Eine Abschätzung der Adsorption von mONs an Abwasserflocken, idealerweise gekoppelt und eine Analyse der damit verbundenen Stabilisierung, ist daher prioritär.

Chemischer Abbau in ARAs

In der Schweiz werden ARAs mit einer vierten Reinigungsstufe erweitert, um Mikroverunreinigungen, die nicht in der biologischen Stufe entfernt wurden, mittels chemischer Oxidationsmittel und/oder Aktivkohlefilter abzureagieren bzw. zurückzuhalten. Aufgrund der vorhandenen Literatur zur chemischen Oxidation natürlicher Oligonukleotide ist zu erwarten, dass auch mONs in einem vierten Reinigungsschritt effektiv entfernt werden können. Die Stärke der Adsorption an Aktivkohlefilter lässt sich schlecht abschätzen aufgrund der starken negativen Ladung und daher guter Wasserlöslichkeit der mONs. Wir empfehlen, die Effektivität der vierten Reinigungsstufe zur Entfernung der mONs experimentell zu validieren (Empfehlung 5).

Enzymatischer Abbau

Kürzlich veröffentlichte Studien zu neuen enzymatischen Synthesewegen von Moody et al.³⁷ gehören zu den wenigen, welche die enzymatische Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats von mONs mit den gegenwärtig in Pharmaka verwendeten chemischen Modifikationen (Tabelle 2.1) explizit nachweisen. Allerdings wurde diese Aktivität von Nukleasen der EndoV-Familie unter spezifischen Laborbedingungen für die Synthese gezeigt. Es bleibt daher unklar ob und unter welchen Bedingungen der enzymatische Abbau von mONs in der Umwelt abläuft und wie das Abbaupotential von mONs abgeschätzt werden kann. Eine provisorische bioinformatische Analyse von EndoV-Sequenzen im Rahmen dieser Studie ergab, dass ähnliche Proteinsequenzen in verschiedenen Umweltproben wie Boden, Oberflächenwasser und Abwasser vorhanden sind.¹⁹³

Trotz dieser ersten Hinweise auf eine mögliche biologische Abbaubarkeit von mON bedarf auch dieser Prozess einer grundlegenden, weitergehenden Charakterisierung. Die wichtige Aufgaben für weitere Forschung ist der Nachweis von enzymatischen Abbau in der Umwelt (Empfehlung 6). Aufgrund der möglichen Enzym-Substrat-Spezifität dieses Prozesses bedarf es dazu einerseits Laborstudien, in welchen die Abbaubarkeit von einzel- und doppelsträngigen mONs der verschiedenen mON Kategorien mit den typischen Kombinationen von chemischen Modifikationen, wie sie in typischen mON Pharmaka vorkommen, gezeigt wird (Empfehlung 7). Andererseits gilt es die ökologischen Randbedingungen für den Abbau in der Umwelt zu prüfen z.B. ob bei den zu erwarteten tiefen Konzentration mONs als Phosphat-,¹⁹⁴ Kohlenstoff oder Energiequelle¹⁹⁵ genutzt werden.

7.2.3 Effekte

Zur Toxizität, Genotoxizität und Mutagenizität von mON und ihren monomeren Bestandteilen existiert eine umfangreiche Literatur mit jedoch fast ausschliesslich pharmakologischer Aus-

richtung (Kapitel 6). Diese Literatur erlaubt einerseits Einblick in die sehr komplexen und vielfältigen Effektmechanismen dieser Substanzen. Andererseits wird darin eine ausgeprägte Wissenslücke in Bezug auf die tatsächlichen Effektrisiken bei der Exposition von Umweltorganismen deutlich. Zwar zeigt die Literatur klar auf, dass in der Forschung erhebliche und erfolgreiche Anstrengungen unternommen wurden, um die toxischen und mutagenen Nebenwirkungen von mON zu verstehen und diese zu minimieren. Aus humantoxikologischer Sicht und in Bezug auf Standard-Genotoxizitätstests sind mON Pharmaka als sicher zu betrachten. Der Blick auf die Entwicklung der mON zeigt aber auch, dass erhebliche toxische und auch mutagene Effekte mit mON durchaus möglich sind, die Modifikationen in zugelassenen mON Pharmaka stellen somit in dieser Hinsicht bereits hochgradig optimierte Produkte dar.

Obwohl dies vermutlich die Wahrscheinlichkeit von negativen Auswirkungen auf Umweltorganismen deutlich verringert, kann man solche nach aktuellem Wissensstand nicht ausschliessen. Zum einen ergibt sich aus der biologischen, sequenzspezifischen Wirkungsweise der mON die Möglichkeit von non-target Effekten in anderen Organismen. Obwohl diese Effekte als eher unwahrscheinlich eingeschätzt werden, sind solche Interaktionen aufgrund der enormen genetischen Diversität in Umweltsystemen kaum *a priori* auszuschliessen. Zum anderen lassen sich auch spezifische, zum Beispiel durch immunologische Reaktionen hervorgerufene Effekte in Organismen nicht ausschliessen. Letztlich verlangen Substanzen mit potenziell mutagener Wirkung grundsätzlich nach einer sorgfältigen Evaluierung. Eine weitere Unsicherheit entsteht aus der Tatsache, dass teilweiser Abbau, Monomerisierung und/oder Modifikationen in der Umwelt zu aus der pharmakologischen Forschung unbekannten Effekten führen könnte. Deshalb sollten empirische Daten zu diesem Thema erarbeitet werden.

Lässt sich die Exposition von Umweltorganismen aufgrund von Überlegungen zur Emissionsabschätzung, Abbaubarkeit, Aufnahme durch Organismen und der daraus resultierenden Expositionsabschätzung nicht grundsätzlich ausschliessen, sollten die existierenden Wissenslücken im Bezug auf (öko)toxikologische Wirkungen geschlossen werden (Empfehlung 8). Neben experimentellen Arbeiten könnte ergänzend auch die Erforschung der Machbarkeit einer Risikoabschätzung aufgrund bioinformatischer Modellierungen (Abschnitt 6.2.6) interessant sein (Empfehlung 9).

7.3 (Bio)Analytische Methoden für den Nachweis von mONs in der Umwelt

Der quantitative Nachweis von mONs in der Umwelt wird eine entscheidende Rolle in der Umweltrisikoaanalyse spielen und ist für die Umsetzung der in Tabelle 7.1 gemachten Empfehlungen unabdingbar. Aus methodischer Sicht ist dieser Nachweis herausfordernd. Die verschiedenen chemischen Modifikationen und die eher geringe Länge der Nukleotidsequenz erschweren herkömmliche polymerasebasierte Nachweismethoden, was entweder eine Weiter- oder Neuentwicklung analytischer Ansätze erforderlich macht. In diesem Abschnitt erörtern wir die Funktionsweise fünf gängiger Nachweismethoden für Oligonukleotid- bzw. Nukleinsäuresequenzen und

gehen auf deren Potential für den Nachweis von mONs ein. Wie aus den folgenden Ausführungen hervorgeht, können (bio)analytische Methoden für zwei prinzipielle Anwendungen konzipiert werden. Einerseits für die selektive Detektion von mONs in niedrigen Konzentrationen in komplexen Umweltmatrices. Andererseits ist ein nicht-zielgerichtetes Screening (sog. non-target screening) von strukturell ähnlichen Substanzen, um bekannte und unbekannte mONs sowie ihre chemischmodifizierten und unmodifizierte Abbauprodukte zu erfassen. Die Vor- und Nachteile der (bio)analytischen Methoden für die Umweltanalyse von mON ist in Tabelle 7.2 zusammengefasst.

7.3.1 Polymerase Chain Reactions

Der Nachweis von natürlichen Oligonukleotiden in Umweltproben erfolgt häufig mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR). Dabei wird eine thermostabile Taq-Polymerase zusammen mit spezifischen Primern (kurze Nukleotidsequenzen als Startpunkt für die Synthesereaktion) eingesetzt, um die Zielsequenzen während wiederholter Temperaturzyklen zu amplifizieren und nachzuweisen. In Kombination mit einer Standardkurve ermöglicht dieses Verfahren die quantitative PCR (qPCR), mit der die Kopienzahl pro Reaktion bestimmt werden kann. qPCR ist für Anwendungen in der Umweltanalytik besonders attraktiv, da sie eine Amplifikation sehr geringer Zielmengen pro Volumen- oder Masseneinheit der Probe erlaubt und somit die Nachweisgrenze deutlich senkt.

Aufgrund ihrer chemischen Modifikationen und der kurzen Nukleotidsequenz sind mONs nur bedingt mittels Standard-PCR-Anwendungen nachweisbar. Für erfolgreiche PCRs müssen die gewählten Primer, jeweils mit einer Länge von etwa 20 Nukleotiden an die amplifizierte Region komplementär binden. Effektive PCR-Produkte sind daher oft länger als 60 Basenpaare, was die Länge der mONs in Pharmaka übersteigt. Allerdings besteht die Möglichkeit, die Länge von mONs vor der PCR zu erhöhen, wie zum Beispiel durch Stem-loop reverse transcription. Diese Methode wird bei unmodifizierten Oligonukleotiden genutzt¹⁹⁶ und muss für mON zuert etabliert werden. Die chemischen Modifikationen beeinflussen das komplementäre Binden der Primer und sie können potentiell die Aktivität der Polymerase blockieren. Daher besteht die Möglichkeit die Zielsequenz in eine unmodifizierte Form mittels chemischen oder biochemischen Ligationstechniken zu übertragen.^{196,197} Dieser Ansatz verwendet zwei unmodifizierte Fragmente, die durch das mON verbunden werden. Dadurch kann eine Ligase das Rückgrat des Transkripts verbinden, ohne dass eine Polymerase-Aktivität erforderlich ist. Diese Methoden erfordern Anpassungen an Standard-PCR-Protokolle für Umweltproben und wurden bisher nicht mit Proben aus Umweltsystemen getestet.

