

Molekulaartechnoloogia praktilise meditsiini teenistuses. *Antisense*-tehnika

Ursel Soomets, Riina Mahlapuu, Mihkel Zilmer – TÜ biokeemia instituut

antisense, fosforotioaadid, peptiidsed nukleiinhapped, mRNA processing, capping, splicing Fomivirsen

Järgnevate aastate jooksul jõuab arvatavasti lõpule inimgenoomi projekt ning kogu DNA järjestus on avatud geenmutatsioonide põhjustatud haiguste uuringuteks. Võimalus efektiivselt kontrollida geeni ekspressiooni on olnud ravimieellaste tootjate vaateväljas juba paarkümmend aastat. Ravimieellased (*pro-drugs*) on ained, mis omavad teatud bioloogilist efekti ja mille struktuuri täiustatakse temast ravimi väljatöötamise käigus, et suurendada tema spetsiifilisust ja efektiivsust.

Üks huvitavamaid ja praeguseks ka kõige kaugemale jõudnumaid teadusharusid sel alal on *antisense*-tehnoloogia ehk *antisense*-oligonukleotiidide kasutamine.

Antisense-oligonukleotiidide kasutamise idee postuleeriti juba 1960. aastatel. 70ndatel näitasid Ts'o ja kaastöötajad (1), et keemilised modifikatsioonid natiivsetes molekulides võivad viimaseid kaitsta endo- ja eksonukleasidest lõhustava rünnaku eest. Samal ajal demonstreerisid Zamecnik ja Stephenson *antisense*-oligonukleotiidide võimet inhibeerida Rous sarkoomi viiruse replikatsiooni kana embrüo fibroplastides (2). 1980. aastatel kasvas järsult teadlaste huvi *antisense*-tehnika ja *antisense* ravimieellaste kasutamise vastu biokeemilistes uuringutes. Tõuke selleks andsid järjest suureneva hulga geenide identifitseerimine ning oligonukleotiidide sünteesimeetodite edusammud. Praeguseks on jõutud uuringutes tasemeni, kus mitmed *antisense*-oligonukleotiidid on inimkatsetuste erinevates faasides ning esimene *antisense*-ravim – Vitravene™ – on kasutusel tsütomegaloviiruse põhjustatud silma võrkkesta põletiku raviks (3).

Artikli eesmärk on tutvustada lugejatele *antisense*-tehnika põhiolemust ning kasutatavaid oligonukleotiidseid ravimieellasi.

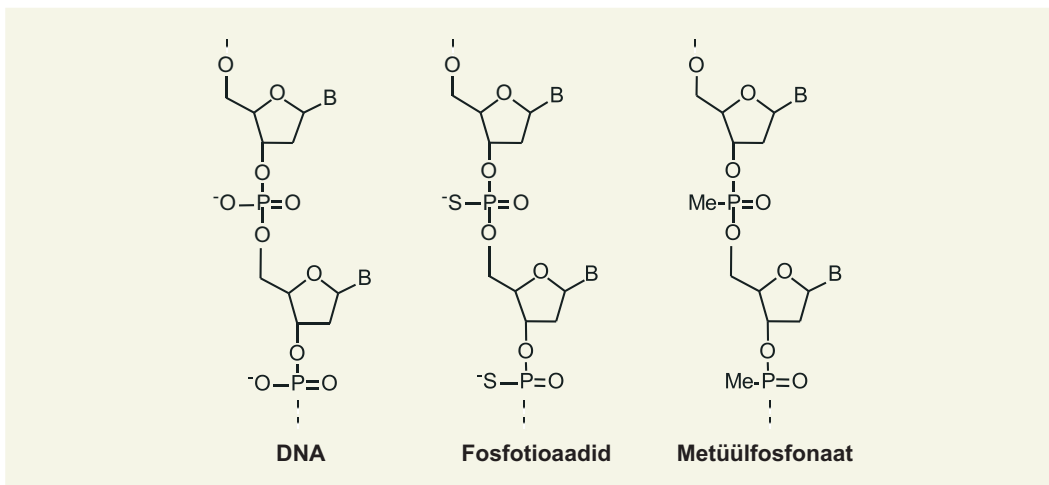
Antisense-oligonukleotiidid

Üheahelalised DNA (ssDNA) või oligoribonukleotiidid (RNA) võivad järjestus-spetsiifiliselt seonduda komplementaarsete mRNA/DNA järjestustega rakus,

kasutades Watsoni-Cricki paardumist. Tagajärjeks on selle spetsiifilise geeni ekspressiooni inhibeerimine või peatamine. **Antisense-oligonukleotiidid** on lühikesed sünteetilised DNA molekulid (või DNA-ahela derivaadid), mis on loodud tugevalt ja spetsiifiliselt seonduma neile komplementaarsete (vastavate) nukleiinhapete järjestustega märklaudkoe rakkudes. Molekuli, mis seondub DNA-ahelaga, nimetatakse antigeenseks, mRNA-ga seonduvat aga *antisense*-ühendiks.

