



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Předmět: Biofarmaceutika

Kurz: Bioléčiva – biofarmaceutika

4. rok studia

# Trocha genové terapie: Antisense oligonukleotidy

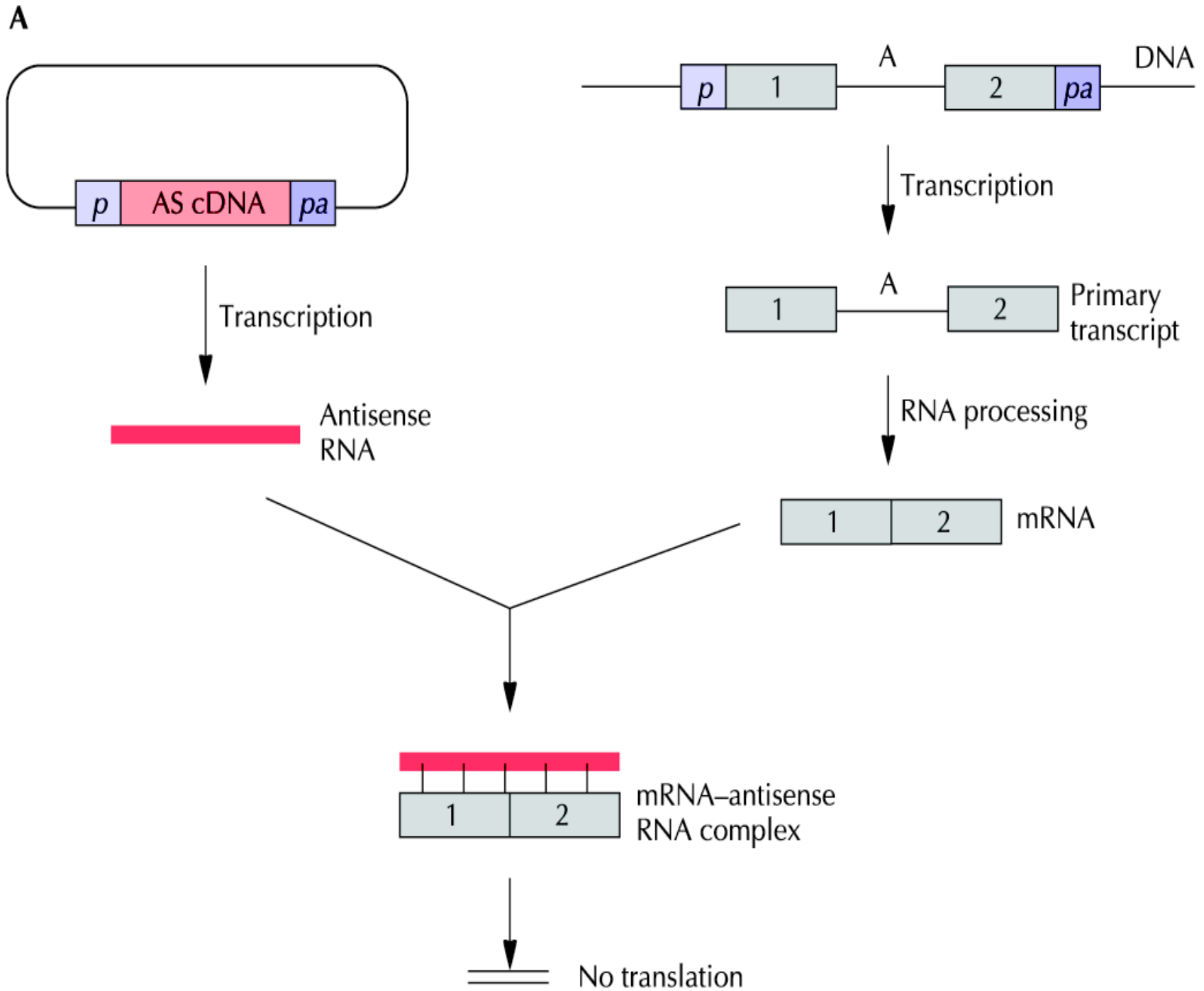
doc. PharmDr. Oldřich Farsa, Ph.D.

# Antisense RNA

(„antisense“ = „proti smyslu“ ve významu „technickém“, tj. doplňkový, komplementární)

- Expresní (=exprese schopný) vektor (nosič) produkuje transkript, jenž je komplementární ke známému – cílovému transkriptu
- Expresní vektor je zaveden do hostitelské buňky transfekcí a blokuje translaci cílové mRNA

# Antisense RNA



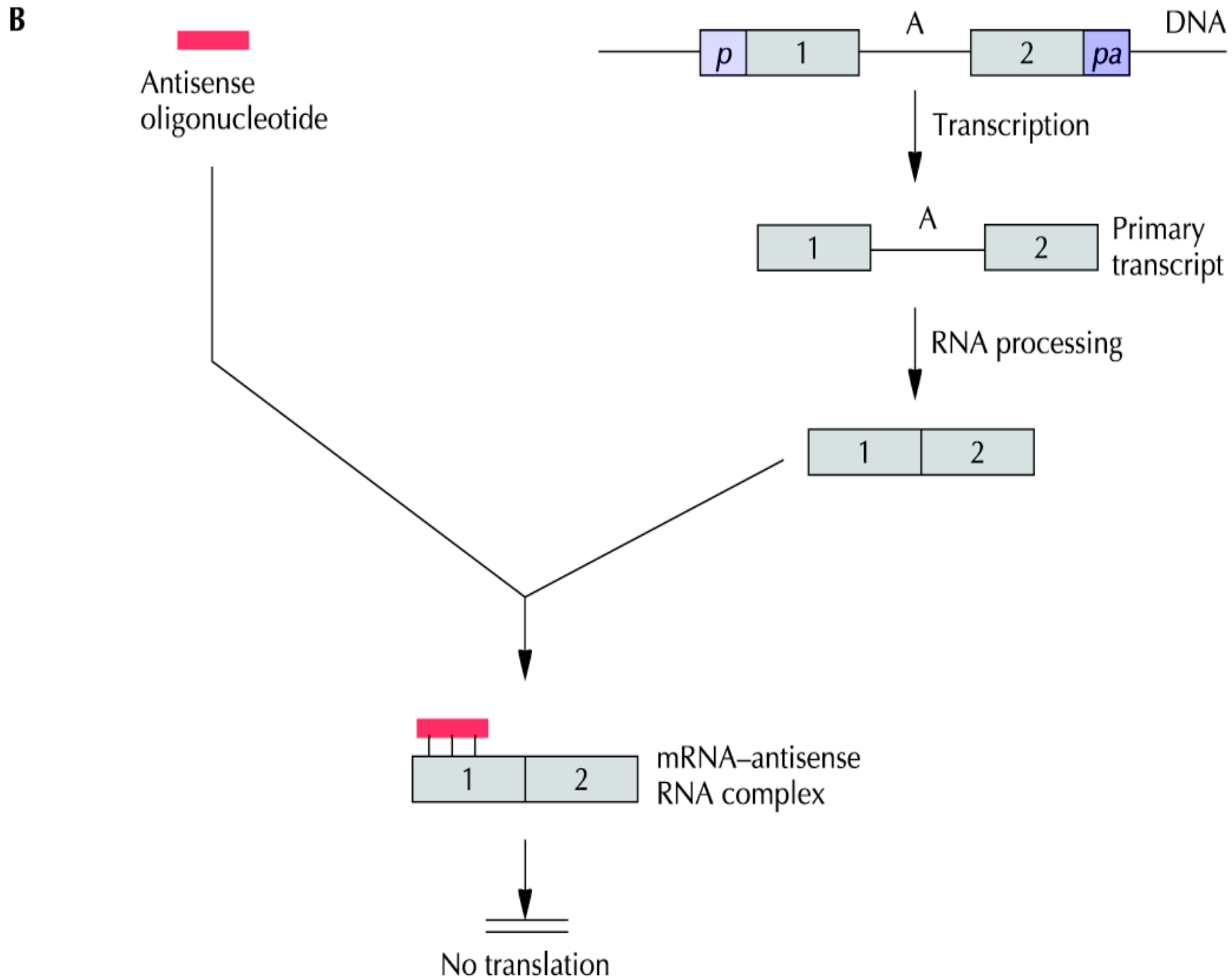
## Terapeutická Antisense RNA

- Insulin-like growth factor 1 = inzulinu podobný růstový faktor 1
  - vyskytuje se v maligním gliomu (častý typ nádoru mozku) stejně jako v karcinomu prostaty
- Byla provedena transfekce buněk nádoru prostaty potkanů antisense cDNA (jednořetězcovou komplementární DNA)
- Transfektované bb. byly vstříknuty myším
  - u takto „ošetřených“ myší se nádory neobjevily, nebo byly podstatně menší ve srovnání s kontrolní skupinou, které byly injikovány neupravené potkaní nádorové buňky