7.3.2 Sequencing by Synthesis

Sequencing-by-Synthesis (SBS) Verfahren, wie sie von Illumina-Technologien genutzt werden, folgen einem typischen Arbeitsablauf. Zunächst wird die gesuchte DNA oder RNA isoliert und mit Adaptoren (ein kurzer DNA-RNA-Strang, der an die Enden des ONs angebracht wird) und Barcodes (kurze einzigartige Sequenzen zur Probenerkennung) versehen. Anschliessend wird die

Probe auf eine Oligonukleotid-Beschichtung (eine strukturierte Matrix von Molekülen auf einer festen Oberfläche, die Hochdurchsatz-Analysen ermöglicht) aufgebracht, wo durch Amplifikation Cluster von DNA-Sequenzen entstehen. Diese Cluster enthalten fluoreszenzmarkierte Basen, deren Fluoreszenz während der Sequenzierung gemessen wird, um die Basenfolge zu bestimmen. Dieses Verfahren beinhaltet polymerase-gestützte Amplifikationsschritte vor der eigentlichen Sequenzierung, um das Zielsignal zu verstärken oder Adapter und Barcodes anzubringen. mONs können die Polymerase-Erweiterung stören. Polymerasefreie Vorverarbeitungsmethoden sind zwar verfügbar, beruhen jedoch meist auf der Ligation von Adaptern und Barcodes direkt an die mONs. Dieser Schritt wird durch deren kurze Sequenzlänge zusätzlich erschwert. Zur Detektion bestimmter Modifikationen gibt es Umgehungslösungen, wie die Behandlung mit Bisulfit zur Erkennung von 5-MC, einem epigenetischen Marker. Diese Methoden sind jedoch nur für ausgewählte chemische Modifikationen der mONs geeignet. Darüber hinaus führt die Clusterbildung bei Illumina dazu, dass die final sequenzierte DNA ihre ursprünglichen Modifikationen verliert.

Alternative Sequenzierungstechnologien, wie das Single-Molecule Real-Time (SMRT) Sequencing von Pacific Biosciences, bieten interessante Alternativen zu klassischen Sequencing-by-Synthesis-Verfahren.¹⁹⁸ Beim SMRT-Sequencing wird die Einbindung fluoreszenzmarkierter, phosphatgebundener Nukleotide in Echtzeit verfolgt. Dabei wird die Polymerisationsrate aufgezeichnet. Im Vergleich zu einer unveränderten Oligonukleotidsequenz zeigen mONs charakteristische Verzögerungen, die auf ihre chemischen Veränderungen zurückzuführen sind.¹⁹⁹ Technologien wie SMRT gewinnen für die Analyse von Oligonukleotiden, welche durch natürliche Prozesse wie etwa durch Methylierung modifiziert werden. Für aktuelle mONs Pharmaka ist dieses Verfahren limitiert, da stark modifizierte Nukleotidsequenzen die Polymerase behindern oder inhibieren können.

7.3.3 Nanopore-based Sequencing

Die Nanopore-Sequenzierung beruht auf dem Transport einzelner Oligonukleotidsequenzen durch Enzymkanäle (Poren) in biologischen Membranen. Die charakteristischen, nukleotidabhängigen Spannungsänderungen beim Transport von Nukleinsäuresequenzen ermöglichen die direkte Detektion von Modifikationen am Oligonukleotid.²⁰⁰ Diese vielversprechende Methode wurde jedoch noch nicht für alle gängigen mON-Modifikationen getestet. Nanopore-Sequenzierungstechnologien bieten insbesondere Vorteile bei der Sequenzierung von längeren Nukleotidketten und die Anwendbarkeit für kurze mONs muss noch gezeigt werden.

7.3.4 Massenspektrometrie

Die am häufigsten eingesetzte Methode zur Detektion, Quantifizierung und Reinheitsprüfung von modifizierten Oligonukleotiden (mONs) ist die hochauflösende Massenspektrometrie. Dabei wird das mON ionisiert und das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis sowohl des Ausgangsions (Parent-Ion) als auch der Fragmentionen bestimmt, um die Molekülstruktur zu charakterisieren. Fortgeschrittene massenspektrometrische Verfahren können mehrere Ionisierungs- und Kollisi-

onsschritte durchführen, um einzelne Molekülbestandteile, einschliesslich spezifischer Modifikationen, gezielt zu analysieren. In der Industrie ist diese Methode weit verbreitet, insbesondere in der Herstellung und Qualitätskontrolle von mON-Produkten, und sie lässt sich auf unterschiedlichste Anwendungsbereiche anpassen. Die beiden am häufigsten eingesetzten Verfahren sind; matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) und electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS).

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. Die Ionisationsquelle, in diesem Fall ein Laser, wird gezielt auf das Biomolekül gerichtet. Das Biomolekül ionisiert und die entstehenden Ionen werden in einem elektrischen Feld innerhalb eines Vakuumröhrchens entsprechend ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) nach ihrer Flugzeit (Time-of-Flight) getrennt. Die Masse jedes Ions wird ermittelt und in einem Massenspektrum dargestellt. Allerdings kann ihr Einsatz in Umweltproben eingeschränkt sein, da Veränderungen in der Probenmatrix die Ergebnisse beeinflussen können. Zudem ist die Sensitivität begrenzt, so dass geringe Konzentrationen von mONs in Umweltproben möglicherweise nicht zuverlässig nachgewiesen werden können.

Electrospray Ionization Mass Spectrometry Bei der ESI-MS erfolgt die Ionisierung durch das Anlegen einer hohen elektrischen Spannung an eine flüssige Probe. Dabei wird die Probe in einen feinen Nebel geladener Tröpfchen überführt. Durch fortschreitende Verdampfung gelangen polare Moleküle in die Gasphase und werden so für die massenspektrometrische Analyse zugänglich gemacht. Ähnlich wie bei MALDI-TOF erfolgt anschliessend eine Trennung der Ionen auf Basis ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses und eine quantitative Auswertung in Form individueller Massenspektren. ESI-MS erlaubt eine differenzierte Steuerung der Ionisation, etwa durch sogenannte „weiche“ Ionisierung oder die Erzeugung mehrfach geladener Ionen. Der wesentliche Vorteil von ESI-MS liegt in der höheren Empfindlichkeit im Vergleich zu MALDI-TOF. Allerdings ist ESI-MS bei der Analyse komplexer Mischungen oder von Molekülen wie mONs, die mehrere Ladungszustände einnehmen können, möglicherweise eingeschränkt. Zudem sind beide Verfahren auf den Vergleich der erhaltenen Spektren mit bekannten oder vorhergesagten m/z -Datenbanken angewiesen, was die Analyse neuartiger oder stark modifizierter mONs limitiert.

Zur Unterstützung der sog. non-target massenspektrometrischer Methoden werden aktuelle Datenbanken mit charakteristischen und vorhergesagten Massenspektren gängiger mONs entwickelt.²⁰¹ Datenbank-gestützte Werkzeuge wie OligoDistiller und SynONIM ermöglichen eine Auswertung massenspektrometrischer Rohdaten als Sequenzprofile, ein Ansatz, der an etablierte Methoden aus der Proteomik angelehnt ist. Diese Anwendungen werden bislang vor allem zur Entwicklung und Reinheitsprüfung neuer mON-Produkte eingesetzt. Die zugrunde liegenden Massenspektren-Bibliotheken lassen sich jedoch potenziell auf die Detektion von mONs in Umweltproben ausweiten, indem charakteristische Spektren mit Messdaten aus komplexen Matrices abgeglichen werden.

7.3.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) erkennt Zielsubstanzen durch die Bindungsaktivität eines Enzyms, insbesondere durch die spezifische Bindung zwischen einem Antikörper und einem Antigen. Bei einer typischen ELISA-Anwendung wird eine Oberfläche mit einem Antikörper beschichtet, der das Zielmolekül, hier ein mON, bindet. Ein zweiter, enzymgekoppelter Antikörper ermöglicht den Bindungsnachweis, indem er als Indikator mit einer messbaren Farbänderung oder Lumineszenz, die Interaktion mit dem mONs signalisiert. Diese Intensitätsänderung wird üblicherweise photometrisch quantifiziert. ELISA-Assays sind aufgrund ihrer Flexibilität im Design und ihrer hohen Spezifität weit verbreitet und wurden erfolgreich zur Detektion einer ASOs und siRNA eingesetzt.²⁰² Zur Verbesserung der Sensitivität wurden hybridisierungs-basierte ELISA-Methoden entwickelt. Bei diesem Ansatz bindet das mON an eine markierte Fangsonde, die es vor nachfolgender Nukleasebehandlung schützt. Nur Fangsonden, an die ein mON gebunden ist, werden im anschliessenden ELISA-Assay detektiert.^{202,203}

Zu den Herausforderungen des ELISA-Ansatzes gehört die geringe Grösse von mONs, welche häufig die Antikörperbindung erschwert. Zudem ist die Entwicklung eines spezifischen Antikörpers für ein bestimmtes mON aufwendig. Die grosse Bandbreite chemischer Modifikationen von mONs führt zu einer Vielzahl möglicher Kombinationen, was die Entwicklung effektiver Assays für die Umweltüberwachung erschwert. Darüber hinaus können Matrixeffekte in Umweltproben zu hohem Hintergrundsignal und erhöhter Nukleaseaktivität führen, was die Sensitivität und Spezifität von ELISA-Assays zusätzlich mindern kann.

Tabelle 7.2 Vergleich von (bio)chemischen Nachweismethoden und typische Vor- und Nachteile für den Nachweis von mONs.