Et neid saaks kasutada, peavad *antisense*-oligomeerid olema küllalt pika elueaga vereplasmas ja raku tsütoplasmas, vastu pidama ekso- ja endonukleasidest rünnakutele, mitte seonduma organismi teiste valkude ja nende kompleksidega ning nad ei tohiks olla toksilised. Kuna *antisense*-ravimite toimekoht asub rakutuumas või tsütoplasmas, on väga tähtis ka nende ühendite võimekus siseneda raku. Alljärgnevalt on esitatud mõni näide erineva struktuuriga *antisense*-oligomeeridest.

Esimesena kasutati *antisense*-oligomeerina üheahelalisi DNA järjestusi (vt jn 1). Nende ühendite kasutamise positiivseks küljeks oli küllalt kiire raku sisenemine endotsütoosiga. Praegu aga on nende kasutamine lõpetatud nende väga lühikese eluea tõttu vereplasmas ja rakus – nad on väga kiiresti hüdrolüüsitavad vastavate nukleasidest poolt.

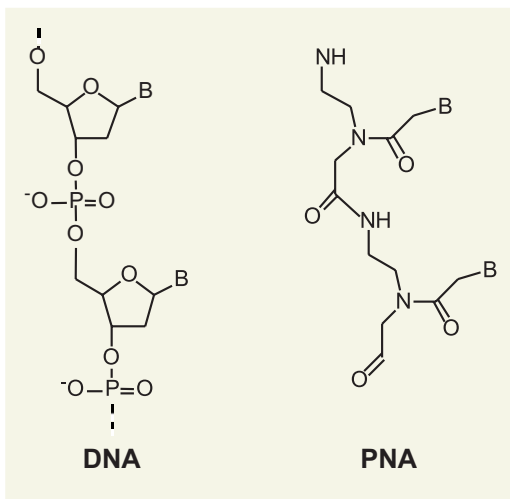


Joonis 1. Mõningate antisense-oligonukleotiidide keemilised struktuurid. B tähistab nukleiinhapete lämmastikaluseid.

Järgmise gruppi, nn I generatsiooni *antisense*-molekulide hulka, kuuluvad näiteks **fosfotioaadid ja metüülfosfonaadid** (vt jn 1) (4, 5). Nendes ühendites on fosfaatgrupi üks hapnikuaatom asendatud vastavalt kas väävliga või metüülrühmaga. Asendus mõlema ühendi peaaheas muudab nad stabiilsemaks nukleasidest lõhustava toime suhtes. Need ühendid on negatiivselt laetud, vees hästi lahustuvad, nad võetakse raku sisse endotsütoosiga ja nad on väga

afiinsed mRNA vastavate järjestuste suhtes, kuhu nad seonduvad Watsoni-Cricki sidemete abil. Fosfotioaadid on ribonukleasid H substraadiks, samal ajal kui metüülfosfonaadid seda ei ole. Negatiivseteks külgedeks selle rühma puhul võib pidada järgmisi aspekte: mõlemad ühendid seonduvad mRNA molekuliga ainult kindlas suunas, sest nad on asümmeetrilised molekulid, ja negatiivse laengu tõttu võivad nad mittespetsiifiliselt seonduda plasma valkudega. Nende ühendite spetsiifilisuse tagamiseks peaksid nad sisaldama 17–25 nukleotiidijääki. Peab kohe märkima, et kõik praeguseks ajaks kliinilistesse katsetustesse jõudnud *antisense*-oligomeerid on fosfotioaadid.

Alates 1990. aastate keskepaigast on paljud uurimisrühmad asunud modifitseerima *antisense*-molekulide ahelate teisi osi (riboosi, lämmastikaluseid) või kasutanud täiesti uusi põhiahelaid nukleiinhapetele omaste lämmastikaluste kandjana. Selliseid ühendeid nimetatakse II ja III generatsiooni *antisense*-molekulideks. Esindajatena võiks siinkohal nimetada 2'-O-metüülfosfonaate (6), peptiidseid nukleiinhappeid (PNA; vt jn 2) (7), morfoliiofosfonaate (8) jne. Kõik need muudatused on ette võetud selleks, et suurendada molekulide sugulust vastava mRNA suhtes, pikendada nende eluiga organismis ning suurendada toime spetsiifilisust. Näiteks PNA



Joonis 2. Üheaahelase DNA ja peptiidse nukleiinhappe (PNA) oligomeeride struktuuride võrdlus.