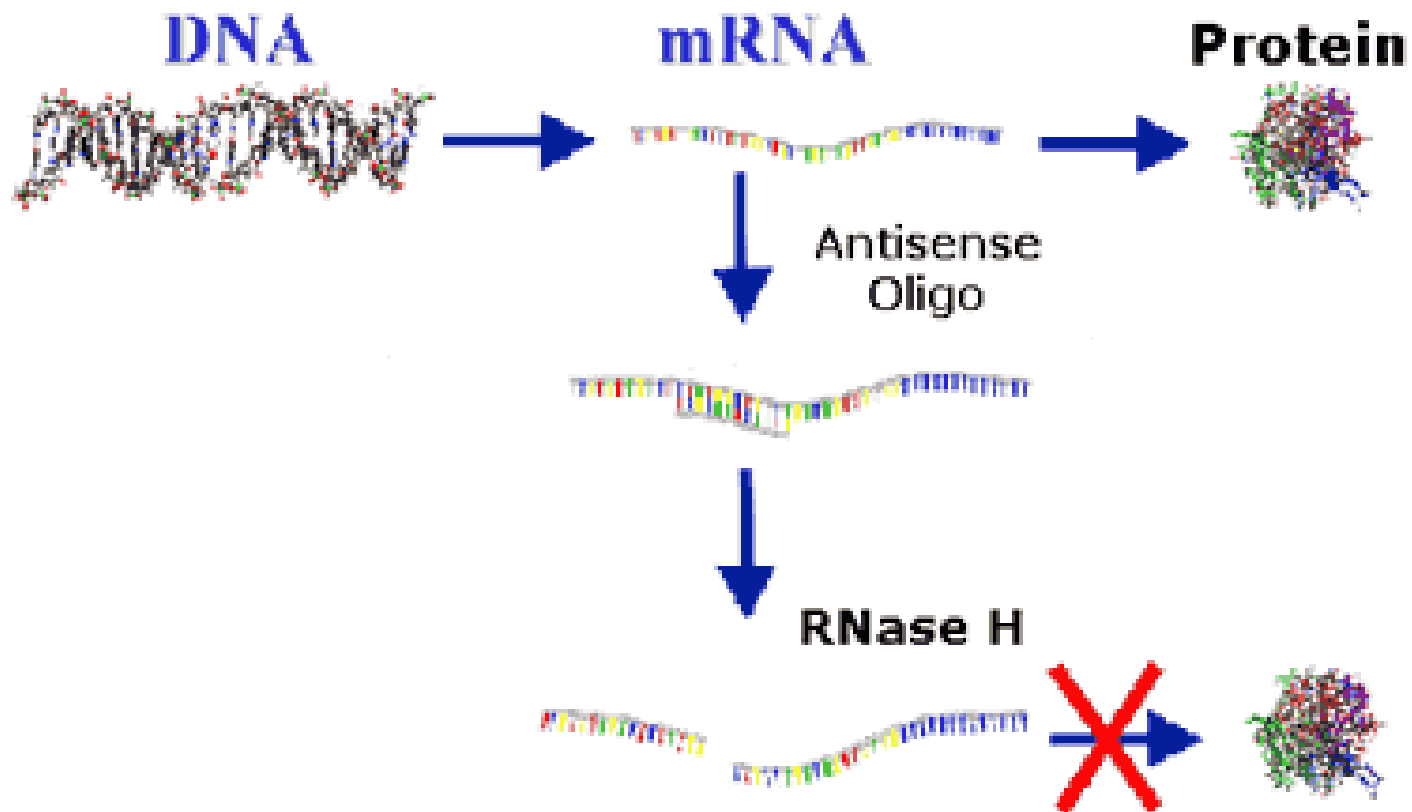
## Proč vlastně antisense oligonukleotidy?

- Velká antisense RNA podléhá poměrně rychlé degradaci
  - Humánní buňky mají specifické nukleasy pro likvidaci dvojřetězcové RNA („double stranded“ = dsRNA)
- DNA oligonukleotidy jsou podstatně stálejší a snáze se dostávají do cílových buněk
- Připravují se orientované na (tj. komplementární vůči) 5' nebo 3' koncům molekul mRNA nebo rozhraním intron-exon, přirozeným dvojřetězcovým oblastem

# Antisense oligonukleotidy - „mechanismus účinku“



# Antisense oligonukleotidy - „mechanismus účinku“



Jak se pomocí antisense oligonukleotidů mohou tvořit trojité řetězce?

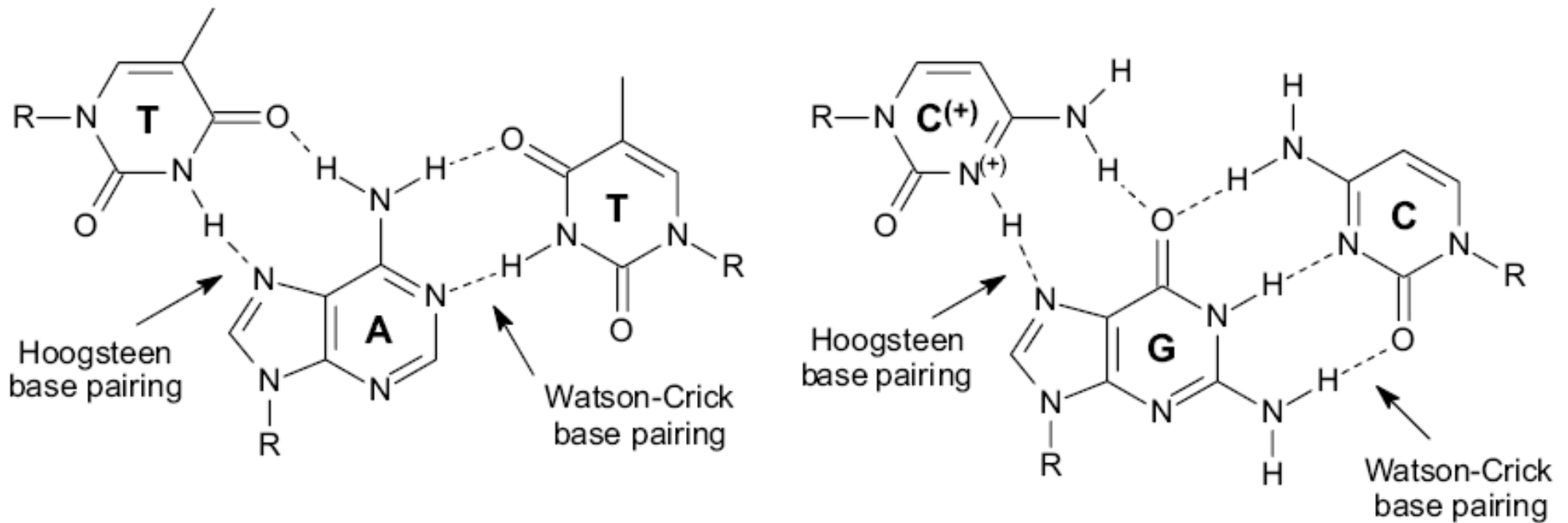


Fig. 6.11 Watson-Crick and Hoogsteen base pairing.



