

Zdravljenje s protismernimi oligonukleotidi

Janja Polanec

V zadnjih desetih letih se je v predklinični onkologiji pojavila nova oblika genskega zdravljenja - zdravljenje s protismernimi ('antisense') oligonukleotidi. Pri njem se uporabljajo kratka zaporedja deoksi nukleotidov (do 20 baz), ki so sintetizirana v obratni smeri (v 'antisense' orientaciji) od osnovnega zaporedja nukleotidov v genu, katerega delovanje želimo spremeniti. Zaradi komplementarnosti baz se protismerni oligonukleotid veže z informacijsko RNA (mRNA) gena. Posledica je oslABLJENO ali zavrtO izražanje gena (1).

MEHANIZMI DELOVANJA PROTISMERNIH OLIGONUKLEOTIDOV

Teoretično je mogoče s protismernimi oligonukleotidi zavirati vsako stopnjo izražanja gena. Zaviramo lahko prepisovanje RNA, izrezovanje intronov, poliadenilacijo, začetek sinteze proteinov, podaljševanje verige proteinov itd.

Natančen vrstni red dogodkov v celici po vezavi komplementarnih sintetičnih oligonukleotidov na celično DNA ali RNA ni povsem znan. Najpogosteje sproži vezava oligonukleotida aktivacijo celičnih razgradnih encimov - RNAz, ki kompleks oligonukleotid-RNA razgradijo. Nasprotno pa se nekateri kemično spremenjeni (alkilirajoči) oligonukleotidi kovalentno vežejo na dvojnovijačno DNA in preprečijo prepisovanje RNA, poleg tega pa so EDTA derivati oligonukleotidov sposobni direktno razgrajevati DNA tarčnega gena (2).

UČINKOVITOST ZDRAVLJENJA

Na učinkovitost zdravljenja z oligonukleotidi vplivajo številni faktorji. Najpomembnejša sta:

- učinkovitost vnosnega sistema in
- specifičnost vezave oligonukleotidov.

Vsi oligonukleotidi se na tarčni gen ne vežejo enako dobro, zato med več oligonukleotidi izberemo najbolj učinkovitega. Tako moramo izbrati najbolj učinkovito metodo vnosa (transfekcijo) oligonukleotidov v celice, pri čemer imamo danes za to na voljo številne komercialne metode in nosilce. Poleg navedenih dejavnikov pa na učinkovitost zdravljenja vpliva tudi občutljivost tkiva in celic na vnos oligonukleotidov, dolžina oligonukleotida ter zaporedje baz v oligonukleotidu. Znižanje izražanja gena v *in vitro* poskusih dokazujemo s tehnikami molekularne biologije, pri poskusih *in vivo* pa zasledujemo biološke učinke.

UPORABA V HEMATOLOGIJI

V hematologiji se protismerni oligonukleotidi poskusno uporabljajo pri zdravljenju levkemij in motenj v koagulaciji. Pri kronični mielocitni levkemiji (KML) je tarčni gen *bcr/abl*, na kromosomu Philadelphia. S kombinirano uporabo kemoterapije in protismernih oligonukleotidov proti *bcr/abl* pri miši je bilo *ex vivo* čiščenje malignih celic iz kostnega mozga tudi do sto odstotkov učinkovito (3). Razen *bcr/abl* so potencialni tarčni geni za tovrstno zdravljenje v CML tudi protoonkogeni *c-myb*, *c-myc* ter Kit receptor (2).

Zelo obetavne rezultate *in vitro* so pokazali tudi poskusi z analogi oligonukleotidov - peptidnimi nukleinskimi kislinami (PNA), ki delujejo tako, da zavirajo začetek sinteze proteinov. Gambacorti s sodelavci je uspel tako dokazati visoko učinkovitost PNA oligonukleotidov proti genu receptorja retinoične kisline pri promielocitni levkemiji (2).

Od kliničnih študij je vredno omeniti rezultate Agarwala, de Fabritiisa in Webba s sodelavci.

Agarwal je pri bolnikih s KML izvedel čiščenje kostnega mozga s specifičnimi oligonukleotidi, bolniki pa so sočasno dobivali tudi busulfan in citoksan. Avtologni presadek se je prijel pri sedmih od osmih bolnikov, pet bolnikov pa je imelo močno in trajno izboljšano krvno sliko z normalizacijo števila celic še tri mesece po posegu (4).