Kahjuks pole säilinud

Joonis 3. RNA processing. Antisense-oligonukleotiidide erinevad toimekohad rakus. 1. Transkriptsiooni inhibitsioon (vaadeldakse kui antigeenset efekti). 2. 5' capping'u inhibitsioon. 3. 3' poliadenüleerimise inhibitsioon. 4. Splicing'u inhibitsioon. 5. mRNA transpordi inhibitsioon. 6. RNAas H (ribonukleas H) aktivatsioon (nii tuumas kui ka tsütoplasmas). 7. Translatsiooni inhibitsioon.

oligomeerid pole nukleaside ründeobjektiks, s.t nende eluiga organismis on väga pikk, nad ei ole laetud, mistõttu nad ei seostu mittespetsiifiliselt plasma valkudega, ning nad afiinsevad mRNA suhtes kui l generatsiooni ühendid. Samuti ei ole PNA oligomeerid hiraalsed, mis annab nendele molekulidele võime seonduda mRNA järjestustega mõlemas suunas, samuti ei aktiveeri nad ribonukleas H-d. Puudusteks on aga vähene vesilahustuvus ning väga väike võime läbida raku membraani. Viimase ületamiseks kasutatakse mitmeid erinevaid PNA komplekse raku viivate vektoritega.

Eespool toodu näitab, et ideaalset *antisense*-oligomeeri pole veel loodud. Üheks kõige

peamiseks eesmärgiks paljudel teadusgruppidel on luua selline *antisense*-ravim, mis organismis tunneks efektiivselt ära ainult märklaudkoe rakke ning toimiks ainult haiguskohtes.

Antisense-tehnika kontseptsioon

Antisense-oligonukleotiidid on loodud seonduma mRNA molekuliga. Raku tuumas transkriptsioonil sünteesitud pre-mRNA teeb läbi rida muutusi, mis lõpevad funktsionaalseks tööks valmis mRNA tekkega. Seda protsessi minetatakse RNA *processing*'uks (vt jn 3). Kuna mRNA *processing* on väga keeruline mitmeetapiline protsess, avab see erinevad võimalused selle valgu ekspressiooni

mahasurumiseks (9, 10). Vaatleksime siinkohal põhilisi *antisense*-oligomeeride toimepunkte *processing*'u erinevatel tasemetel.

On näidatud, et enamik *antisense*-oligomeere aktiveerivad pärast seondumist mRNA märklaudjärjestusega ribonukleas (RNAas) H (vt jn 3; 6). See on ensüüm, mis spetsiifiliselt tunneb ära RNA-DNA kompleksi ja hüdrolyüsib selles kompleksis oleva RNA-ahela. Lõpptulemuseks on vastava valgu sünteesi (translatsiooni) peatamine. On pakutud, et selline mehhanism prevaleerib enamiku *antisense*-molekulide korral. Kuid mitte kõik *antisense*-oligomeerid, näiteks metüülfosfonaadid ja peptiidsed nukleiinhapped, ei aktiveeri ribonukleas H-d pärast seondumist mRNA molekuliga.

Teised mehhanismid valgu sünteesi pidurdamiseks on *capping*'u, (modifitseerimise) polüadenüleerimise, *splicing*'u ja translatsiooni inhibeerimine.

Transkriptsiooni ehk RNA sünteesi blokeerimine, tuntud kui antigeenne mehhanism, vajab oligonukleotiidide, mis seonduvad kaksikahelalise DNA molekuliga, moodustades tripleti (vt jn 3.1).

RNA *processing*'u algstaadiumis toimub 5'-*capping*, mille käigus metüleeritakse mitmed mRNA 5'-nukleotiidijärgid. Mitmed *antisense*-oligonukleotiidid on loodud seonduma pre-mRNA 5'-otsaga, takistades sel viisil *capping*'u osalevate valkude seondumist pre-mRNA molekuliga (vt jn 3.2). See omakorda toob kaasa pre-mRNA destabilisatsiooni ning lagunemise, enne kui mRNA jõuab ribosoomi. Vastava valgu süntees pole võimalik.

RNA *processing*'u käigus lisatakse ahela 3'-otsa nn polüadenülaatsaba. **Polüadenüleerimise** täpset tähendust ei teata, kuid on näidatud, et oligomeeridel, mis seonduvad pre-mRNA 3'-otsa, on *antisense*-efekt (vt jn 3.3). See efekt võib samuti olla seotud pre-mRNA destabilisatsiooniga.

