ANKEM Derg 14 (No. 4): 492-494 (2000)

NÜKLEİK ASİT İLAÇLAR: ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİDLER

Şemsettin USTAÇELEBİ

Gen ekspresyonunun seçici inhibitörü olarak oligonükleotidler, gen aracılığı ile oluşan hastalıkların korunması ve tedavisi için yeni bir ufuk açmışlardır. Antisens tedavide oligonükleotidler, patolojik olayın gelişmesinde rol oynayan özgül hedef genin ekspresyonunu bloke ederler. Antisens tedavi tekniği tıbbın çeşitli dallarında uygulanmak üzere gündemde olup özellikle onkoloji, hematopatoloji, kardiyovasküler hastalıklar ve infeksiyon hastalıklarında uygulamalar için araştırmalar devam etmektedir.

Antisens oligodeoksinükleotidler (ODN) 12-30 nükleotid uzunluğunda kısa iplikçikler olup hedef m-RNA'ya komplementer özellik taşırlar. ODN'ler kendilerine komplementer olan RNA ile seçici bir şekilde Watson-Crick baz çifleşmesi kurallarına göre hibridize olurlar. Hedef m-RNA'nın translasyonu aktif veya pasif mekanizma olarak adlandırılan iki yolla inhibe edilir. Pasif mekanizmada m-RNA ve ekzojen nükleotid dizgeleri arasında hibridizasyon sonucunda bir dupleks formasyonu oluşur ve buna bağlı olarak da ribozomal kompleksde mesajın okunması inhibe edilir. Aktif mekanizmada hibridizasyon sonucu oluşan duplekse RNAaz H bağlanarak kompleksteki RNA'yı parçalar. Ancak DNA oligonükleotid sağlam kalarak diğer bir hedef m-RNA ile hibridize olabilir.

Antisens teknolojisinin felsefesi basit görünmekle beraber geniş çapta kullanılabilir antisens oligonükleotidlerin tedaviye yansıması yavaş ve zor görülmektedir.

Özgül ve etkin bir antisens molekülün yapılabilmesi için ilk basamak uygun hedef dizgelerin seçimidir. Antisens oligonükleotidler ve hedef dizgeler arasında etkin bir hibridizasyon meydana gelmesi bu dizgelerin tanınmasına bağlıdır. Ancak DNA oligonükleotidlerle kısa m-RNA dizgeleri özgül hibridizasyon vererek heterodupleks oluşumuna neden olabilir. Hedef RNA seçiminin ve oligodeoksiribonükleotidlere uygunluğunun saptanmasında bilgisayar model sistemlerinden yararlanılmaktadır.

İkinci basamak, oligonükleotidlerin ekzo ve endonükleazlarla parçalanmaya dirençli hale getirilmeleridir. Native ODN'ler nükleotid iskeletlerinde fosfodiester bağları içerirler ve nükleazlara duyarlıdırlar. Ancak modifiye oligonükleotidler nükleazlara daha dayanıklıdırlar. Bunun için de fosforotiyoat modifikasyonu sıklıkla kullanılmaktadır.

En önemli problemlerden birisi ODN'lerin parçalanmalarına mani olup biyolojik etkinliklerinin korunmasıdır. Özellikle ODN'lerin hücre içerisine alınma mekanizmaları tam olarak bilinmemekle beraber reseptör aracılığı ile endositozisin aktif transportta rol aldığı zannedilmektedir.

ODN'lerin in-vitro olarak direkt uygulanması etkin bir yöntem olmamakla beraber, fosforotiyoat ODN'lerin intravenöz olarak deney hayvan modellerinde uygulanmasının etkin olduğu ve özgül antisens inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, klinik uygulama için antisens tedavi araştırmalarının geliştirilmesine yardımcı olmuştur.

ODN'lerin in-vivo kullanılmalarından önce bazı farmakokinetik özelliklerinin saptanması gerekmektedir. Bunun için de, deneysel olarak fare, sıçan ve maymunlar kullanılmıştır. İntravenöz ve intraperitoneal enjeksiyondan sonra ODN'ler 24 saat içerisinde idrarla atılmaktadır. Ancak, beyin hariç birçok dokularda 48 saat süre ile saptanabilir düzey gös-

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

terilebilmektedir. Klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre ODN'lerin güvenli olduğu ve belirli bir düzeyde etkin olduğu bazı kanser hastalarında gösterilmiştir.

Antisens tedavinin uygulandığı en önemli grup kanserli hastalardır. Örneğin, en önemli sinyal transdüksiyon yolu proteinkinaz C (PKC) olup, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Birçok insan kanserlerinde (göğüs, kolon ve beyin tümörleri) PKC α ekspresyonunda bir artış görülmektedir. Bunun için, PKC α gen ekspresyonunu önleyen ODN'ler elde edilmiş ve antisens tedavide kullanılmıştır. Fosforotiyoat ODN'lerin özellikle mesane tümörleri, "non-small cell" akciğer kanseri ve over tümöründe etkin olduğu gösterilmiştir.