# Jak se pomocí antisense oligonukleotidů mohou tvořit trojité řetězce?

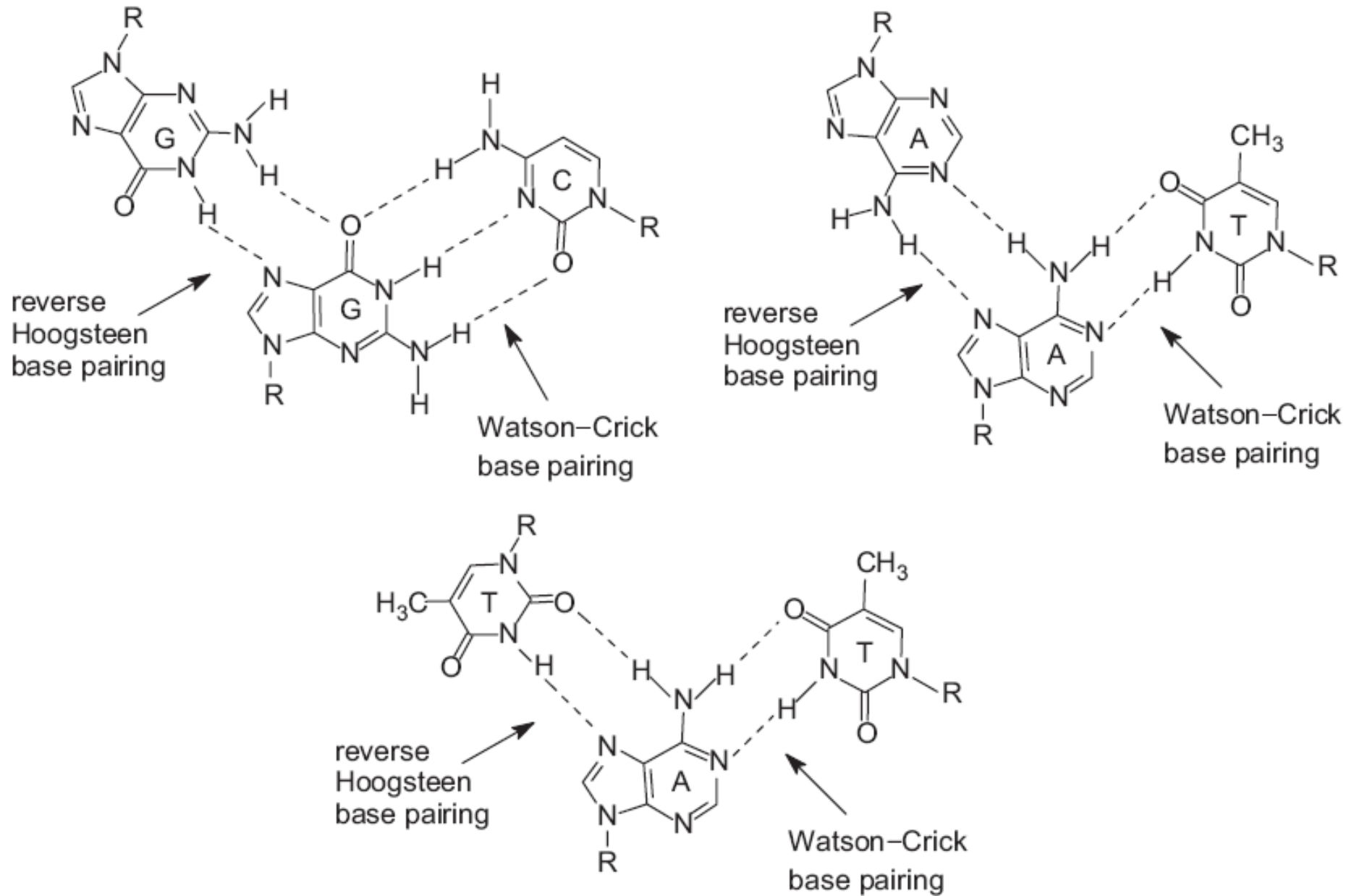
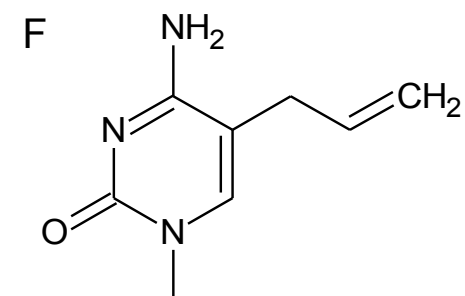
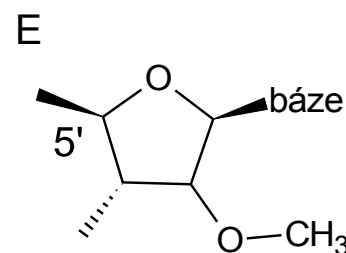
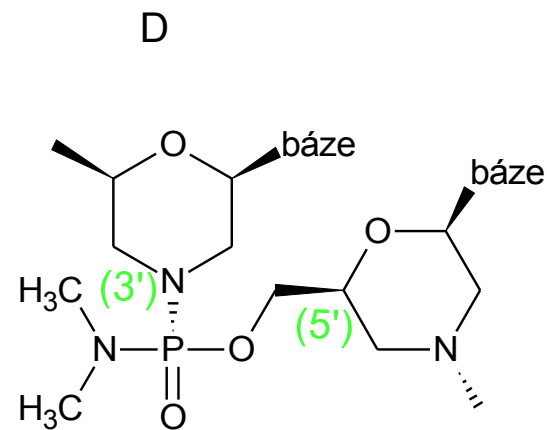
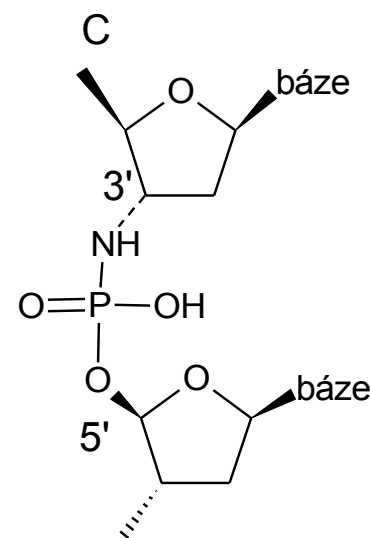
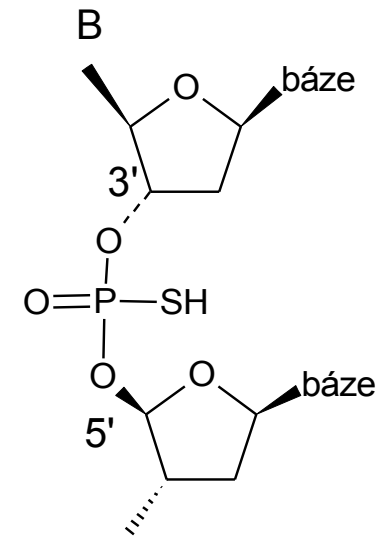
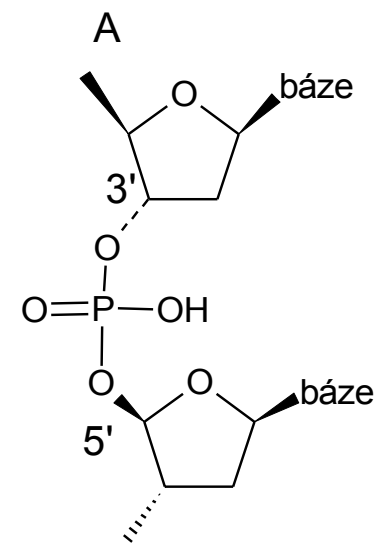


Fig. 6.12 Possible triple helix motifs.

# Strukturní optimalizace antisense oligonukleotidů

- „Přirozené“ oligonukleotidy (**A**) jsou citlivé k buněčným nukleasám
- Strukturální obměny zvyšují rezistenci vůči těmto enzymům
- Izosterní záměna jednoho z atomů kyslíku ve fosfodiesterové vazbě za síru vede k podstatně stabilnějším látkám (**B** - fosforthioátové analogy)
- Morfolinové analogy (**D**) – izosterní záměna „ribosy za morfolin“. Neionogenní, neměly by se nespecificky vázat na kladně nabitě proteiny.
- 2'-substituce (např. methylace – **E**) podstatně zvyšuje stabilitu vůči nukleasám; tyto analogy neaktivují RNasu H, ale inhibují transkripci sterickou blokádou



# Thiofosfátové (fosforthioátové) antisense oligonukleotidy

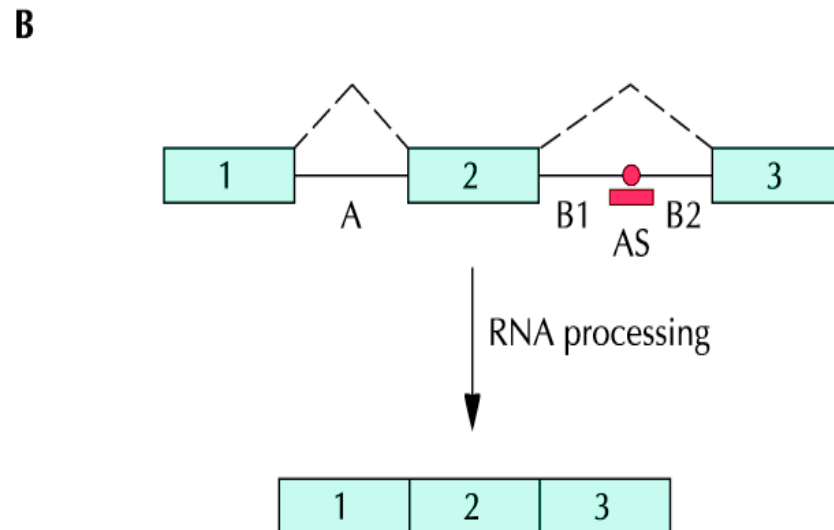
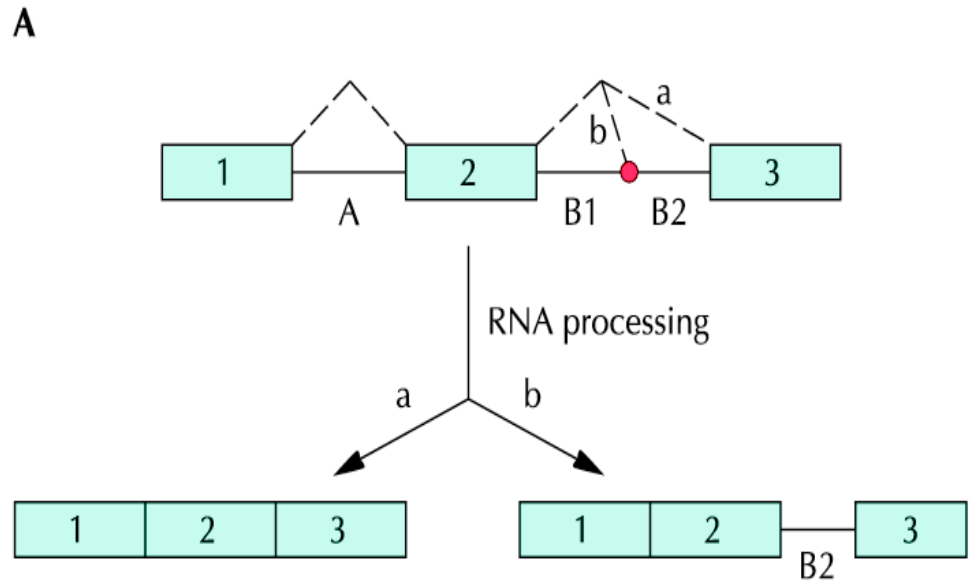
- Rozpustné ve vodě (zejména jako polysodné soli)
- Komplex s cílovou mRNA aktivuje RNasu H