Üheks kõige keerukamaks etapiks pre-mRNA *processing*'u on mittekodeerivate alade, intronite, väljalõikamine ning kodeerivate alade, eksonite, ühendamine. Seda nimetatakse *splicing*'uks

(vt jn 3.4). Mitmed uurimisrühmad on edukalt kasutanud 2'-O-metüülfosforotioaate maskeerimaks intronite ja eksonite vahelisi lõikekohti. Intronite säilimine toob endaga kaasa ebakorrekse mRNA sünteesi ning vastava valgu ekspressiooni peatamise.

Translatsiooni (valgu sünteesi) blokeerimisel takistab *antisense*-oligonukleotiid ribosoomi seondumist ja edasilikumist piki mRNA-ahelat (vt jn 3.7). Tavaliselt sünteesitakse *antisense*-oligonukleotiid nii, et ta oleks komplementaarne translatsiooni startkoodonit ümbritseva järjestusega. Sellist mehhanismi on laialdaselt kasutatud retseptorite, proteiini kinaaside, kalmoduliini jt valkude sünteesi blokeerimiseks.

Eespool kirjeldatu näitab, et *antisense*-oligonukleotiidid blokeerivad valgu sünteesi erinevatel tasemetel, kasutades selleks erinevaid mehhanisme. Kaasajal on teadlaste eesmärgiks parandada *antisense*-oligomeeride spetsiifilisust ja leida kõige efektiivsemad järjestused saavutamaks maksimaalset vastava valgu sünteesi inhibitsiooni.

Antisense-oligonukleotiidid kui ravimid ja ravimikandidaadid

Mitmed *antisense*-oligomeerid on pärast edukaid laborikatsetusi jõudnud kliiniliste uuringute faasi (vt tabel 1). 1998. aasta augustis kinnitati esimese ravimina Vitravene™ (Fomivirsen, ISIS 2922) (11, 12). Selle loojaks oli Ameerika Ühendriikides asuv kompanii Isis/Ciba Vision. Vitravene™-i aktiivseks komponendiks on fosforotioaat nimetusega **fomivirsen**, mis inhibeerib inimese tsütomegaloviiruse replikatsiooni. Vitravene™ on ette nähtud tsütomegaloviiruse põhjustatud võrkkestapõletiku lokaalseks raviks AIDS-i patsientidel. Vitravene™ manustatakse klaaskehasse süstimisega. Äsja diagnoositud haigele manustatakse 165 mg silma kohta iga kahe nädala järel. Eelnevalt ravitud haiguse korral aga algselt 330 mg silma kohta kahel järgneval nädalal ning seejärel sama doos üks kord igal neljandal nädalal. Ravi ei soovitata üle 60aastastele patsientidele (13).

Tabel 1. Antisense-oligonukleotiidid, mis on juba ravimiturul või kliinilistes uuringute järgus

Ühendi nimetus	Valguline märklaud	Haigus	Kompanii	Uuringu faas
VitraveneÖ (Fomivirsen)	CMV IE2	CMV retiniit	Isis/Ciba Vision	Kinnitatud (turul)
ISIS3521	Proteiini kinaas C α	kopsuvähk	Isis	III faas
ISIS2302	ICAM-1	psoriaas Crohni töbi	Isis	II faas
ISIS5132	RAF kinaas	vähk	Isis	II faas
G3139	Bcl-2	vähk	Genta	II faas
GEM132	CMV UL36	CMV retiniit	Hybridon	I faas
ISIS2503	Ha-ras	rinnavähk kõhunäärmevähk kopsuvähk	Isis	II faas
GEM92	HIV	AIDS	Hybridon	I faas
GEM230	Proteiini kinaas A	vähk	Hybridon	I faas

Teised *antisense*-ravimid on praegu veel kliiniliste katsetuste staadiumis. ISIS2302 Topical (alicaforseen) on andnud häid tulemusi psoriaasi ja Crohni töve II faasi kliinilistes katsetustes. Samuti kui ka VitraveneTMi puhul on ISIS2302 toimeaineks fosforotiooaaadi oligonukleotiidid. ISIS2302 on loodud inhibeerima rakkudevahelise adhesioonimolekul-1 ekspressiooni. See valk on vajalik leukotsüütide adhesioonil ja emigreerumisel ning immuunrakkude ja põletikurakkude aktivatsioonil. Kliiniliste uuringute I faasis ISIS2302 intravenoosel manustamisel 500 patsiendile ei ilmnunud mingeid toksilisi nähtusid. Seejärel uuringute II faasis lisati toimeainet kreemile, mille kasutamisel psoriaasi põdevatel patsientidel vähenes naastude kõvastumus ja paksenemine 31%. Nende tulemuste põhjal planeerib ISIS kompanii alustada III faasi kliinilisi uuringuid 2002. aasta teisel poolel (13).