Nachweismethode	Grundlage	Vorteile	Nachteile
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	Amplifikation durch thermostabile Polymerase	• Verstärkt Zielsignal aus komplexen Matrices • Hohe Spezifität bei geeigneter Primer-Design • Anpassungen für bestimmte Modifikationen möglich	• Kurze mONs erlauben möglicherweise keine Primerbindung • Modifikationen am Rückgrat oder Zucker können Polymerase hemmen • Modifikationen können Fehler bei der Amplifikation verursachen
Sequencing by Synthesis (SBS)	Polymerase-gestützte Inkorporation fluoreszierender Nukleotide	• Detektiert und sequenziert Ziele aus komplexen Proben • Gleichzeitige Identifikation vieler Sequenzen möglich • Erkennung degradierter oder mutierter Sequenzen	• Polymerase-abhängig; können Reaktion verhindern • Kurze mONs haften u.a. nicht effizient oder gehen im Signal unter
Nanoporen-Sequenzierung	Spannungssensitive Poren in Membranproteinen	• Direkte Analyse des nativen mONs ohne Amplifikation • Unabhängig von Polymerasen (nur Ligation erforderlich) • Detektiert Modifikationen, Mutationen und Abbauprodukte	• Modifikationen können Ligation oder Proteinbindung behindern • Zu kurze mONs können unvollständig durch die Pore laufen • Modifikationen verursachen Spannungsschwankungen und erschweren Analyse

(Fortsetzung von Tabelle 7.2)

Nachweismethode	Grundlage	Vorteile	Nachteile
Massenspektrometrie	Fragmentierung und Analyse basierend auf m/z Verhältnis	• Charakterisierung des Moleküls direkt über Fragmentanalyse • Keine enzymatischen Schritte notwendig – weniger Bias • Bevorzugt kurze Sequenzen • Detektiert Modifikationen, Abbau und Mutationen	• Geringe Empfindlichkeit bei komplexen Probenmatrices • Kein Amplifikationsschritt – niedrige Konzentrationen evtl. nicht nachweisbar • Vergleich mit Referenzspektren nötig für nicht-zielgerichtete Anwendungen
ELISA	Enzyme Immunosorbent Assays	• Hohe Spezifität für das jeweilige mON • Etabliert in klinischen Nachweisverfahren • Anpassbar auf verschiedene mON-Kategorien	• Eingeschränkte Nachweisbarkeit sehr kurzer mONs • Begrenzte Skalierbarkeit durch die gezielte Auslegung des Tests

Literaturverzeichnis

- [1] Kümin, M.; Eyer, K.; Hall, J.; Koch, A.; Pascolo, S.; Romeis, J. RNA-Technologien: Wirkmechanismen, Anwendungen und Verabreichungsformen. *Akademien der Wissenschaften Schweiz* **2024**, 52, <https://zenodo.org/doi/10.5281/zenodo.10926878>.
- [2] Bennett, C. F.; Swayze, E. E. RNA targeting therapeutics: Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, 259–293, <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654>.
- [3] Setten, R. L.; Rossi, J. J.; Han, S.-p. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, 421–446, <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>.
- [4] Smith, C. E.; Zain, R. Therapeutic oligonucleotides: State of the art. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2019**, 605–630, <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021050>.
- [5] Roberts, T. C.; Langer, R.; Wood, M. J. A. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, 673–694, <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>.
- [6] Crooke, S. T.; Baker, B. F.; Crooke, R. M.; Liang, X.-h. Antisense technology: An overview and prospectus. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00162-z>.
- [7] Tang, Q.; Khvorova, A. RNAi-based drug design: considerations and future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 341–364, <https://doi.org/10.1038/s41573-024-00912-9>.
- [8] Khvorova, A.; Watts, J. K. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat. Biotechnol.* **2017**, 238–248, <https://doi.org/10.1038/nbt.3765>.
- [9] Hoose, A.; Vellacott, R.; Storch, M.; Freemont, P. S.; Ryadnov, M. G. DNA synthesis technologies to close the gene writing gap. *Nat. Rev. Chem.* **2023**, 144–161, <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00456-9>.
- [10] Bost, J. P.; Barriga, H.; Holme, M. N.; Gallud, A.; Maugeri, M.; Gupta, D.; Lehto, T.; Valadi, H.; Esbjörner, E. K.; Stevens, M. M.; El-Andaloussi, S. Delivery of oligonucleotide therapeutics: chemical modifications, lipid nanoparticles, and extracellular vesicles. *ACS Nano* **2021**, 13993–14021, <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c05099>.
- [11] Egli, M.; Manoharan, M. Chemistry, Structure and Function of Approved Oligonucleotide Therapeutics. *Nucleic Acids Research* **2023**, 51, 2529–2573, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad067>.
- [12] Swissmedic: Arzneimittel für neuartige Therapien. 2019 (accessed 2025-06-01); <https://www.swissmedic.ch/atmp-de>.
- [13] SR 810.305 Verordnung über klinische Versuche mit Ausnahme klinischer Versuche mit Medizinprodukten. *Systematische Rechtssammlung des Bundes* **2013**, (Stand 1. März 2025), <https://www.fedlex.admin.ch/eli/oc/2013/643/de>.
- [14] SR 821.212.21 Verordnung über Arzneimittel. *Systematische Rechtssammlung des Bundes* **2019**, (Stand 1. Oktober 2024), <https://www.fedlex.admin.ch/eli/cc/2018/588/de>.

- [15] SR 814.911 Verordnung über den Umgang mit Organismen in der Umwelt. *Systematische Rechtssammlung des Bundes* **2008**, (Stand 1. September 2024), <https://www.fedlex.admin.ch/eli/cc/2008/614/de>.
- [16] Liu, F. The science and practice of current environmental risk assessment for gene therapy: a review. *Cytotherapy* **2024**, 686–699, <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2024.04.067>.
- [17] Parker, K. M.; Barragán Borrero, V.; Van Leeuwen, D. M.; Lever, M. A.; Mateescu, B.; Sander, M. Environmental fate of RNA interference pesticides: adsorption and degradation of double-stranded RNA molecules in agricultural soils. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, 3027–3036, <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05576>.
- [18] Arpaia, S.; Christiaens, O.; Krogh, P. H.; Parker, K. M. In *RNAi for plant improvement and protection*, 1st ed.; Mezzetti, B., Sweet, J., Burgos, L., Eds.; CABI, 2021; pp 117–130.
- [19] Zhang, K.; Wei, J.; Huff Hartz, K. E.; Lydy, M. J.; Moon, T. S.; Sander, M.; Parker, K. M. Analysis of RNA interference (RNAi) biopesticides: Double-stranded RNA (dsRNA) extraction from agricultural soils and quantification by RT-qPCR. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, 54, 4893–4902, <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07781>.
- [20] Keefe, A. D.; Pai, S.; Ellington, A. Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, 537–550, <https://doi.org/10.1021/jm00059a007>.
- [21] Kole, R.; Krainer, A. R.; Altman, S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature Reviews Drug Discovery* **2012**, <https://www.nature.com/articles/nrd3625>.
- [22] Bennett, C. F.; Baker, B. F.; Pham, N.; Swayze, E.; Geary, R. S. Pharmacology of antisense drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2017**, <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104846>.
- [23] Howard, J. D.; Beghyn, M.; Dewulf, N.; De Vos, Y.; Philips, A.; Portwood, D.; Kilby, P. M.; Oliver, D.; Maddelein, W.; Brown, S.; Dickman, M. J. Chemically modified dsRNA induces RNAi effects in insects in vitro and in vivo: A potential new tool for improving RNA-based plant protection. *J. Biol. Chem.* **2022**, 102311, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102311>.
- [24] Hyjek, M.; Figiel, M.; Nowotny, M. RNases H: structure and mechanism. *DNA Repair* **2019**, 84, 102672, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102672>.
- [25] Collotta, D.; Bertocchi, I.; Chiapello, E.; Collino, M. Antisense oligonucleotides: a novel frontier in pharmacological strategy. *Front. Pharmacol.* **2023**, 1304342, <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1304342>.
- [26] Crooke, S. T.; Vickers, T. A.; Liang, X.-h. Phosphorothioate modified oligonucleotide–protein interactions. *Nucl. Ac. Res.* **2020**, 5235–5253, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa299>.
- [27] Bramsen, J. B. et al. A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity. *Nucleic Acids Research* **2009**, 2867–2881, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp106>.
- [28] Scheidat, I.; Bürgmann, H.; Mansfeldt, C.; Robinson, S. L.; Sander, M.; Hofstetter, T. B. mON-Datenbank: Allgemeine Systematik der chemischen Modifikationen von Oligonuklotiden und deren Verwendung in zugelassenen Medikamenten. 2025; Bundesamt für Umwelt (Bafu), Auftrag 110017262/8T10/00.5004.PZ/0026, [Link zur Version vom 23. Juni 2025](#).
- [29] Clavé, G.; Reverte, M.; Vasseur, J.-J.; Smietana, M. Modified internucleoside linkages for nuclease-resistant oligonucleotides. *RSC Chemical Biology* **2021**, <https://doi.org/10.1039/D0CB00136H>.
- [30] Hu, B.; Zhong, L.; Weng, Y.; Peng, L.; Huang, Y.; Zhao, Y.; Liang, X.-J. Therapeutic siRNA: state of the art. *Sig. Transduct Target Ther.* **2020**, 101, <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>.

- [31] Deleavey, G. F.; Damha, M. J. Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. *Chemistry & Biology* **2012**, 937–954, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.011>.
- [32] Wan, W. B.; Seth, P. P. The medicinal chemistry of therapeutic oligonucleotides. *Journal of Med. Chem.* **2016**, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00551>.
- [33] Kumar, P.; Caruthers, M. H. DNA analogues modified at the nonlinking positions of phosphorus. *Acc. Chem. Res.* **2020**, 2152–2166, <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00078>.
- [34] Monia, B. P.; Johnston, J. F.; Sasmor, H.; Cummins, L. L. Nuclease resistance and antisense activity of modified oligonucleotides targeted to Ha-. *Journal of Biol. Chem.* **1996**, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.14533>.
- [35] Miller, C. M.; Donner, A. J.; Blank, E. E.; Egger, A. W.; Kellar, B. M.; Østergaard, M. E.; Seth, P. P.; Harris, E. N. Stabilin-1 and Stabilin-2 are specific receptors for the cellular internalization of Phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides (ASOs) in the liver. *Nuc. Ac. Res.* **2016**, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw112>.
- [36] Stein, C. A.; Hansen, J. B.; Lai, J.; Wu, S.; Voskresenskiy, A.; Hog, A.; Worm, J.; Hedtjörn, M.; Souleimanian, N.; Miller, P.; Soifer, H. S.; Castanotto, D.; Benimetskaya, L.; Ørum, H.; Koch, T. Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. **2010**, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp841>.
- [37] Moody, E. R.; Obexer, R.; Nickl, F.; Spiess, R.; Lovelock, S. L. An enzyme cascade enables production of therapeutic oligonucleotides in a single operation. *Science* **2023**, <https://www.science.org/doi/10.1126/science.add5892>.
- [38] Kandasamy, P. et al. Control of backbone chemistry and chirality boost oligonucleotide Splice Switching activity. *Nucleic Acids Research* **2022**, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac018>.
- [39] Jahns, H. et al. Chirality matters: stereo-Defined Phosphorothioate Linkages at the Termini of Small Interfering RNAs Improve Pharmacology. *Nucleic Acids Research* **2022**, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab544>.
- [40] Egli M, P. A. M., Flavell A *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*; The Royal Society of Chemistry, 2006; <https://doi.org/10.1039/9781847555380-00013>.
- [41] Nan, Y.; Zhang, Y.-J. Antisense Phosphorodiamidate morpholino oligomers as novel antiviral compounds. *Frontiers in Microbiol.* **2018**, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00750>.
- [42] Turner, J. J. Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. *Nucleic Acids Research* **2005**, <https://doi.org/10.1093/nar/gki991>.
- [43] Hudziak, R. M.; Barofsky, E.; Barofsky, D. F.; Weller, D. L.; Huang, S.-B.; Weller, D. D. Resistance of morpholino Phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* **1996**, <https://doi.org/10.1089/oli.1.1996.6.267>.
- [44] Dean, D. A. Peptide nucleic acids: versatile tools for gene therapy strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00087-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00087-9).
- [45] Sheng, L.; Rigo, F.; Bennett, C. F.; Krainer, A. R.; Hua, Y. Comparison of the Efficacy of MOE and PMO modifications of systemic antisense oligonucleotides in a severe SMA mouse model. *Nucleic Acids Research* **2020**, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa126>.
- [46] Noy, A.; Pérez, A.; Márquez, M.; Luque, F. J.; Orozco, M. Structure, recognition properties, and flexibility of the DNA-RNA hybrid. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 4910–4920, <https://doi.org/10.1021/ja043293v>.