RNasa H: EC 3.1.26.4 je nespecifická endonukleasa – ribonukleasa, která normálně hydrolyticky štěpí vazbu 3'-O-P vazbu RNA v DNA/RNA komplexu (duplexu) za vzniku produktů zakončených 3'-OH a 5'-O(PO<sub>2</sub>)OH

- První generace oligonukleotidových léčiv prošla klinickým zkoušením, částečně (byla nebo zůstala) v praxi
- např. fomivirsen proti cytomegalovirové infekci oční sítnice pacientů s AIDS
- Snížená schopnost vazby na mRNA, zvýšená nespecifická vazba na proteiny ve srovnání s nativními oligonukleotidy (polyanionty – váží se na tytéž proteiny jako jiné polyanionty, např. hepariny)

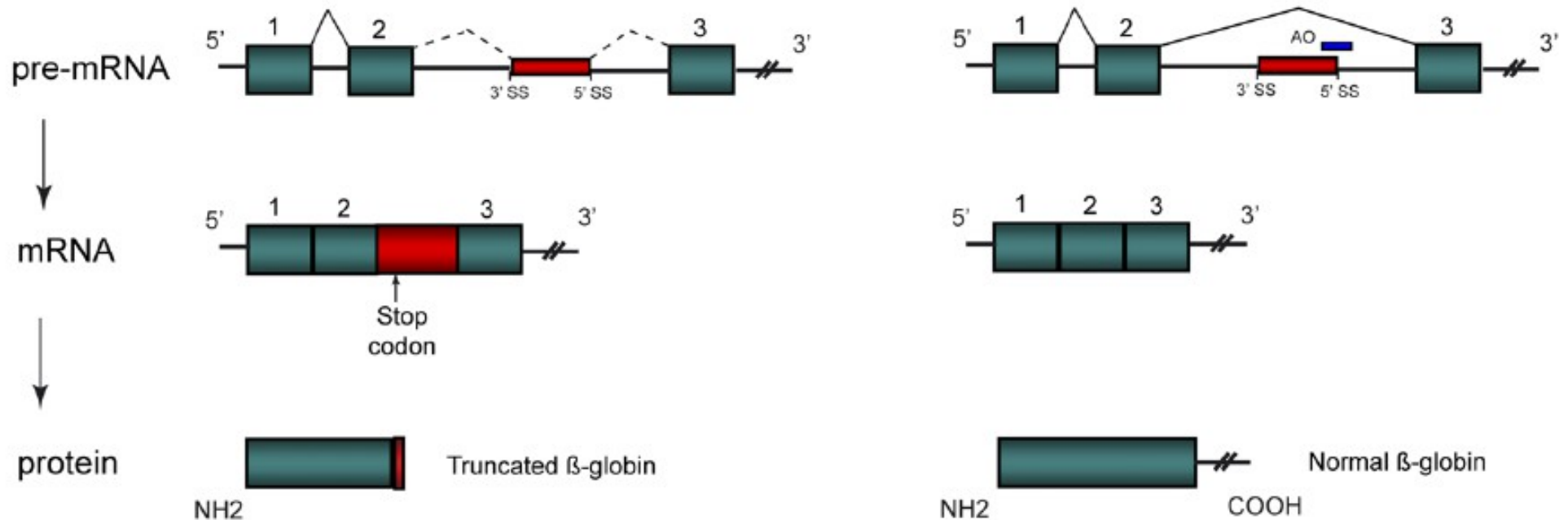
# Příklad použití nemodifikovaných antisense oligonukleotidů: oprava vadného splicingu - „sestřihu“ řetězců mRNA po transkripci

- $\beta$ -thalasémie: Mutace v řetězcích  $\beta$ -globinu hemoglobinu vedou ke snížené schopnosti vázat  $O_2$  (anémie)
- Vazba oligonukleotidů 5'-GCUAUUACCUUAACCCAG a 3'-CAUUAUUGCCCUGAAAG cílených na poškozené 5'-místo sestřihu a „kryptické“ 3'-místo sestřihu brání nesprávnému splicingu



$\beta$ -thalasémie: „kryptická“ porucha splicingu a její odstranění antisense oligonukleotidem

A Blockage of cryptic splicing



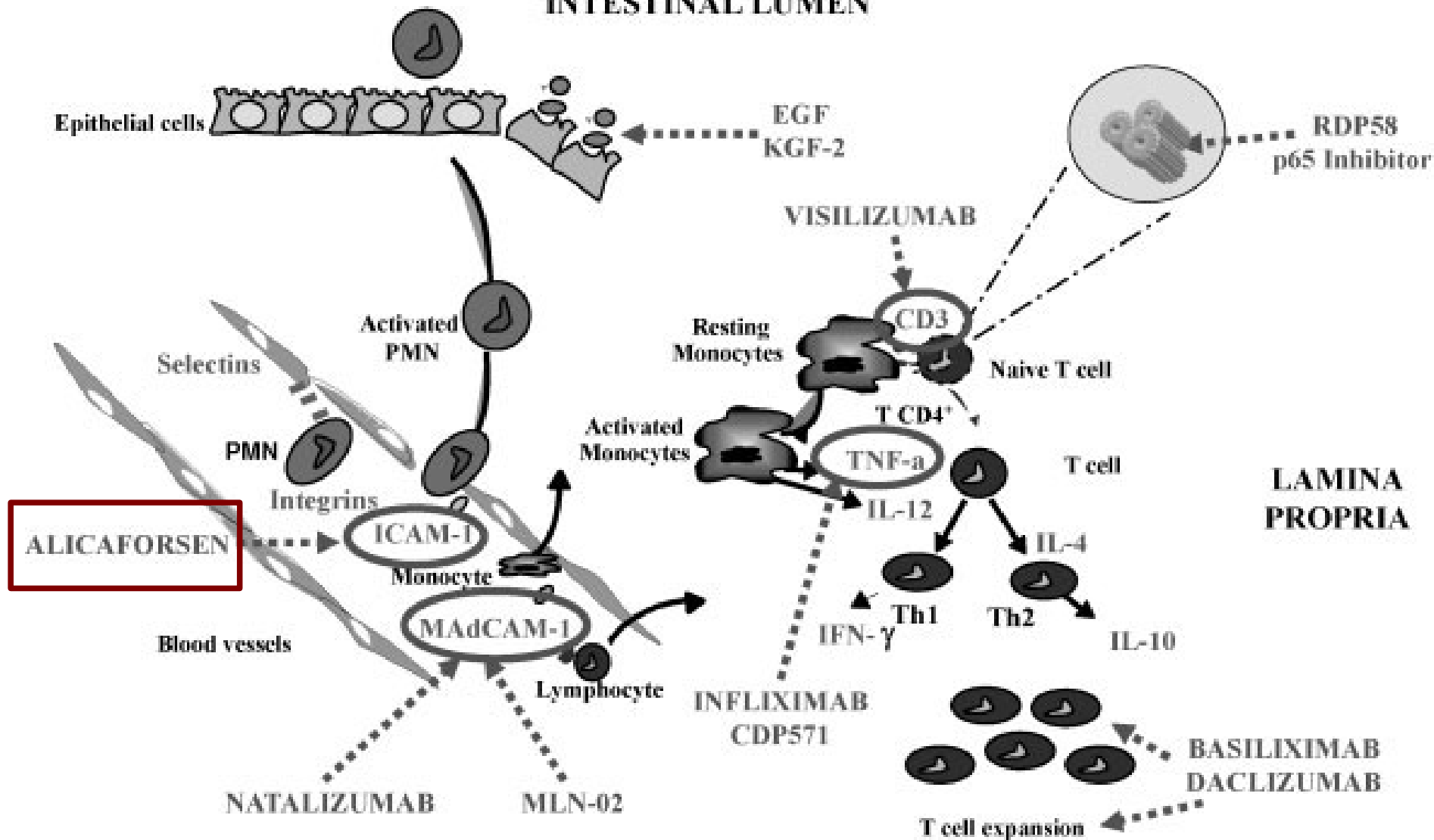
Příklady použití modifikovaných antisense oligonukleotidů:

### Inhibitory intercelulární adhezní molekuly (ICAM)

Ulcerativní kolitida = chronické relapsující zánětlivé onemocnění mukosní vrstvy střeva (patří mezi IBD)

- idiopatická = etiologie neznámá
- převládá přesvědčení, že patogeneze je multifaktoriální a zahrnuje genetické, environmentální a imunologické faktory
- chronický zánět se projevuje zejména díky dysregulaci adaptivního imunitního systému, která vede ke změně tolerance ke střevním bakteriím a k anomální odpovědi na normální lumenální mikroflóru  
⇒ imunologická nerovnováha ⇒ ↑ produkce zánětlivých cytokinů a **adhesních molekul** (např. ICAM), ↑ aktivace polymorfonukleárních monocytů (PMN); jejich migrace do střeva a interakce s epitelem ovlivňuje funkci epitelu od bariérové až po hospodaření s elektrolyty

# INTESTINAL LUMEN



Mechanismus vzniku ulcerativní kolitidy, biomolekuly v něm zapojené a místa účinku (terapeutické cíle) vybraných bioléciv