Antisens tedavinin anjioplastiden sonraki restenoziste vasküler by-pass yama oklüzyonunda ve koroner vaskülopati transplantlarında tedavi için potansiyel bir ilaç olduğu gösterilmektedir. Ayrıca, antisens moleküllerin vasküler duvara lokal transferi hücresel ve moleküler düzeyde ateroskleroz ile ilgili hastalıklarda alternatif bir tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Antisens oligonükleotidler, antiviral ajanlar olarak tedavide ümit verici yeni antiviral ilaçları oluşturmaktadırlar. İlk defa 1978 yılında antisens oligonükleotidlerin civciv embriyonu fibroblastlarında Rous sarkoma virusunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

HIV virusu, replikasyon şekli ve yapısı yönünden oldukça sık mutasyon ve genetik varyasyon gösteren bir virustur. Son yıllarda, AIDS tedavisinde kullanılan ilaçlar, hastalarda ağır yan etkilere neden olmaktadır. HIV virusunun iyi korunmuş yani sık mutasyona uğramayan m-RNA'ları hedef seçilerek antisens tedavi uygulanması en önemli araştırma bölümünü oluşturmaktadır. Bazı araştırıcılar, iyi korunan p24 kor antijen proteinini hedef alarak 15-20 nükleotidle antisens dizgeleri hazırlamışlardır. Bu antisens oligonükleotidler henüz klinik uygulama safhasındadır.

Hepatit B ve hepatit C virusları ile meydana gelen kronik infeksiyonlar bütün dünyada büyük bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hastalarda kullanılan ve tek tedavi yöntemi olan interferon tedavisi sadece % 20-30 hastada etkinlik gösterebilmektedir. Özellikle, deneysel bir sistemi oluşturan ördek hepatit B virusu (DHBV) model sistem alınarak antisens ODN'ler ile moleküler tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Alınan sonuçlar antisens oligonükleotidlerin hepatit virusları ile oluşan infeksiyonlarda etkin olabileceğini göstermektedir.

Vitraven antisens mekanizma ile tedavide kullanılan ve ATSD'de lisans alan bir ilaçtır. Vitraven sitomegalovirus retinitli AIDS hastalarında lokal olarak kullanılmaktadır. Vitraven, sitomegalovirus replikasyonunu antisens mekanizma ile inhibe eden fosforatiyoat oligonükleotiddir. Vitravenin in-vitro olarak insan sitomegalovirusunun replikasyonunu gansiklovir ve foskarnet gibi antiviral ilaçlardan daha etkin bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, vitraven AIDS tedavisinde kullanılan diğer ilaçların aktivitesini interfere etmemektedir.

Antisens ODN'lerin etkinlikleri birçok preklinik çalışma ile gösterilmiştir. Fosforotiyoat ODN'ler faz I ve faz II klinik ilaç olarak kanser olgularında ve viral infeksiyonlarda kullanılabilirliği gösterilmiştir. Halen yapılmakta olan deneysel çalışmalar ve preklinik uygulamalar antisens tedavide ODN'lerin potansiyel ilaç olarak gelecekte pratiğe yansıyacakları ümidini vermektedir.

KAYNAKLAR

1- Agrawal S, Zhao Q: Antisense therapeutic, *Curr Opin Chem Biol 2:*519 (1998).

2- Blocm A, Lockhorst H: Bcl-2 antisense therapy in multiple myeloma, *Pathol Biol (Paris) 47:*216 (1999).

3- Bochot A, Couvreur P, Fattal E: Intravitreal administration of antisense oligonucleotides; potential of liposomal delivery, *Prog Retin Eye Res 19:*131 (2000).

4- Bradbury J: Antisense drugs move towards the clinic, *Lancet 349:*259 (1997).

5- Caselmann WH, Eisenhardt S, Alt M: Synthetic antisense oligodeoxynucleotides as potential drugs against hepatitis C, *Intervirology 40:*394 (1997).

6- Crooke ST, Bennet CF: Progress in antisense oligonucleotide therapeutics, *Ann Rev Pharmacol Toxicol 36:*107 (1996).

7- Galdersisi U, Cascino A, Giordano A: Antisense oligonucleotides as therapeutic agents, *J Cell, Physiol 181:*251 (1999).

8- Laitinen M, Yla-Herttuala S: Vascular gene transfer for the treatment of restenosis and atherosclerosis, *Curr Opin Lipido 9:*465 (1998).

9- Nichols WG, Boeckh M: Recent advances in the therapy and prevention of CMV infections, *J Clin Virol 16:*25 (2000).

10- Offensperger WB, Offenperger S, Blum HE: Antisense therapy of hepatitis B virus infection, *Mol Biotechnol 9:*161 (1998).

11- Perry CM, Barman Balfour JA: Fomivirsen, *Drugs 57:*375 (1999).

12- Zhang, X, Wen J, Aletta JM, Rubin RP: Inhibition of expression of PKC-alpha by antisense mRNA is associated with diminished cell growth and inhibition of amylase secretion by AR4-2J cells, *Exp Cell Res 233:*225 (1997).