- [47] Noy, A.; Luque, F. J.; Orozco, M. Theoretical analysis of antisense duplexes: determinants of the RNase H susceptibility. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 3486–3496, <https://doi.org/10.1021/ja076734u>.
- [48] Manoharan, M. 2'-Carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: Importance of conformation, configuration and conjugation. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 117–130, [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(99\)00138-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(99)00138-4).
- [49] Cummins, L. L.; Owens, S. R.; Risen, L. M.; Lesnik, E. A.; Freier, S. M.; McGee, D.; Guinosso, C. J.; Cook, P. D. Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity. *Nuc. Ac. Res.* **1995**, 2019–2024, <https://doi.org/10.1093/nar/23.11.2019>.
- [50] Egli, M. Structural aspects of nucleic acid analogs and antisense oligonucleotides. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1996**, 1894–1909, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.199618941>.
- [51] Kawasaki, A. M.; Casper, M. D.; Freier, S. M.; Lesnik, E. A.; Zounes, M. C.; Cummins, L. L.; Gonzalez, C.; Cook, P. D. Uniformly modified 2'-deoxy-2'-Fluoro-phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets. *Journal of Medicinal Chemistry* **1993**, 36, 831–841, <https://doi.org/10.1021/jm00059a007>.
- [52] Herdewijn, P. Heterocyclic modifications of oligonucleotides and antisense technology. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* **2000**, 10, 297–310, <https://doi.org/10.1089/108729000421475>.
- [53] Aguti, S.; Cheng, S.; Ala, P.; Briggs, S.; Muntoni, F.; Zhou, H. Strategies to improve the design of gapmer antisense oligonucleotide on allele-specific silencing. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **2024**, <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2024.102237>.
- [54] Monia, B.; Lesnik, E.; Gonzalez, C.; Lima, W.; McGee, D.; Guinosso, C.; Kawasaki, A.; Cook, P.; Freier, S. Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-Deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85268-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85268-7).
- [55] Lima, W. F.; Nichols, J. G.; Wu, H.; Prakash, T. P.; Migawa, M. T.; Wyrzykiewicz, T. K.; Bhat, B.; Crooke, S. T. Structural requirements at the catalytic site of the heteroduplex substrate for human RNase H1 catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, <https://doi.org/10.1074/jbc.M405035200>.
- [56] Zhang, M. M.; Bahal, R.; Rasmussen, T. P.; Manautou, J. E.; Zhong, X.-b. The growth of siRNA-based therapeutics: updated clinical studies. *Biochemical Pharmacology* **2021**, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114432>.
- [57] Lima, W. F.; Prakash, T. P.; Murray, H. M.; Kinberger, G. A.; Li, W.; Chappell, A. E.; Li, C. S.; Murray, S. F.; Gaus, H.; Seth, P. P.; Swayze, E. E.; Crooke, S. T. Single-stranded siRNAs activate RNAi in animals. *Cell* **2012**, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.014>.
- [58] Nair, J. K. et al. Multivalent N -Acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, 16958–16961, <https://doi.org/10.1021/ja505986a>.
- [59] Crooke, S. T.; Witztum, J. L.; Bennett, C. F.; Baker, B. F. RNA-targeted therapeutics. *Cell Metabolism* **2018**, 714–739, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.004>.
- [60] Lennox, K. A.; Behlke, M. A. Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene Therapy* **2011**, 18, 1111–1120, <https://www.nature.com/articles/gt2011100>.

- [61] Lima, J. F.; Cerqueira, L.; Figueiredo, C.; Oliveira, C.; Azevedo, N. F. Anti-miRNA oligonucleotides: a comprehensive guide for design. *RNA Biology* **2018**, *15*, 338–352, <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1445959>.
- [62] Havens, M. A.; Hastings, M. L. splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Research* **2016**, 6549–6563, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw533>.
- [63] Kratschmer, C.; Levy, M. Effect of chemical modifications on Aptamer stability in serum. *Nucleic Acid Therapeutics* **2017**, 335–344, <https://doi.org/10.1089/nat.2017.0680>.
- [64] Iwano, N.; Adachi, T.; Aoki, K.; Nakamura, Y.; Hamada, M. Generative Aptamer discovery using RaptGen. *Nature Computational Science* **2022**, *2*, 378–386, <https://doi.org/10.1038/s43588-022-00249-6>.
- [65] Yu, B.; Zhao, X.; Lee, L. J.; Lee, R. J. Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics. *The AAPS Journal* **2009**, 195–203, <http://link.springer.com/10.1208/s12248-009-9096-1>.
- [66] Springer, A. D.; Dowdy, S. F. GalNAc-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNAi therapeutics. *Nucleic Acid Therapeutics* **2018**, 109–118, <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0736>.
- [67] Johannes, L.; Lucchino, M. Current challenges in delivery and cytosolic translocation of therapeutic RNAs. *Nucleic Acid Therapeutics* **2018**, *28*, 178–193, <https://doi.org/10.1089/nat.2017.0716>.
- [68] Juliano, R. L. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* **2016**, 6518–6548, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw236>.
- [69] Hou, X.; Zaks, T.; Langer, R.; Dong, Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials* **2021**, 1078–1094, <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00400-1>.
- [70] Swissmedic *Wegleitung Gentherapie GVO Umweltdaten, Dokument BW315_00_972*; 2023; p 21, link: [BW315_00.972d_WL Wegleitung Gentherapie / GVO Umweltdaten](https://doi.org/10.1038/s41578-021-00400-1).
- [71] Hungerbühler, K.; Boucher, J. M.; Pereira, C.; Roiss, T.; Scheringer, M. *Chemical Products and Processes: Foundations of Environmentally Oriented Design*; Springer International Publishing, 2021; <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-62422-4>.
- [72] Carlesso, A.; Hörberg, J.; Deganutti, G.; Reymer, A.; Matsson, P. Structural dynamics of therapeutic nucleic acids with phosphorothioate backbone modifications. *NAR Genomics and Bioinformatics* **2024**, <https://doi.org/10.1093/nargab/lqae058>.
- [73] Drygin, D.; Barone, S.; Bennett, C. F. Sequence-dependent cytotoxicity of second-generation oligonucleotides. *Nuc. Ac. Res.* **2004**, 6585–6594, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh997>.
- [74] Zhang, K.; Ho, K.-P.; Chatterjee, A.; Park, G.; Li, Z.; Catalano, J. G.; Parker, K. M. RNA hydrolysis at mineral-water interfaces. *Environ. Sci. Technol.* **2023**, 8280–8288, <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c01407>.
- [75] Ogram, Andrew.; Sayler, G. S.; Gustin, Denise.; Lewis, R. J. DNA adsorption to soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* **1988**, 982–984, <https://doi.org/10.1021/es00173a020>.
- [76] Gardner, C. M.; Gunsch, C. K. Adsorption capacity of multiple DNA sources to clay minerals and environmental soil matrices less than previously estimated. *Chemosphere* **2017**, 45–51, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.030>.
- [77] Pietramellara, G.; Ascher, J.; Borgogni, F.; Ceccherini, M. T.; Guerri, G.; Nannipieri, P. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biol. Fertil. Soils* **2009**, 219–235, <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>.
- [78] Saeki, K. DNA adsorption on synthetic and natural allophanes. *App. Clay Sci.* **2009**, <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.09.015>.