**ICAM-1 intercelulární adhezní molecula 1**

MadCAM mukózní adrezná adhezní molekula

IFN interferon

IL interleukin

EGF epidermální růstový faktor

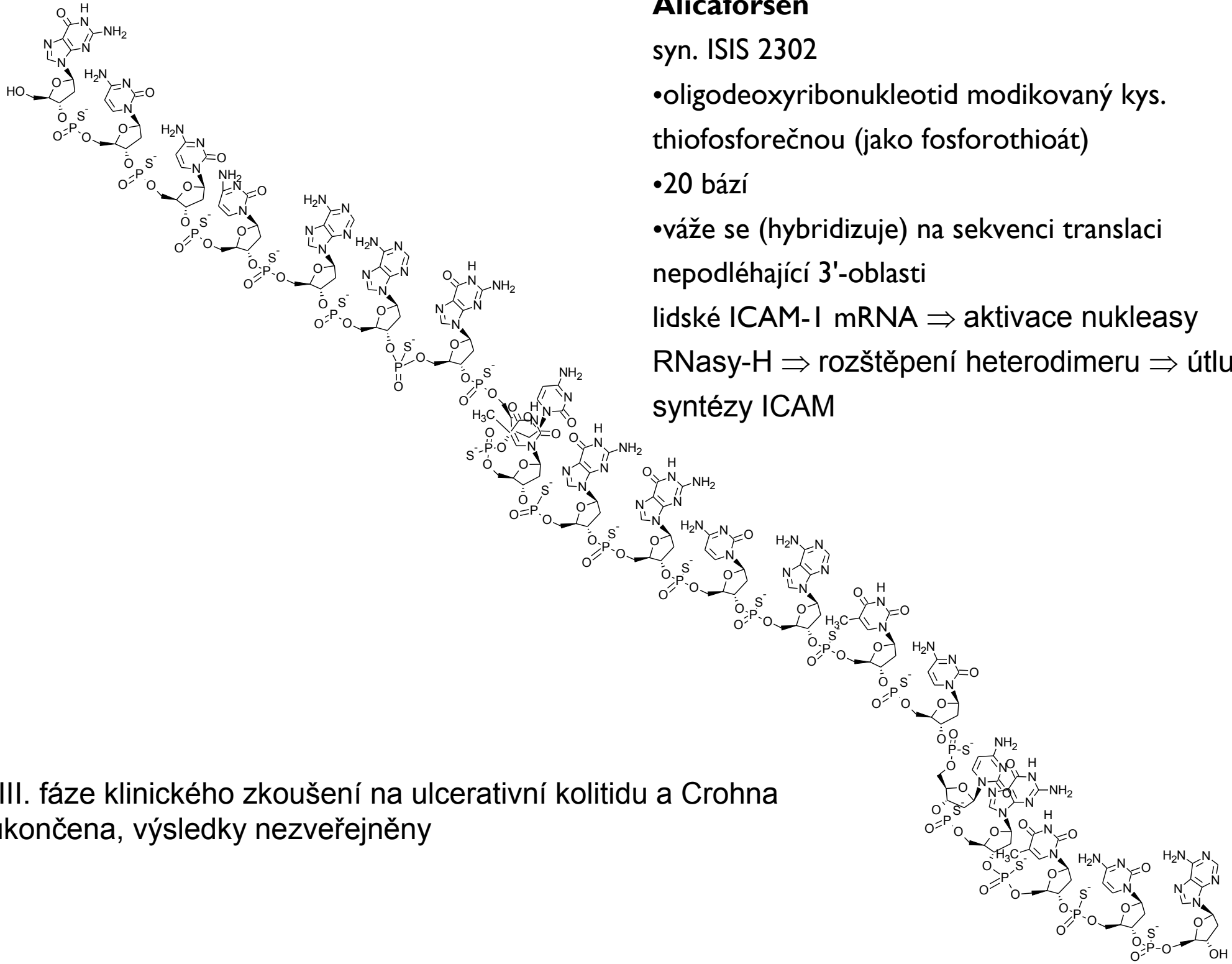
PMN – polymorfonukleární monocyty

# Alicaforsen

syn. ISIS 2302

- oligodeoxyribonukleotid modifikovaný kys. thiofosforečnou (jako fosforothioát)
- 20 bází
- váže se (hybridizuje) na sekvenci translaci nepodléhající 3'-oblasti lidské ICAM-1 mRNA  $\Rightarrow$  aktivace nukleasy RNasy-H  $\Rightarrow$  rozštěpení heterodimeru  $\Rightarrow$  útlum syntézy ICAM

• III. fáze klinického zkušnění na ulcerativní kolitidu a Crohna ukončena, výsledky nezveřejněny

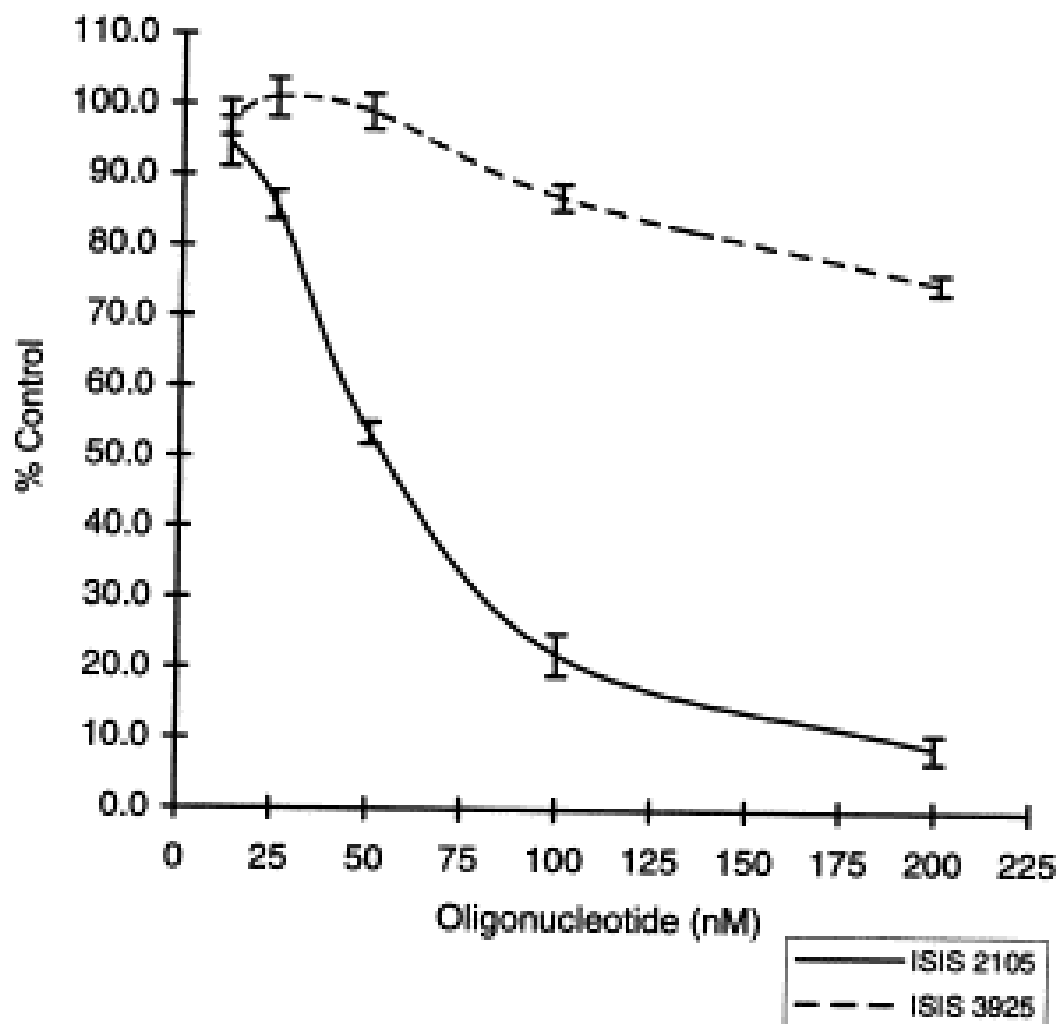




## Příklady použití modifikovaných antisense oligonukleotidů: antivirotika

**afovirsen**, syn. ISIS 8741 – volná „kyselina“; ISIS 2105 – nonadekasodná sůl

- Sekvence: ttgcttccat cttcctcgtc
- Modifikace: zbytky kys. fosforečné nahrazeny zbytky kys. thiofosforečné
- Použití: léčba infekce lidským papilomavirem (HPV; projevy infekce: bradavice ženských genitálií – nádor děložního hrdla)
- M.Ú.: vazba na virovou mRNA



Efekt ISIS 2105 a ISIS 3925 na replikaci DNA HPV. 24 hod po infekci pomocí elektroporace byly buňky linie SCC-4 „léčeny“ vzrůstajícími dávkami buď ISIS 2105 nebo ISIS 3925. Buňky byly „sklizeny“ 24 hod po elektroporaci a analyzovány na obsah HPV DNA. Data jsou vynesena jako % „neléčeného“ kontrolního pokusu; průměr 3 stanovení.