ISIS3521 (LY900003) on fosforotioaatne proteiini kinaas C α selektiivne inhibiitor. Proteiini kinaas C α -I on oluline roll vähi patogeneesis. ISIS3521 on kliiniliste uuringute III faasis, kus teda kasutatakse eelnevalt ravimata mitte-väikerakulise kopsuvähi raviks (13).

ISIS2503 on afiinne selektiivne Ha-*ras* geeniekspressiooni inhibiitor. Paljud uurimisrühmad on näidanud, et *ras* geeni valgud osalevad vähi patogeneesis. Kliinilise katsetuse II faasis uuritakse ISIS2503 mõju metastaatilise rinna-, kõhunäärme- ja kopsuvähi raviks kombinatsioonis kemo-teraapiaga (13).

Kokkuvõtteks, *antisense*-oligomeerid on väga spetsiifilised ühendid blokeerimaks valkude sünteesi translatsiooni tasemel. Selline vastava valgu või valkude sünteesi blokeerimine võimaldab väga efektiivselt tõkestada vastava haiguse patogeneesi. Palju probleeme tuleb veel ka lahendada. Üks suurem neist on *antisense*-ravimite manustamine. Kõik praegu katsetustel olevad *antisense*-ravimid manustatakse kas süstimise teel või kreemidena, oraalset manustamist takistab praegu veel nende ravimite suhteline ebastabiilsus ning kehva imendumine seedetraktist. See näitab, et igapäevasteks ravimiteks pürgimisel on perspektiivsetel *antisense*-ühenditel siiski veel küllaltki pikk areng ees.

Kirjandus

1. Miller PS, Braiterman LT, Ts'o PO. Effects of a trinucleotide ethyl phosphotriester, Gmp(Et)Gmp(Et)U, on mammalian cells in culture. *Biochemistry* 1977;3:1988-96.
2. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:280-4.
3. Crooke ST. Vitravene™ – another piece in the mosaic. *Antisense & Nucleic Acid. Drug Dev* 1998;8:*in iii*.
4. Agrawal S, Kandimalla ER. Antisense therapeutics: is it as simple as complementary base recognition? *Mol Med Today* 2000;6:72-81.
5. Micklefield J. Backbone modification of nucleic acids: synthesis, structure and therapeutic applications. *Curr Med Chem* 2001;8:1157-79.
6. Boulme F, Freund F, Moreau S, Nielsen PE, Gryaznov S, Toulme JJ, et al. Modified (PNA, 2'-O-methyl and phosphoramidate) anti-TAR antisense oligonucleotides as strong and specific inhibitors of in vitro HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acid Res* 1998;26:5492-500.
7. Egholm M, Buchart O, Nielsen PE, Berg RH. Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone. *J Am Chem Soc* 1992;114:1895-7.
8. Summerton J, Stein D, Huang SB, Matthews P, Weller D, Partridge M. Morpholino and phosphorothioate antisense oligomers compared in cell-free and in-cell systems. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997;7:63-70.
9. Hnatowich DJ. Antisense and nuclear medicine. *J Nucl Med* 1999;40:693-703.
10. Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta* 1999;1489:31-44.
11. Azad RF, Brown-Driver V, Buckheit Jr RW, Anderson KP. Antiviral activity of a phosphorothioate oligonucleotide complementary to human cytomegalovirus RNA when used in combination with antiviral nucleoside analogs. *Antiviral Res* 1995;28:101-11.
12. Scholz M, Doerr HW, Cinatl J. Inhibition of cytomegalovirus immediate early gene expression: a therapeutic option? *Antiviral Res* 2001;49:129-45.
13. Kättesaadav :<http://www.isip.com/products>

Summary

Molecular technologies at the service of practical medicine. Antisense technique

The ability to disrupt gene expression has become an important approach in the study of biological functions at the gene level. The down-regulation of the expression of a specific protein has also met therapeutic use. The field of the development of antisense oligonucleotide drugs has made remarkable advances over the past 20 years. Antisense oligonucleotides are designed to block protein expression by interfering with mRNA or

pre-mRNA. Complementary binding of antisense oligonucleotides to mRNA modulates its splicing, polyadenylation, translation or degradation. In this review we describe the properties of different generations of antisense reagents, their mechanism of action and advances in clinical trials.

ursel@med.ut.ee