- [79] Levy-Booth, D. J.; Campbell, R. G.; Gulden, R. H.; Hart, M. M.; Powell, J. R.; Klironomos, J. N.; Pauls, K. P.; Swanton, C. J.; Trevors, J. T.; Dunfield, K. E. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biol. and Biochem.* **2007**, 2977–2991, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.020>.
- [80] Lorenz, M. G.; Wackernagel, W. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, 2948–2952, <https://doi.org/10.1128/aem.53.12.2948-2952.1987>.
- [81] Romanowski, G.; Lorenz, M. G.; Wackernagel, W. Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, 1057–1061, <https://doi.org/10.1128/aem.57.4.1057-1061.1991>.
- [82] Paget, E.; Monrozier, L. J.; Simonet, P. Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNaseI and influence on gene transfer. *FEMS Microbiology Letters* **1992**, 31–39, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05435.x>.
- [83] Gebhard, F.; Smalla, K. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1999**, 261–272, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00581.x>.
- [84] Pontiroli, A.; Simonet, P.; Frostegard, A.; Vogel, T. M.; Monier, J.-M. Fate of transgenic plant DNA in the environment. *Environ. Biosafety Res.* **2007**, 15–35, <https://doi.org/10.1051/ebr:2007037>.
- [85] Dubelman, S.; Fischer, J.; Zapata, F.; Huizinga, K.; Jiang, C.; Uffman, J.; Levine, S.; Carson, D. Environmental fate of double-Stranded RNA in agricultural soils. *PLoS ONE* **2014**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093155>.
- [86] Chatterjee, A.; Zhang, K.; Parker, K. M. Binding of dissolved organic matter to RNA and protection from Nuclease-mediated degradation. *Environmental Science & Technology* **2023**, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00750>.
- [87] Sodnikar, K.; Kaegi, R.; Christl, I.; Schroth, M. H.; Sander, M. Transport of double-stranded ribonucleic acids (dsRNA) and deoxyribonucleic acids (DNA) in sand and iron oxide-coated sand columns under varying solution chemistries. *Environ. Sci.: Processes Impacts* **2023**, 2067–2080, DOI <https://doi.org/10.1039/D3EM00294B>.
- [88] Nguyen, T. H.; Chen, K. L. Role of divalent cations in plasmid DNA adsorption to natural organic matter-coated silica surface. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 5370–5375, <https://doi.org/10.1021/es070425m>.
- [89] Bag, S.; Rauwolf, S.; Schwaminger, S. P.; Wenzel, W.; Berensmeier, S. DNA binding to the silica: cooperative adsorption in action. *Langmuir* **2021**, 37, 5902–5908, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00381>.
- [90] Nguyen, T. H.; Elimelech, M. Plasmid DNA adsorption on silica: kinetics and conformational changes in monovalent and divalent salts. *Biomacromolecules* **2007**, 24–32, <https://doi.org/10.1021/bm0603948>.
- [91] Feng, H.; Ma, S.; Chen, Z.; Li, Y.; Wang, M.; Ding, Y. Adsorption of nucleotides and nucleic acids on goethite nanoparticles: mode, sites and relationship with phosphate and non-phosphate structures. *Environ. Sci.: Nano* **2024**, 2655–2667, <https://doi.org/10.1039/D3EN00891F>.
- [92] Lopez, A.; Zhang, Y.; Liu, J. Tuning DNA adsorption affinity and density on metal oxide and phosphate for improved arsenate detection. *Journal of Colloid and Interface Science* **2017**, 493, 249–256, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.01.037>.
- [93] Sit, I.; Young, M. A.; Kubicki, J. D.; Grassian, V. H. Distinguishing different surface interactions for nucleotides adsorbed onto hematite and Goethite particle surfaces through ATR-FTIR spectroscopy and DFT calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2023**, 20557–20566, <https://doi.org/10.1039/D3CP01200J>.

- [94] James Cleaves, H.; Crapster-Pregont, E.; Jonsson, C. M.; Jonsson, C. L.; Sverjensky, D. A.; Hazen, R. A. The adsorption of short single-stranded DNA oligomers to mineral surfaces. *Chemosphere* **2011**, 1560–1567, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.023>.
- [95] Cai, P.; Huang, Q.; Zhang, X.; Chen, H. Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol. *Soil Biology and Biochemistry* **2006**, 471–476, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.05.019>.
- [96] Brabec, V. conformational changes in DNA induced by its adsorption at negatively charged surfaces. *J. Electroanal. Chem.* **1983**, [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(83\)80672-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(83)80672-X).
- [97] Li, Y.; Breaker, R. R. Kinetics of RNA degradation by specific base catalysis of transesterification involving the 2'-hydroxyl group. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 5364–5372, <https://doi.org/10.1021/ja990592p>.
- [98] Radzicka, A.; Wolfenden, R. A proficient enzyme. *Science* **1995**, 90–93, <https://doi.org/10.1126/science.7809611>.
- [99] Schroeder, G. K.; Lad, C.; Wyman, P.; Williams, N. H.; Wolfenden, R. The time required for water attack at the Phosphorus atom of simple Phosphodiester and of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 4052–4055, <https://doi.org/10.1073/pnas.0510879103>.
- [100] Zenkova, M. A., Ed. *Artificial nucleases*; Springer Berlin Heidelberg, 2004; https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-18510-6_2.
- [101] Zhang, K.; Hodge, J.; Chatterjee, A.; Moon, T. S.; Parker, K. M. Duplex structure of double-stranded RNA provides stability against Hydrolysis relative to single-stranded RNA. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, 8045–8053, <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01255>.
- [102] Usher, D. RNA double helix and the evolution of the 3',5' linkage. *Nature New Biology* **1972**, 207–208, <https://doi.org/10.1038/newbio235207a0>.
- [103] Breslow, R.; Huang, D. L. Effects of metal ions, including Mg²⁺ and lanthanides, on the cleavage of ribonucleotides and RNA model compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, 4080–4083, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.10.4080>.
- [104] Oivanen, M.; Kuusela, S.; Lönnberg, H. Kinetics and mechanisms for the cleavage and isomerization of the phosphodiester bonds of RNA by brønsted acids and bases. *Chemical Reviews* **1998**, 961–990, <https://doi.org/10.1021/cr960425x>.
- [105] Chatterjee, A.; Zhang, K.; Rao, Y.; Sharma, N.; Giammar, D. E.; Parker, K. M. Metal-catalyzed hydrolysis of RNA in aqueous environments. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, 3564–3574, <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08468>.
- [106] Shelton, V. M.; Morrow, J. R. Catalytic transesterification and hydrolysis of RNA by Zinc(II) complexes. *Inorganic Chemistry* **1991**, 4295–4299, <https://doi.org/10.1021/ic00023a003>.
- [107] Stern, M. K.; Bashkin, J. K.; Sall, E. D. Hydrolysis of RNA by transition metal complexes. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, 5357–5359, <https://doi.org/10.1021/ja00169a057>.
- [108] Pinter, J.; Jones, B. S.; Vriens, B. Loads and elimination of trace elements in wastewater in the great lakes basin. *Water Research* **2022**, 117949, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117949>.
- [109] Hammaini, A.; Gonzalez, F.; Ballester, A.; Blazquez, M.; Munoz, J. Biosorption of heavy metals by activated sludge and their desorption characteristics. *Journal of Environ. Management* **2007**, 419–426, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.06.015>.
- [110] Mojarro, A.; Jin, L.; Szostak, J. W.; Head, J. W.; Zuber, M. T. In search of the RNA world on Mars. *Geobiology* **2021**, 307–321, <https://doi.org/10.1111/gbi.12433>.

- [111] Kochetkov, N. K.; Budovskii, E. I. Organic chemistry of nucleic acids. *Springer US* **1972**, <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2973-2.4>.
- [112] Hawkins, C. L.; Davies, M. J. Hypochlorite-induced damage to nucleosides: formation of chloramines and Nitrogen-centered radicals. *Chemical Research in Toxicology* **2001**, 1071–1081, <https://doi.org/10.1021/tx010071r>.
- [113] Hawkins, C. L.; Davies, M. J. Hypochlorite-induced damage to DNA, RNA, and polynucleotides: Formation of chloramines and Nitrogen-centered radicals. *Chemical Research in Toxicology* **2002**, 83–92, <https://doi.org/10.1021/tx015548d>.
- [114] Napolitano, M. J.; Stewart, D. J.; Margerum, D. W. Chlorine dioxide oxidation of Guanosine 5'-Monophosphate. *Chemical Research in Toxicology* **2006**, 1451–1458, <https://doi.org/10.1021/tx060124a>.
- [115] Ge, Y.; Zhang, X.; Shu, L.; Yang, X. Kinetics and mechanisms of virus inactivation by Chlorine Dioxide in water treatment: A review. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2021**, 560–567, [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(86\)90084-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(86)90084-9).
- [116] Steenken, S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides. *Chemical Reviews* **1989**, 503–520, <https://doi.org/10.1021/cr00093a003>.
- [117] Steenken, S.; Jovanovic, S. V. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of Adenosine and Guanosine radicals in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 617–618, <https://doi.org/10.1021/ja962255b>.
- [118] Cataldo, F. Ozone degradation of ribonucleic acid (RNA). *Polymer Degradation and Stability* **2005**, 274–281, <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.10.020>.
- [119] Cataldo, F. Ozone degradation of biological macromolecules: Proteins, Hemoglobin, RNA, and DNA. *Ozone: Science & Engineering* **2006**, 317–328, <https://doi.org/10.1080/01919510600900290>.
- [120] Criegee, R. Mechanism of Ozonolysis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, 745–752, <https://doi.org/10.1002/anie.197507451>.
- [121] Geletneky, C.; Berger, S. The mechanism of Ozonolysis revisited by ¹⁷O-NMR spectroscopy. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1625–1627, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199808\)1998:8<1625::AID-EJOC1625>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199808)1998:8<1625::AID-EJOC1625>3.0.CO;2-L).
- [122] Wagner, J. R.; Madugundu, G. S.; Cadet, J. Ozone-induced DNA damage. *Chemical Research in Toxicology* **2021**, 80–90, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00342>.
- [123] Funke, J.; Prasse, C.; Dietrich, C.; Ternes, T. A. Ozonation products of zidovudine and thymidine in oxidative water treatment. *Water Research X* **2021**, 11, 100090, <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2021.100090>.
- [124] Beck, S. E.; Rodriguez, R. A.; Hawkins, M. A.; Hargy, T. M.; Larason, T. C.; Linden, K. G. Comparison of UV-induced inactivation and RNA damage in MS2 phage across the germicidal UV Spectrum. *Applied and Environmental Microbiology* **2016**, 1468–1474, <https://doi.org/10.1128/AEM.02773-15>.
- [125] McKinney, C. W.; Pruden, A. Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 13393–13400, <https://doi.org/10.1021/es303652q>.
- [126] Chang, P. H.; Juhrend, B.; Olson, T. M.; Marrs, C. F.; Wigginton, K. R. Degradation of extracellular antibiotic resistance genes with UV 254 treatment. *Environmental Science & Technology* **2017**, 6185–6192, <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01120>.
- [127] Mattle, M. J.; Kohn, T. Inactivation and tailing during UV disinfection of viruses. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, 10022–10030, <https://doi.org/10.1021/es302058v>.