Příklady použití modifikovaných antisense oligonukleotidů: antivirotika

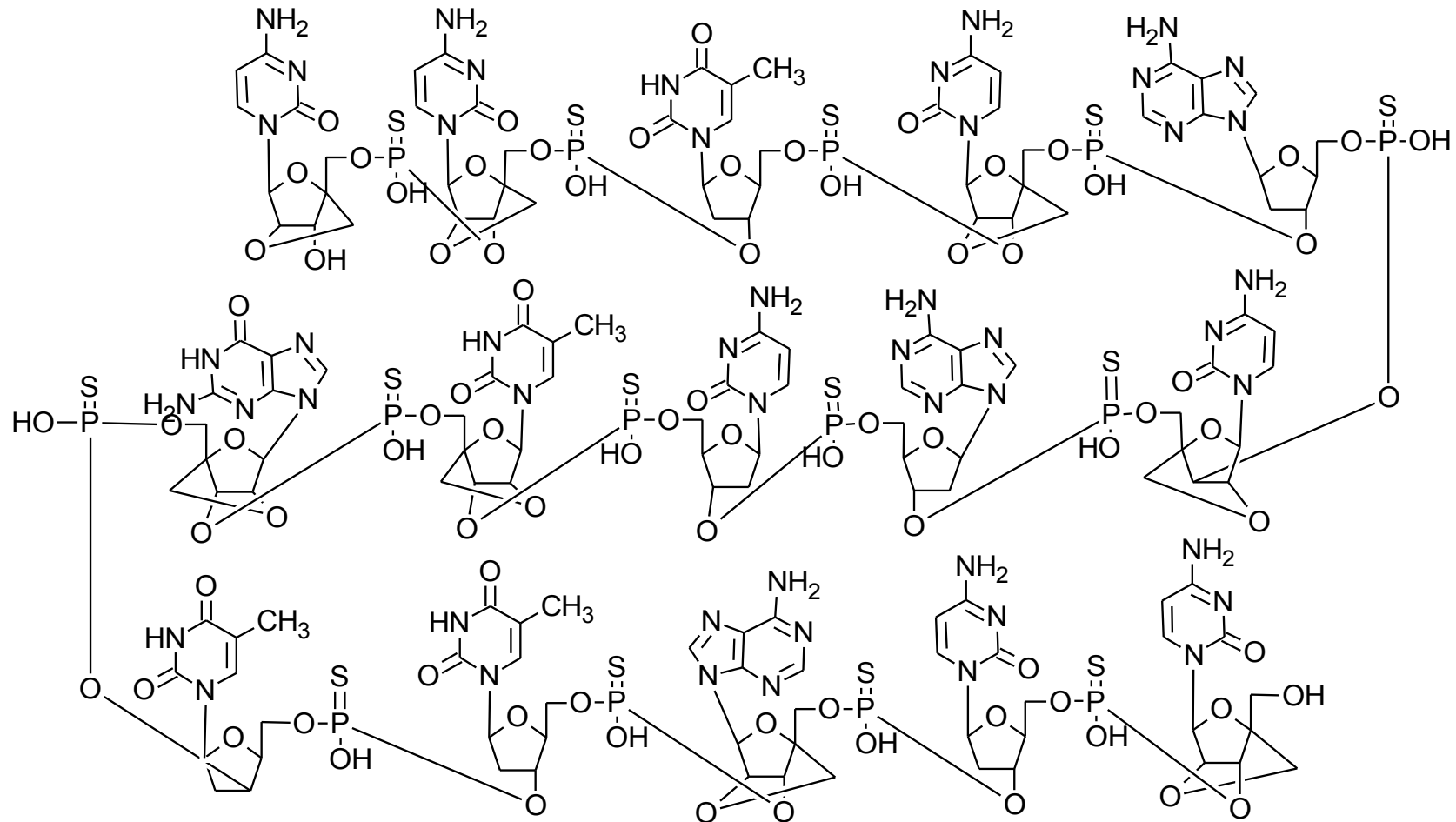
## **fomivirsen**

- 21 deoxyribonukleotidů, fosforthioát
- dokosasodná sůl
- sekvence 5'-G-C-G-T-T-T-G-C-T-C-T-T-C-T-T-C-T-T-G-C-G-3'
- inhibitor replikace cytomegaloviru: komplementární k RNA oblasti IE2 („immediate early region 2“) HCMV, inhibuje tvorbu IE2 proteinu a tím replikaci viru
- léčba CMV retinitidy u pacientů s AIDS
- Vitravene™ intravitreální injekce (reg. v USA cca 1998 - 2001)

## Příklady použití modifikovaných antisense oligonukleotidů: antivirotika

### miravirsen, SPC3649

- RNA, (P-thio)((2'-O,4'-C-methylen)m5C-dC-(2'-O,4'-C-methylen)A-dT-dT-(2'-O,4'-C-methylen)G-(2'-O,4'-C-methylen)m5U-dC-dA-(2'-O,4'-C-methylen)m5C-dA-(2'-O,4'-C-methylen)m5C-dT-(2'-O,4'-C-methylen)m5C-(2'-O,4'-C-methylen)m5C), sodná sůl (1:14)
- 16 bází, fosforthioátové skupiny, 8 methylenových můstků mezi atomy 2'-O a 4'-C ribosy



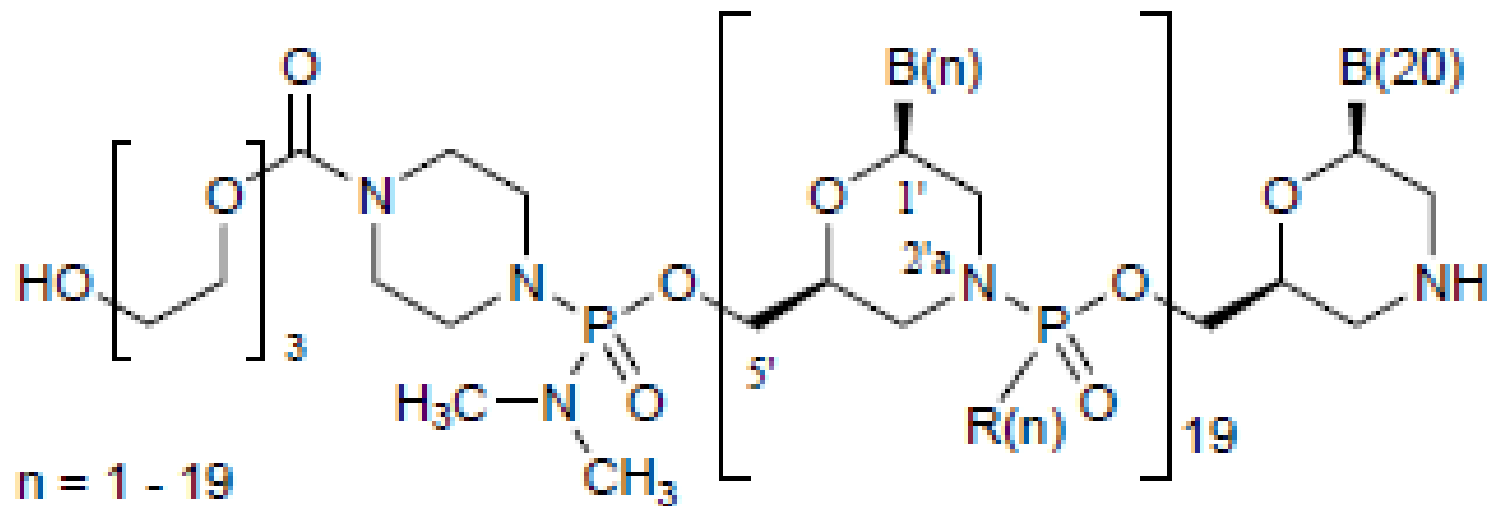
- mikroRNA jsou krátké (21-23 nukleotidů) nekódující regulační RNA, jež ovlivňují expresi genů na posttranskripční úrovni
- mikroRNA-122 (miR-122) je významná regulační RNA v játrech, která „jemně ladí“ expresi více než 100 buněčných genů a usnadňuje replikaci viru hepatitidy C (HCV) prostřednictvím interakce se dvěma sousedícími místy „po proudu“ kmenové smyčky I (SLI) v oblasti 5'-koncové translaci nepodléhající oblasti (5' UTR) virové RNA
- „zamčenou nukleovovou kyselinou“ vyvolaná inhibice regulační funkce miR-122 potlačila infekci HCV genotypy 1a a 1b *in vivo*
- klinické zkoušky 2. fáze proti HCV infekci samostatně nebo v kombinaci s telaprevirem nebo ribavirinem probíhají