Tudi de Fabritiis je bolnika v napredovali fazi KML zdravil z avtologno transplantacijo kostnega mozga, ki ga je prečistil na maligne celice z oligonukleotidi, specifičnimi za B₂A₂ stičišče. Število CD34⁺ celic, ki so najštevilnejše v akutni fazi levkemije, se je po terapiji zmanjšalo za 41 odstotkov. Bolnik je bil v popolni hematološki remisiji še devet mesecev po posegu (5).

Pred kratkim pa je Webb s sodelavci objavil rezultate zdravljenja devetih bolnikov z ne-Hodgkinovim limfomom z oligonukleotidi proti *bcl-2* genu. Protismerne oligonukleotide so bolniki dobivali s subkutano infuzijo vsak dan dva tedna. Po zaključenem zdravljenju so pri bolnikih zabeležili statistično signifikantno zmanjšanje tumorske mase ter znižano število cirkulirajočih limfomskih celic v krvi (6).

Zato ni presenetljivo, da je nedavno v ZDA prišlo na tržišče prvo zdravilo (Vitravene), ki deluje na osnovi protismerne tehnologije in ga je odobrila FDA (Food and Drug Administration). Razen tega pa poteka danes vsaj enajst kliničnih študij zdravljenja s protismernimi oligonukleotidi, ki vplivajo na izražanje genov in encimov, ki sodelujejo v

kancerogenezi: *bcl-2*, *c-myc*, *Ha-ras*, protein kinaza C alfa, C-raf kinaza, protein kinaza A, DNA metil transferaza virusa HIV-a itd. (tabela 1).

Tabela 1. Protismerni oligonukleotidi, ki se uporabljajo v kliničnih študijah za zdravljenje raka in nekaterih drugih bolezni

zdravilo	tarčni gen	bolezen	faza uvajanja terapije
Vitravene	CMV IE 2	CMV retinitis	I
ISIS 2302	ICAM-1	Crohnova bolezen	III
ISIS 3521	protein kinaza C α	rak	II
ISIS 5132	C-raf kinaza	rak	II
G 3139	Bcl-2	maligni limfom	II
ISIS 2503	Ha-ras	karcinom kolona	II
GEM 92	HIV	AIDS	I
GEM 230	protein kinaza A	rak	I
MG 98	DNA metil transferaza	rak	I

Čeprav je znana že več kot deset let, tehnologija protismernih oligonukleotidov še ni splošno uveljavljena genetska metoda, niti ni standardna metoda pri razvoju zdravil. Ker so v zadnjem času zaviranje izražanja onkogenov s pomočjo te tehnologije dokazali v številnih poskusih na celičnih kulturah, na živalskem modelu in pri zdravljenju človeka, pa lahko v prihodnosti pričakujemo, da bo postala splošno uporabna laboratorijska ter klinična metoda.

Literatura:

1. Baker BF, Monia BP. Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489:3-18.
2. Gambacorti-Passerini C, Mologni L, Bertazzoli C, le Coutre P, Marchesi E, Grignani F, Nielsen PE. In vitro transcription and translation inhibition by anti-promyelocytic leukemia (PML)/retinoic acid receptor alpha and anti-PML peptide nucleic acid. *Blood* 1996; 88:1411-7.
3. Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Barletta C, Malaguarnera L, Szczylzik C, Chen ST, Lange B, Calabretta B. Highly efficient elimination of Philadelphia leukemic cells by exposure to bcr/abl antisense oligodeoxynucleotides combined with mafosfamide. *J Clin Invest* 1993; 92:194-202.
4. Agarwal N, Gewirtz AM. Oligonucleotide therapeutics for hematologic disorders. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489:85-96.
5. de Fabritiis P, Petti MC, Montetusco E, De Propris MS, Sala R, Bellucci R, Mancini M, Lisci A, Bonetto F, Geiser T, Calabretta B, Mandelli F. BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotide in vitro purging and autologous bone marrow transplantation for patients with chronic myelogenous leukemia in advanced phase. *Blood* 1998; 91:3156-62.
6. Webb A, Cunningham D, Cotter F, Clarke PA, di Stefano F, Ross P, Corbo M, Dziewanowska Z. Bcl-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 1997; 349:1137-41.