- [128] Pearson, M.; Johns, H. E. Suppression of hydrate and dimer formation in Traviolet-Irradiated Poly (A + U) relative to Poly. *Journ. of Molec. Bio.* **1966**, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(66\)90061-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(66)90061-1).
- [129] Qiao, Z.; Ye, Y.; Chang, P. H.; Thirunarayanan, D.; Wigginton, K. R. Nucleic acid photolysis by UV254 and the impact of virus encapsidation. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, 10408–10415, <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02308>.
- [130] Houseley, J.; Tollervey, D. The many pathways of RNA degradation. *Cell* **2009**, 763–776, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.019>.
- [131] Tipton, K.; Boyce, S. History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics* **2000**, 16, 34–40, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.1.34>.
- [132] Lassila JK, H. D., Zalatan JG Biological phosphoryl-transfer reactions: Understanding mechanism and catalysis. *Ann. Rev. of Biochem.* **2011**, 669–702, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060409-092741>.
- [133] Cleland, W. W.; Hengge, A. C. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3252–3278, <https://doi.org/10.1021/Cr050287o>.
- [134] Bhagwat, M.; Gerlt, J. A. 3'- and 5'-strand cleavage reactions catalyzed by the Fpg protein from *Escherichia Coli* occur via successive β - and δ -elimination Mechanisms, respectively. *Biochemistry* **1996**, 659–665, <https://doi.org/10.1021/bi9522662>.
- [135] Lebedeva, N. A.; Anarbaev, R. O.; Kupryushkin, M. S.; Rechkunova, N. I.; Pysnyi, D. V.; Stetsenko, D. A.; Lavrik, O. I. Design of a new fluorescent oligonucleotide-based assay for a highly specific real-time detection of apurinic apyrimidinic site cleavage by tyrosyl-DNA phosphodiesterase. *Bioconj. Chem.* **2015**, 2046–2053, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00451>.
- [136] Ammerman, J. W.; Azam, F. Bacterial 5-nucleotidase in aquatic ecosystems: A novel mechanism of phosphorus regeneration. *Science* **1985**, 227, 1338–1340, <https://doi.org/10.1016/10.1126/science.227.4692.1338>.
- [137] Rangarajan, E. S.; Shankar, V. Sugar non-specific endonucleases. *FEMS Microbiology Reviews* **2001**, 583–613, [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(01\)00069-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00069-9).
- [138] Hsia, K.-C.; Li, C.-L.; Yuan, H. S. Structural and functional insight into sugar-nonspecific nucleases in host defense. *Current Opinion in Struct. Bio.* **2005**, 126–134, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.01.015>.
- [139] Roberts, R. J.; Vincze, T.; Posfai, J.; Macelis, D. REBASE a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nuc. Ac. Research* **2010**, D234–D236, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1046>.
- [140] Rozners, E. Chemical modifications of CRISPR RNAs to improve gene-editing activity and specificity. *Journal of the American Chemical Society* **2022**, 144, 12584–12594.
- [141] Li, B.; Zeng, C.; Li, W.; Zhang, X.; Luo, X.; Zhao, W.; Zhang, C.; Dong, Y. Synthetic oligonucleotides inhibit CRISPR-Cpf1-mediated genome editing. *Cell reports* **2018**, 25, 3262–3272.
- [142] Epple, S.; Modi, A.; Baker, Y. R.; Węgrzyn, E.; Traoré, D.; Wanat, P.; Tyburn, A. E. S.; Shivalingam, A.; Taemaitree, L.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T. A New 1,5-disubstituted triazole DNA backbone mimic with enhanced Polymerase compatibility. *Journal of the American Chemical Society* **2021**, <https://doi.org/10.1021/jacs.1c08057>.
- [143] Stelzer, R.; Rzoska-Smith, E.; Gundersø, S.; Rothweiler, U.; Williamson, A. Using modified synthetic oligonucleotides to assay nucleic acid metabolizing enzymes. *Journal of Visualized Experiments* **2024**, <https://dx.doi.org/10.3791/66930>.

- [144] Nagatsugi, F. *Handbook of Chemical Biology of Nucleic Acids*; Springer Nature Singapore, 2022; https://doi.org/10.1007/978-981-16-1313-5_22-1.
- [145] Soll, J. M.; Sobol, R. W.; Mosammaparast, N. Regulation of DNA alkylation damage repair: lessons and therapeutic opportunities. *Trends in Biochemical Sciences* **2017**, 206–218, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.10.001>.
- [146] Henry, E.; Charalambous, E.; Betsou, F.; Mathieson, W. Implementing routine monitoring for nuclease contamination of equipment and consumables into the quality Management system of a laboratory. *Heliyon* **2024**, 10, e24603–e24603.
- [147] Yang, W. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Quarterly Reviews of Biophysics* **2011**, 1–93, <https://doi.org/10.1017/S0033583510000181>.
- [148] Greg Lohman, N. E. B. The effect of nucleic acid modifications on digestion by DNA exonucleases. 2019; https://www.neb.com/en/-/media/neb/files/feature-articles/fa_nebexpressions_issueii_2019_exoendo.pdf?rev=9999d845484c40afa2af91a9075c2f20&hash=E037B3A41F16119C5F28F77FE0556235, Zugriff am 15. April 2025.
- [149] Kurreck, J. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Research* **2002**, <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.1911>.
- [150] Chase, J. W.; Richardson, C. C. Exonuclease VII of Escherichia Coli. *Journal of Biological Chemistry* **1974**, 4553–4561, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42454-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42454-X).
- [151] Mell, J. C.; Redfield, R. J. Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity. *Journal of Bacteriol.* **2014**, 1471–1483, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1046>.
- [152] Blokesch, M. Natural competence for transformation. *Current Biology* **2016**, 26, R1126–R1130.
- [153] Hanßmann, J.; Pané-Farré, J.; Meiser, M.; Girbig, M.; Fu, L.; Madej, M. G.; Sendker, F. L.; Thölken, C.; Lechner, M.; Ziegler, C.; others A conserved nuclease facilitates environmental DNA uptake. *Nucleic Acids Research* **2025**, 53, gkaf443.
- [154] Chen, I.; Dubnau, D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology* **2004**, 2, 241–249.
- [155] Mell, J. C.; Hall, I. M.; Redfield, R. J. Defining the DNA uptake specificity of naturally competent Haemophilus influenzae cells. *Nucleic acids research* **2012**, 40, 8536–8549.
- [156] Haque, U. S.; Yokota, T. Enhancing antisense oligonucleotide-based therapeutic delivery with DG9, a versatile cell-penetrating peptide. *Cells* **2023**, 2395, <https://doi.org/10.3390/cells12192395>.
- [157] OECD *Considerations for the Environmental Risk Assessment of the Application of Sprayed or Externally Applied ds-RNA-Based Pesticides*; Series on Pesticides and Biocides 104; OECD, 2020; p 173, https://www.oecd-ilibrary.org/environment/considerations-for-the-environmental-risk-assessment-of-the-application-of-sprayed-or-externally-applied-ds-rna-based-pesticides_576d9ebb-en.
- [158] Kočiřová, E.; Praus, P.; Rosenberg, I.; Seksek, O.; Sureau, F.; Štěpánek, J.; Turpin, P.-Y. Cellular uptake of modified oligonucleotides: fluorescence approach. *Journal of molecular structure* **2005**, 744, 151–153.
- [159] Biscans, A.; Rouanet, S.; Bertrand, J.-R.; Vasseur, J.-J.; Dupouy, C.; Debart, F. Synthesis, binding, nuclease resistance and cellular uptake properties of 2-O-acetalester-modified oligonucleotides containing cationic groups. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, 23, 5360–5368.
- [160] Andersson, P.; Burel, S. A.; Estrella, H.; Foy, J.; Hagedorn, P. H.; Harper, T. A.; Henry, S. P.; Hoflack, J.-C.; Holgersen, E. M.; Levin, A. A.; Morrison, E.; Pavlicek, A.; Penso-Dolfin, L.; Saxena, U. Assessing hybridization-dependent off-target risk for therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics* **2025**, 16–33, <https://doi.org/10.1089/nat.2024.0072>.