Příklady použití modifikovaných antisense oligonukleotidů: antivirotika

## Morfolinové oligonukleotidy

### radavirsen, AVI-7100

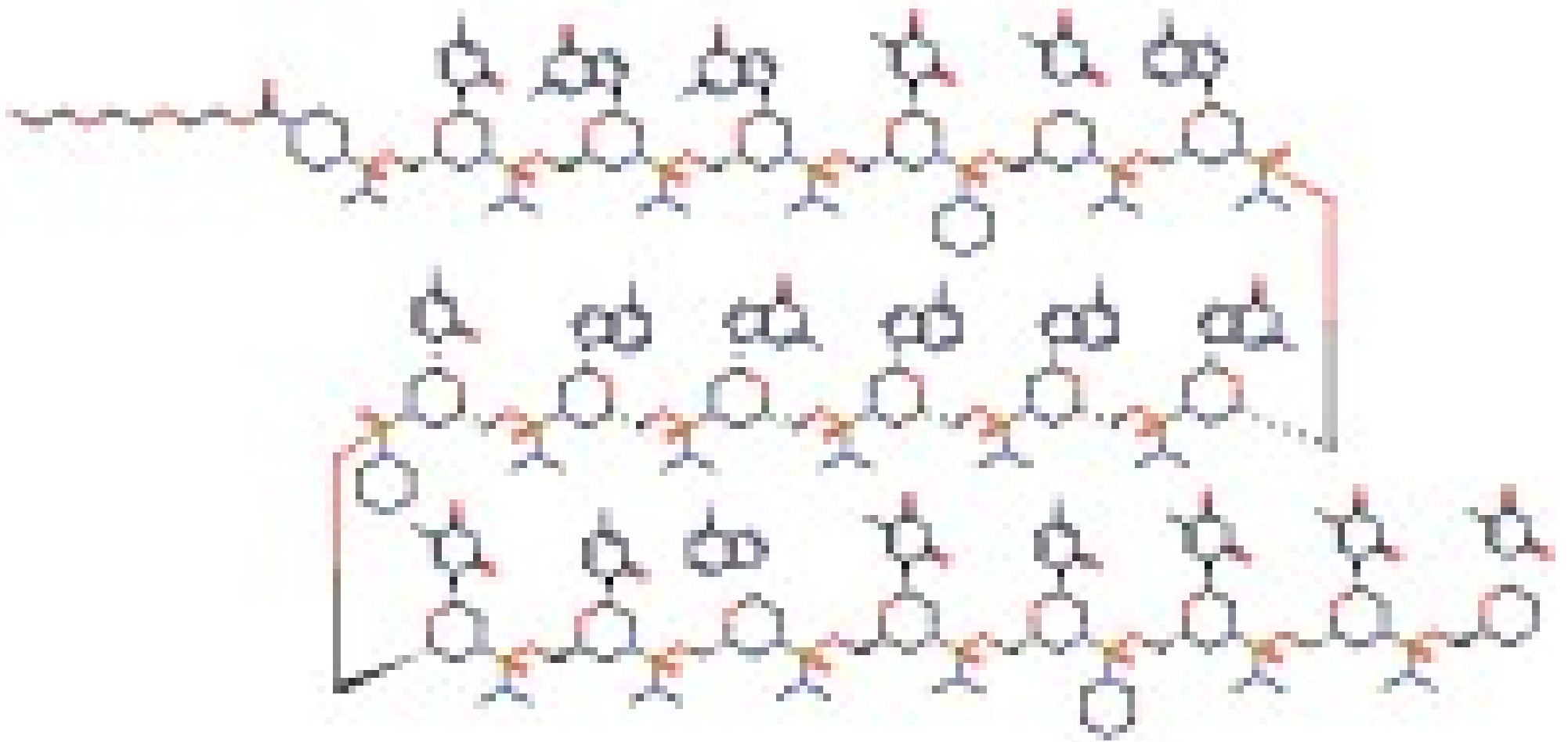
- fosfordiamidátový morfolinový antisense oligomer s kladným nábojem na vybraných podjednotkách; 20 bází; krátký PEG řetězec na substituentu na 5'-konci



B(1-20) : C-G-G-T-T-A-G-A-A-G-A-C-T-C-A-T-C-T-T-T

R(1-3) = R(5-11) = R(13-16) = R(18) = R(19) =  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$

R(4) = R(12) = R(17) =  $\text{HN} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{N} \text{---}$



- vyvinut pro léčbu sezónní i pandemické chřipky typu A
- specificky zasahuje sekvence virové mRNA
- zatím klin. studie 1. fáze: stanovení bezpečnosti, tolerability a farmakokinetiky při zvyšujících se jednotlivých dávkách AVI-7100 u zdravých dobrovolníků (od r. 2012).

## Příklady použití modifikovaných antisense oligonukleotidů: antineoplastika

### Inhibitory proteinkinasy C<sub>α</sub>

- proteinkinasy C: serino-threoninové kinasy zapojené do procesu transdukce signálu buněk (fosforylace signálních molekul); změněná exprese souvisí s kancerogenezí

**aprinokarsen**, syn. ISIS 3521, LY900003, CGP 64128A

Affinitak™

- deoxyribonukleotid, 20 bází, fosforthioát
- A-C-T-T-T-G-A-G-T-G-G-T-C-G-C-T-C-T-T-G
- 2. fáze klinického zkoušení proti nádoru plic nevycházejícím z malých buněk a melanomu (neoperabilním nebo metastazujícím), samostatně nebo s karboplatinou, gemcitabinem nebo paklitaxelem; též na dříve již léčený nádor prsu ukončena
- 3. fáze proti nádoru plic: přidání aprinokarsenu ke gemcitabinu nebo karboplatině neprodloužilo přežívání pacientů ani nezvýšilo jinak hodnocenou účinnost léčby

## Příklady použití modifikovaných antisense oligonukleotidů: antineoplastika

### Antagonista onkogenu Bcl-2

- Bcl-2: antiapoptický protein; jeho převaha nad strukturně příbuzným proapoptickým Bax představuje u nádorů špatnou odpověď na obvyklé protinádorové terapie a špatnou prognózu

**oblimersen**, G3139, augmerosen, Genasense<sup>®</sup>

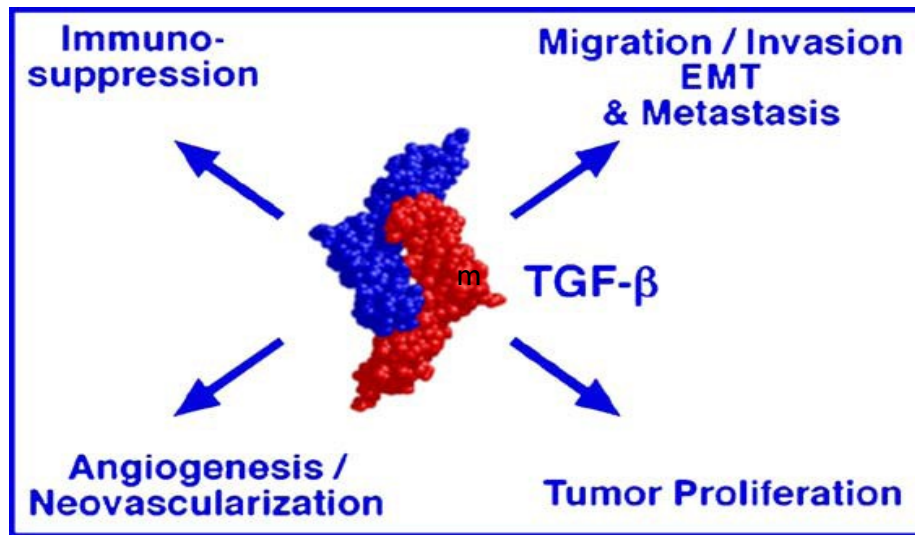
- deoxyribonukleotid, 18 nukleotidů, fosforthoát, heptadekasodná sůl
- T-C-T-C-C-C-A-G-C-G-T-G-C-G-C-C-A-T
- komplementární k prvním šesti kodónům humánní Bcl-2 mRNA
- podání i.v. infúzí
- v 1. - 3. fázi klinického zkoušení proti různým typům nádorů; účinný; rel. nízká toxicita



## Příklady použití modifikovaných antisense oligonukleotidů: antineoplastika

Inhibitor produkce transformačního růstového faktoru  $\beta_2$  (Transforming Growth Factor  $\beta_2$ ; TGF  $\beta_2$ )

- TGF  $\beta$ : multifunkční polypeptidový cytokin s významnou rolí mj. v proliferaci, morfogenezi, migraci; klíčový regulátor imunitního systému
- v savčích buňkách 3 izoformy: TGF  $\beta_1$ , TGF  $\beta_2$ , TGF  $\beta_3$ ; během embryogeneze exprimovány všechny 3, v normálních dospělých buňkách výrazně převládá TGF  $\beta_1$
- tumorové buňky významným producentem TGF  $\beta$ ; ten se váže na TGF  $\beta$ -receptory  $\Rightarrow$  signal. kaskáda prostřednictvím cytoplazmatických signálních mediátorů tzv. Smads vedoucí do jádra  $\Rightarrow$  Smads komplex reguluje expresi cílového genu
- TGF  $\beta_2$ : významný protumorový efekt; reguluje klíčové mechanismy vývoje nádorů: imunosupresi, metastazování, angiogenezi, proliferaci