- [161] Berman, C. L.; Barros, S. A.; Galloway, S. M.; Kasper, P.; Oleson, F. B.; Priestley, C. C.; Sweder, K. S.; Schlosser, M. J.; Sobol, Z. OSWG recommendations for genotoxicity testing of novel oligonucleotide-based therapeutics. *Nuc. Ac. Therap.* **2016**, 73–85, <https://doi.org/10.1089/nat.2015.0534>.
- [162] Henry, S. P.; Beattie, G.; Yeh, G.; Chappel, A.; Giclas, P.; Mortari, A.; Jagels, M. A.; Kornbrust, D. J.; Levin, A. A. Complement activation is responsible for acute toxicities in rhesus monkeys treated with a phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *Intern. Immunopharm.* **2002**, 1657–1666, [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(02\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(02)00142-X).
- [163] Croft, L. V.; Fisher, M.; Barbhuiya, T. K.; El-Kamand, S.; Beard, S.; Rajapakse, A.; Gamsjaeger, R.; Cubeddu, L.; Bolderson, E.; O’Byrne, K.; Richard, D.; Gandhi, N. S. Sequence- and structure-dependent cytotoxicity of phosphorothioate and 2’-O-Methyl modified single-stranded oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics* **2024**, 143–155, <https://doi.org/10.1089/nat.2023.0056>.
- [164] Carver, M. P.; Charleston, J. S.; Shanks, C.; Zhang, J.; Mense, M.; Sharma, A. K.; Kaur, H.; Sazani, P. Toxicological characterization of exon skipping Phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs) in non-human primates. *Journal of Neuromuscular Diseases* **2016**, 381–393, <https://doi.org/10.3233/JND-160157>.
- [165] Shen, W.; De Hoyos, C. L.; Sun, H.; Vickers, T. A.; Liang, X.-h.; Crooke, S. T. Acute Hepatotoxicity of 2’ Fluoro-Modified 5–10–5 Gapmer Phosphorothioate Oligonucleotides in Mice Correlates with Intracellular Protein Binding and the Loss of DBHS Proteins. *Nucleic Acids Research* **2018**, 2204–2217, <https://doi.org/10.1093/nar/gky060>.
- [166] Henry, S. P.; Kim, T.-W.; Kramer-Stickland, K.; Zanardi, T. A.; Fey, R. A.; Levin, A. A. Toxicologic Properties of 2’-O-Methoxyethyl Chimeric Antisense Inhibitors in Animals and Man. *Antisense drug technology: principles, strategies, and applications* **2004**, 327–363, <https://doi.org/10.1002/bdrb.20023>.
- [167] Zanardi, T. A.; Kim, T.-W.; Shen, L.; Serota, D.; Papagiannis, C.; Park, S.-Y.; Kim, Y.; Henry, S. P. Chronic toxicity assessment of 2’-O-Methoxyethyl antisense oligonucleotides in mice. *Nucleic Acid Therapeutics* **2018**, 233–241, <https://doi.org/10.1089/nat.2017.0706>.
- [168] Partridge, W.; Xia, S.; Kwoh, T. J.; Bhanot, S.; Geary, R. S.; Baker, B. F. Improvements in the tolerability profile of 2’-O-Methoxyethyl chimeric antisense oligonucleotides in parallel with advances in design, screening, and other methods. *Nucleic Acid Therapeutics* **2021**, 417–426, <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0917>.
- [169] Crooke, S. T.; Baker, B. F.; Kwoh, T. J.; Cheng, W.; Schulz, D. J.; Xia, S.; Salgado, N.; Bui, H.-H.; Hart, C. E.; Burel, S. A.; Younis, H. S.; Geary, R. S.; Henry, S. P.; Bhanot, S. Integrated safety assessment of 2-O-Methoxyethyl chimeric antisense oligonucleotides in non human primates and healthy human volunteers. *Molecular Therapy* **2016**, 1771–1782, <https://doi.org/10.1038/mt.2016.136>.
- [170] Sazani, P.; Weller, D. L.; Shrewsbury, S. B. Safety pharmacology and genotoxicity evaluation of AVI-4658. *International Journal of Toxicology* **2010**, 143–156, <https://doi.org/10.1177/1091581809359206>.
- [171] Richardson, F. C.; Zhang, C.; Lehrman, S. R.; Koc, H.; Swenberg, J. A.; Richardson, K. A.; Bendele, R. A. Quantification of 2’-Fluoro-2’-Deoxyuridine and 2’-Fluoro-2’-Deoxycytidine in DNA and RNA isolated from rats and woodchucks using LC/MS/MS. *Chemical Research in Toxicology* **2002**, 922–926, <https://doi.org/10.1021/tx020014d>.
- [172] Janas, M. M. et al. Safety evaluation of 2’-Deoxy-2’-Fluoro nucleotides in GalNAc-siRNA conjugates. *Nucleic Acids Research* **2019**, 3306–3320, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz140>.

- [173] Kim, T.-W.; Papagiannis, C. N.; Zwick, L. S.; Snyder, P.; Engelhardt, J. A.; Yu, R. Z.; Hoffmaster, C. M.; Rastogi, A.; Henry, S. P. Carcinogenicity assessment of Inotersen in Tg.rasH2 mice and Sprague-Dawley rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2025**, 105743, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2024.105743>.
- [174] Pankiewicz, K. W. Fluorinated nucleosides. *Carbohydrate Research* **2000**, 87–105, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c02667>.
- [175] Saleh, A. F.; Bachman, M.; Priestley, C. C.; Gooderham, N. J.; Andersson, P.; Henry, S. P.; Edmunds, N. J.; Fellows, M. D. 2'-O-2-Methoxyethyl nucleosides are not phosphorylated or incorporated into the genome of human lymphoblastoid TK6 cells. *Toxicological Sciences* **2018**, 70–78, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy005>.
- [176] Arguello, A. E.; Li, A.; Sun, X.; Eggert, T. W.; Mairhofer, E.; Kleiner, R. E. Reactivity-dependent profiling of RNA 5-Methylcytidine dioxygenases. *Nature Communications* **2022**, 4176, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31876-2>.
- [177] Liu, Y.-J.; Chen, J.; Li, X.; Zhou, X.; Hu, Y.-M.; Chu, S.-F.; Peng, Y.; Chen, N.-H. Research progress on Adenosine in central nervous system diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2019**, <https://doi.org/10.1111/cns.13190>.
- [178] Johnson, A. A.; Ray, A. S.; Hanes, J.; Suo, Z.; Colacino, J. M.; Anderson, K. S.; Johnson, K. A. Toxicity of antiviral nucleoside analogs and the human mitochondrial DNA polymerase. *Journal of Bio. Chem.* **2001**, 40847–40857, <https://doi.org/10.1074/jbc.M106743200>.
- [179] Ami, E.-i.; Ohrui, H. Intriguing antiviral modified nucleosides: a retrospective view into the future treatment of COVID-19. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2021**, 510–517, <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.1c00070>.
- [180] Lee, H.; Hanes, J.; Johnson, K. A. Toxicity of nucleoside analogues used to treat AIDS and the selectivity of the mitochondrial DNA polymerase. *Biochemistry* **2003**, 14711–14719, <https://doi.org/10.1021/bi035596s>.
- [181] Thomas, D.; Zalcberg, J. 5-Fluorouracil: A pharmacological paradigm in the use of cytotoxics. *Clin Exp Pharma Physio* **1998**, 887–895, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c02667>.
- [182] Agrawal, S.; Zhao, Q. Mixed backbone oligonucleotides: improvement in oligonucleotide-induced toxicity, in vivo. *Antisense and Nuc. Ac. Drug Dev.* **1998**, 135–139, <https://doi.org/10.1089/oli.1.1998.8.135>.
- [183] Dalakouras, A.; Koidou, V.; Papadopoulou, K. DsRNA-based pesticides: considerations for efficiency and risk assessment. *Chemosphere* **2024**, 141530, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141530>.
- [184] Chandrasekaran, A. R.; Rusling, D. A. Triplex-forming oligonucleotides: A third strand for DNA nanotechnology. *Nucleic Acids Research* **2018**, 1021–1037, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1230>.
- [185] Upegui-Gonzalez, L. C.; François, J.-C.; Ly, A.; Trojan, J. The approach of triple helix formation in control of gene expression and the treatment of tumors expressing IGF-I. *Springer US* **2002**, 319–332, https://doi.org/10.1007/0-306-46817-4_27.
- [186] Duca, M.; Vekhoff, P.; Oussedik, K.; Halby, L.; Arimondo, P. B. The triple helix: 50 years later, the outcome. *Nucleic Acids Research* **2008**, 5123–5138, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn493>.
- [187] Swingle, B.; Markel, E.; Costantino, N.; Bubunencko, M. G.; Cartinhour, S.; Court, D. L. Oligonucleotide Recombination in Gram-negative Bacteria. *Molecular Microbiology* **2010**, 138–148, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06976.x>.
- [188] Storici, F.; Lewis, L. K.; Resnick, M. A. In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nature Biotechnology* **2001**, 773–776, <https://doi.org/10.1038/90837>.

- [189] Hill, D. E. Mutagenesis with degenerate oligonucleotides: creating numerous mutations in a small DNA sequence. *Current Protocols in Molecular Biology* **1999**, <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0802as46>.
- [190] Reshat, R.; Priestley, C. C.; Gooderham, N. J. Mutagenesis by an antisense oligonucleotide and its degradation product. *Toxicological Sciences* **2012**, 319–327, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs247>.
- [191] Wang, H. H.; Xu, G.; Vonner, A. J.; Church, G. Modified Bases enable high-efficiency oligonucleotide-mediated allelic replacement via mismatch repair evasion. *Nucleic Acids Research* **2011**, 7336–7347, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr183>.
- [192] Lorenz, M. G.; Wackernagel, W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* **1994**, <https://doi.org/10.1128/mr.58.3.563-602.1994>.
- [193] Robinson, S. Sequence similarity search of EndoV proteins in environmental metagenomes. 2025; https://github.com/MSM-group/EndoV_environment, Zugriff am 20. Juni 2025.
- [194] Hua, Z.; Ouellette, M.; Makkay, A. M.; Papke, R. T.; Zhaxybayeva, O. Nutrient supplementation experiments with saltern microbial communities implicate utilization of DNA as a source of phosphorus. *The ISME journal* **2021**, 15, 2853–2864.
- [195] Finkel, S. E.; Kolter, R. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *Journal of bacteriology* **2001**, 183, 6288–6293.
- [196] Boos, J. A. et al. Whole-body scanning PCR; a highly sensitive method to study the biodistribution of mRNAs, noncoding RNAs and therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* **2013**, e145–e145, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt515>.
- [197] Shin, M.; Meda Krishnamurthy, P.; Devi, G.; Watts, J. K. Quantification of antisense oligonucleotides by splint ligation and quantitative polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Therapeutics* **2022**, 66–73, <https://doi.org/10.1089/nat.2021.0040>.
- [198] Korlach, J.; Turner, S. W. Going beyond five bases in DNA sequencing. *Current Opinion in Structural Biology* **2012**, 251–261, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.04.002>.
- [199] Beaulaurier, J.; Schadt, E. E.; Fang, G. Deciphering bacterial epigenomes using modern sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* **2019**, 157–172, <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0081-3>.
- [200] Lu, X.; Du, X.; Zhong, D.; Li, R.; Cao, J.; Huang, S.; Wang, Y. Nanopore environmental analysis. *JACS Au* **2025**, 1570–1590, <https://doi.org/10.1021/jacsau.5c00114>.
- [201] Liu, Y.; Lippens, J. L.; Prostko, P.; De Vries, R.; Valkenburg, D.; De Vijlder, T. OligoDistiller: A platform agnostic software tool for MS and MS² data analysis of complex oligonucleotides and their impurities. *Anal. Chem.* **2025**, 96–105, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c02667>.
- [202] Chimento, D. P.; Anderson, A. L.; Fial, I.; Ascoli, C. A. Bioanalytical assays for oligonucleotide therapeutics: Adding Antibody-based Immunoassays to the toolbox as an orthogonal approach to LC-MS/MS and ligand binding assays. *Nucleic Acid Therapeutics* **2025**, 35, 6–15, <https://doi.org/10.1089/nat.2024.0065>.
- [203] Burki, U.; Straub, V. *Morpholino Oligomers: Methods and Protocols*; Springer, 2017; pp 265–277, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6817-6_22.

Anhang A

mON Datenbank

A.1 Aufbau der Datenbank

Die mON Datenbank ist mit dem Link von Scheidat et al.²⁸ zugänglich und enthält fünf worksheets. In diesem Bericht wird oft auf die ersten zwei, “Modifikationen” und “Pharmaka”, in Kapitel 2 und 3 verwiesen. Das Worksheet “Modifikationen” (Abb. A.1) enthält eine Liste der in der Literatur erwähnten chemischen Modifikationen, deren Einordnung als Strukturelement gemäss Abbildung 2.1 sowie die Zuordnung zu den mON Kategorien (Abschnitt 1.3 und Abb. 2.8). Das Worksheet “Pharmaka” (Abb. A.2) listet Pharmaka auf, welche für klinische Anwendungen zugelassen wurden sowie einzelne Medikamente, die sich im Zulassungsverfahren befinden. Diese Liste wurde Anfangs Juni 2025 letztmalig aktualisiert. Neben Angaben zur medizinischen Anwendung sind u.a. Typen und Anzahl der chemischen Modifikationen aufgeführt, welche prioritär zu Beurteilung von Exposition und Effekten beigezogen werden. Siehe dazu auch Tabelle 2.1. Die weiteren Worksheets enthalten ein Glossar, eine Auswahl von mONs in der Produktentwicklung sowie eine Referenzliste, mit welcher die Zitationscodes den Originalpublikation bzw. Zulassungsdossiers zugeordnet werden können.

1	2	A		B		C		D		E		F		G		H		I		J		K		L	
Name	Abbreviation	Structure element	Worksheet Pharmake	Watch-Binding affinity	Nuclease resistance	Improved uptake	Gapmer	sRNA	SSOs	mRNA	Adapters														
2	2'-azido	2'-Substitution Ribose	no				n.c.	n.c.	n.c.		n.c.														
3	2'-fluoro	2'-F	yes	enhanced	unvarying		yes	yes	yes	yes	n.c.														
4	2'-O-methoxyethyl	2'-MOE	yes	enhanced	enhanced		yes	yes (but spare, not yes)	yes	yes	yes														
5	2'-O-allyl	2'-O-Allyl	no				n.c.	yes	n.c.	no	n.c.														
6	2'-O-benzyl	2'-O-B	no																						
7	2'-O-methyl	2'-OMe	yes	enhanced	enhanced		yes	yes	yes	yes	yes														
8	2'-O-methyl-4-pyridine	2'-OMe-Py	no																						
9	2'-N-adamantylmethylcarboxyl-2'-aminoLNA	ADA	no				n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
10	2'-aminoethoxymethyl	AEH	no				n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
11	2'-deoxy-2'-N,4'-C-ethylene-LNA	AEHA	no				n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
12	2'-aminoisopropyl	AP	no				n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
13	2'-aminoisopropoxymethyl	APM	no				n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
14	2'-cyanoethyl	CE	no				n.c.	yes	n.c.	n.c.	n.c.														
15	2',4'-carbocyclic-ENA-locked nucleic acid	CEHA	no				yes	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
16	constrained bridged nucleic acid	CET	no	enhanced	enhanced	NA	yes	no	yes	no	no														
17	2',4'-carbocyclic-LNA-locked nucleic acid	CLNA	no				n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
18	2'-[[(N,Ndimethylamino)oxy]ethyl]	DMAEOE	no																						
19	2'-aminoethyl	EA	no				n.c.	yes	n.c.	n.c.	n.c.														
20	ethylene-bridged nucleic acid	EMA	no				n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
21	2'-guanidinoethyl	GE	no				n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
22	4'-C-hydroxymethyl-DNA	HM	no				n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
23	locked nucleic acid	LNA	no	enhanced	NA	reduced	yes	no	yes	yes	no														
24	2'-O-[2'-(methylamino)-2'-oxyethyl]	NMA	no																						
25	oxetane-LNA	OX	no				n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
26	2'-N-pyren-1'-ylmethyl-2'-amino-LNA	PIR	no				n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
27	2-thiothymidine	2-thio-dt	no	NA	NA		yes	yes	n.c.	n.c.	n.c.														
28	5-methylcytidine	5-MC	yes	enhanced	enhanced	unvarying	yes	yes	n.c.	no	n.c.														
29	5-methyluridine	5-MU	yes				yes	n.c.	n.c.	no	n.c.														
30	5-nitroindole	5-NI	no								n.c.														
31	5-triazolylphenyl-thymine	5-ph-TZT	no																						
32	abasic RNA	abasic	no				n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
33	CS-thiazole	CS-thiazole	no																						
34	2,6-diaminopurine	DAP	no																						
35	N-ethylpiperidine 7'-FMA triazole modified adenine	EEA-TRz-Pip-A	no																						
36	5-fluoro-2'-deoxyuridine	FDU	no																						
37	N6-methyladenosine	m ⁶ A	no																						
38	N-ethylpiperidine 6'-triazole modified adenine	N ⁶ -(ETP-Pip-TRz)-A	no																						
39	6-phenylpyrrocytosine	PhpC	no																						
40	pseudouridine	pseudo	no																						
41	2,4-difluorotolylribonucleoside	2F	no																						
42	boranophosphate	BP	no				no	yes	n.c.	n.c.	n.c.														
43	methoxypropylphosphonate	MOP	no																						
44	methylphosphonat	MP	no																						
45	thiophosphoramidat	NP	no				no	yes	n.c.	n.c.	n.c.														
46	phosphonoacetat	PACE	no				yes	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.														
47	phosphorothioate	PS	yes	reduced	enhanced	enhanced	yes	can reduce activity	no	yes	yes														

Abbildung A.1 Ausschnitt aus worksheet “Modifikationen” der mON Datenbank.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
	Product			mON-category	Drug availability					Nucleotide information					
1	Entry	Active ingredient	Trade name	Type	Year of PD	FDA	EMA	Status	Remarks	Strand type	RNA/DNA	Length (nt in total) H	Sense strand	Antisense strand (nt)	Phosphorothioate
2															
3	1	Alcaloforsen	Camligo	Gapmer	Ongoing	No	No	New product	...	ss	DNA	20	---	---	P3
4	2	ALN-AT3	Fusiforsen	sRNA	Ongoing	No	No	New product	Availability in 2027	ds	RNA	NA	---	---	---
5	3	ALN-CC5	Cendrisen	sRNA	Ongoing	No	No	Ongoing	In phase 2	ds	RNA	NA	NA	NA	P5
6	4	Amacrisnated pegol	Izervay	Aptamer	2023	Yes	No	Inaccessible	Uncertainty in clinical benefit	ss	RNA	39	---	---	---
7	5	Castimeren	Amondys 45	SSO	2021	Yes	No	Ongoing	...	ss	DNA	22	---	---	---
8	6	Delibrotide	Deftelio	Gapmer	2016	Yes	Yes	Accessible	Pig DNA	ss and ds	DNA	50	---	---	---
9	7	Eplonferen	Wainvua	Gapmer	2023	Yes	No	Ongoing	...	ss	DNA	20	---	---	P5
10	8	Etepliforsen	Exondys 51	SSO	2016	Yes	No	Inaccessible	Uncertainty in clinical benefit	ss	DNA	30	---	---	---
11	9	Forniviforsen	Vitravene	Gapmer	1998	Yes	Yes	Inaccessible	...	ss	DNA	21	---	---	P5
12	10	Givosiran	Givlaari	sRNA	2019	Yes	Yes	Accessible	...	ds	RNA	43	21	22	P5
13	11	Gonodiforsen	Vyondys 53	SSO	2019	Yes	No	Inaccessible	Renal toxicity, Ongoing	ss	RNA	25	---	---	---
14	12	Inclisiran	LEOVI	sRNA	2021	Yes	Yes	Accessible	...	ds	RNA	44	21	23	P5
15	13	Inotersen	Tegsedi	Gapmer	2018	Yes	Yes	Accessible	...	ss	DNA	20	---	---	P5
16	14	Lumasiran	OXLUMO	sRNA	2020	Yes	Yes	Accessible	...	ds	DNA	44	21	23	P5
17	15	Milposimeren	Kymnato	Gapmer	2013	Yes	No	Inaccessible	Uncertainty in clinical benefit	ss	DNA	20	---	---	P5
18	16	Nedosiran	Rivfloza	sRNA	2023	Yes	No	Ongoing	...	ds	RNA	58	36	22	P5
19	17	Nusinersen	Spinraza	SSO	2016	Yes	Yes	Accessible	...	ss	RNA	18	---	---	P5
20	18	Patisiran	ONPATTRO	sRNA	2018	Yes	Yes	Accessible	...	ss	RNA	40	19	21	---
21	19	Pegaptanib	Macugen	Aptamer	2004	No	No	Inaccessible	...	ss	RNA	28	---	---	P5
22	20	QPI-1002	Tepnasiran	sRNA	Ongoing	No	No	Inaccessible	...	ds	RNA	38	19	19	---
23	21	RG6042	Tomnieren	SSO	Ongoing	No	No	Inaccessible	...	ss	DNA	18	---	---	P5
24	22	Tivanisiran	SYL1001	sRNA	Ongoing	No	No	Inaccessible	In phase 3	ds	RNA	38	19	19	---
25	23	Tofersen	Qalsody	Gapmer*	2023	Yes	Yes	Accessible	Since 2024	ss	RNA-DNA-RNA	20	---	---	P5
26	24	Viltoliforsen	Viltespo	SSO	2020	Yes	Yes	Accessible	Orphan drug	ss	NA	21	---	---	---
27	25	Volanesorsen	Waylivra	Gapmer	2019	Yes	Yes	Accessible	...	ss	DNA	20	---	---	P5
28	26	Vutrisiran	Amvuttra	sRNA	2022	Yes	No	Accessible	...	ds	RNA	43	21	22	P5
29															
30															
31															
32															
33															
34															
35															
36															

Accessible: On the market in EU
Inaccessible: Not on the market in EU
Ongoing: the approval is ongoing
New product: not in FDA/EMA evaluation

All base pairs added
This column only refers to sRNA

Abbildung A.2 Ausschnitt aus worksheet "Pharmaka" der mON Datenbank.