**trabedersen**, AP-12009 (Antisense Pharma GmbH)

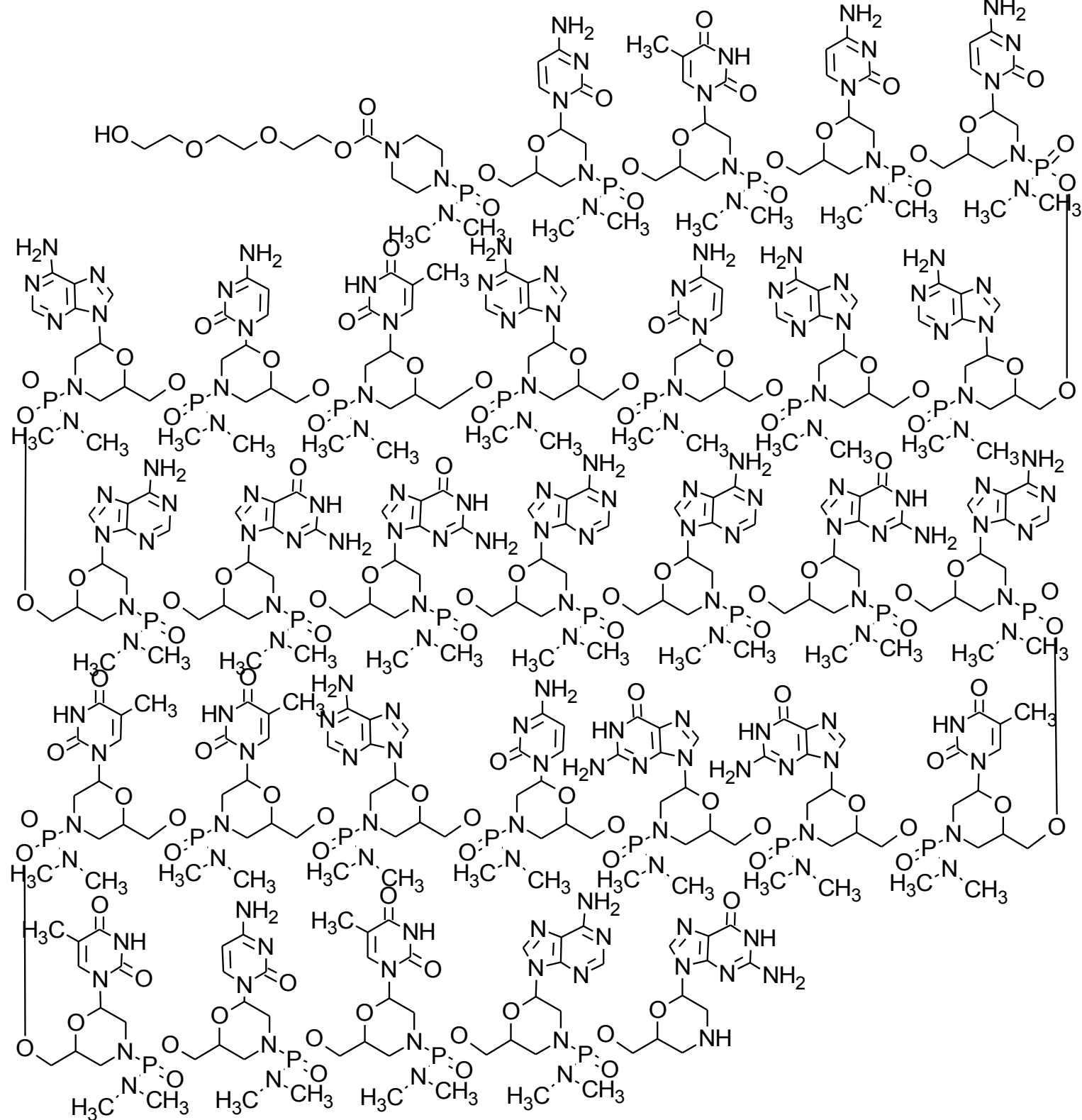
- oligodeoxyribonukleotid, fosforthioát, 18 nukleotidů
- sekvence C-G-G-C-A-T-G-T-C-T-A-T-T-T-T-G-T-A
- vyvinut k léčbě maligního gliomu, pankreatického karcinomu, maligního melanomu a jiných tumorů s nadměrnou expresí TGF- $\beta_2$
- 2. fáze klinického zkoušení na rekurentní gliom, podání intratumorální vysokoprůtokovou perfúzí; 3. fáze na anaplastický astrocytom, intratumorální infúze

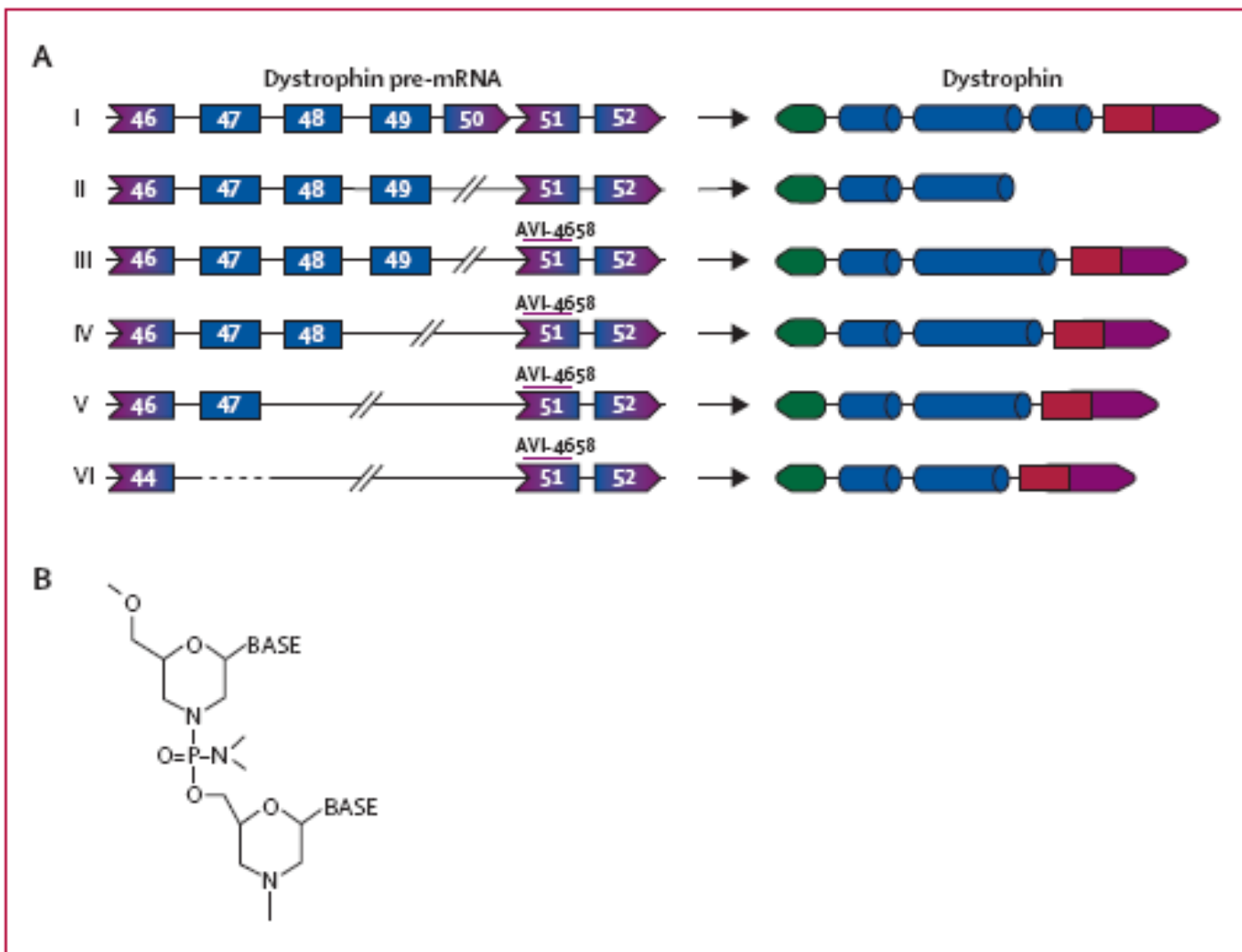
## Příklady použití modifikovaných antisense oligonukleotidů: léčiva Duchenneho dystrofie

- Duchenneho muskulární dystrofie: postihuje 1 z 3500 novorozených chlapců, vede k progresivnímu oslabení svalů, kardiomyopatii a respiračnímu selhání
- příčina: mutacemi narušený otevřený čtecí rámec a plná translace DMD genu, kódujícího peptid dystrofin
- oligonukleotidy cílené na patologické splicingové elementy („splice switching oligonucleotides“) v DMD pre-mRNA mohou vést k přeskočení exonu, k obnově otevřeného čtecího rámce a produkci funkčního, byť zkráceného řetězce dystrofinu a zmírnění projevů nemoci

**eteplirsen**, AVI-4658 (AVI BioPharma, Portland, OR, USA)

- morfolinový oligonukleotid cílený na 51. exon
- sekvenceCTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG
- klinická studie s lokálně i.m. aplikovaným AVI-4658 na 7 pacientech prokázala účinnost histologicky, histochemicky i klinicky





**Figure 1: Deletions and predicted results of exon skipping in the patients who were studied**

(A) Pre-mRNA transcripts and dystrophin protein products from full length *DMD*, in patients with Duchenne muscular dystrophy, and predicted protein sequences after exon skipping. (I) The normal dystrophin gene produces the full length dystrophin product. (II) Patients 1 and 2 had a deletion in exon 50 that disrupts the open reading frame, leading to a truncated and unstable dystrophin. (III) Skipping of exon 51 restores the reading frame, producing a truncated but functional dystrophin that lacks exons 50 and 51. (IV) Patient 7 is missing exons 49 and 50. (V) Patients 3 and 4 are missing exons 48–50. (VI) Patients 5 and 6 are missing exons 45–50. All the truncated dystrophins produced after skipping of exon 51 are missing the hinge 3 region and some of the rod domain but have been associated with the milder BMD phenotype.<sup>3,30</sup> (B) Structure of the phosphorodiamidate morpholino modification of the antisense oligomer.

# Transport nukleotidů na místo účinku

- Lipozóm v kombinaci s proteiny, specificky se vážícími na daný typ buňky, má zajistit cílené a účinné dopravení nízkých koncentrací terapeutických nukleotidů na místo účinku.

