

# Daganatellenes antiszensz oligonukleotidok

Ötvös László, Sági Gyula

MTA Kémiai Kutatóközpont, Budapest

Az antiszensz oligonukleotidok (AON) alkalmazása a génexpresszió specifikus gátlása révén igen hatékony lehetőségeket biztosít a daganatellenes gyógyszerek fejlesztése területén. Az AON-ek terápiai hatékonyságának növelése céljából két új vegyületcsoportot állítottunk elő. Az első bázismódosított oligonukleotidokat tartalmaz. A pirimidinek 5-pozíciójában szubsztituált származékainak AON-ekbe történő beépítése növeli a sejtmembrán-permeabilitást (a), a duplexstabilitást (b) és a nukleázrezisztenciát (c). Az említett sajátságokat nagyszámú modell vegyülettel tanulmányoztuk. A legjobb módosításnak az 5-(1-hexinil)dU alkalmazását találtuk. Az MMP-9 kollagenázinhibitor oligonukleotidokba (potenciális metasztázisgátló szerek) a timidinek helyére ezt a nukleotidot beépítve az inhibitor hatékonysága nagyságrenddel megnőtt a timin bázist tartalmazókhöz viszonyítva. A másik vizsgált vegyületcsoportot az antiszensz irányított prodrug terápia koncepció alapján szintetizált vegyületek képezik. Ennek az elvnek megfelelően egy telomerázinhibitor 3' végén 5-fluor-2'-dezoxiuridinnel (FdU) és oligo-FdU-val konjugáltunk foszfodiészter-kötéssel. HT29 human adenocarcinoma sejt kultúrában a prodrugok antiproliferatív aktivitása lényegesen növekedett az (FdU)<sub>n</sub> tagszám növekedésével. Az egy FdU-t tartalmazó konjugátum mintegy 5-ször, az (FdU)<sub>3</sub> tartalmú 19-szer volt aktívabb, mint az FdU magában. A 6 FdU egységet tartalmazó prodrug aktivitása kimagaslóan nagy volt (FdU-ra vonatkoztatott relatív hatékonyság = 26,6), mely alapján az in vivo hatástani vizsgálatoktól biztató gyógyszerfejlesztési eredmények várhatók. A HT1080 sejtekben a konjugátumokban lévő FdU antiproliferatív aktivitása 5-13-szorosra nőtt a nukleozid formában adott FdU-hoz viszonyítva. *Magyar Onkológia* 48:221-227, 2004

Antisense oligonucleotides (AONs) provide an efficient approach for developing target-selective anticancer drugs, because they can inhibit gene expression sequence specifically. To improve the therapeutic efficiency of AONs, two new types of the compounds have been developed. The first group of antisense oligodeoxynucleotides investigated contains base modified nucleotide units. Incorporation of 5-substituted pyrimidines into AONs increases cell membrane permeability (a), duplex stability (b), and nuclease resistance (c). These properties were studied using a large number of model oligonucleotides. The application of 5-(1-hexynyl)dU has been found to be the best modification. Application of MMP-9 collagenase inhibitor oligonucleotides (potential metastasis inhibitors) containing these nucleotide units instead of thymidines increased the collagenase inhibition potency by one order of magnitude compared to that of parental oligonucleotide including thymine bases. The second group of the compounds investigated represents a new type of antisense oligonucleotide synthesized by the antisense directed prodrug therapy (ADPT) conception. According to this principle, a telomerase inhibitor AON was conjugated with 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdU) and oligo-FdUs by phosphodiester bond at the 3'-terminus. The antitumor activities of conjugates in comparison with that of FdU were tested in HT1080 human fibrosarcoma and HT29 human colon adenocarcinoma cell lines. In HT29 cell culture the antiproliferative activity of prodrugs significantly increased with increasing length of the 3'-(FdU)<sub>n</sub> tail. The conjugate with one FdU unit was about 5 times, while the AON-(FdU)<sub>3</sub> analogue was almost 19 times more active than FdU. Antitumor activity of the prodrug containing six FdU units was extremely high (relative efficiency = 26.6), therefore, in vivo testing of this analogue seems to be reasonable and promising. Antiproliferative activity of (FdU)<sub>n</sub> conjugated with a telomerase inhibitor increased by 5-13 times in HT1080 cells as compared to FdU administered in nucleoside form. *Ötvös L, Sági G. Antisense oligonucleotides with antitumor activity. Hungarian Oncology* 49:221-227, 2004



Közlésre érkezett: 2004. július 2.  
Elfogadva: 2004. augusztus 3.

Levelezési cím: Dr. Ötvös László, MTA Kémiai Kutatóközpont,  
1025 Budapest, Pusztaszeri út 59-67. Tel./fax: 438-4134, e-mail: otvos@chemres.hu

A szerzők a közleményt Dr. Jeney András egyetemi tanár 70. születésnapjára ajánlják.

## Az antiszensz oligonukleotid gyógyszerelv

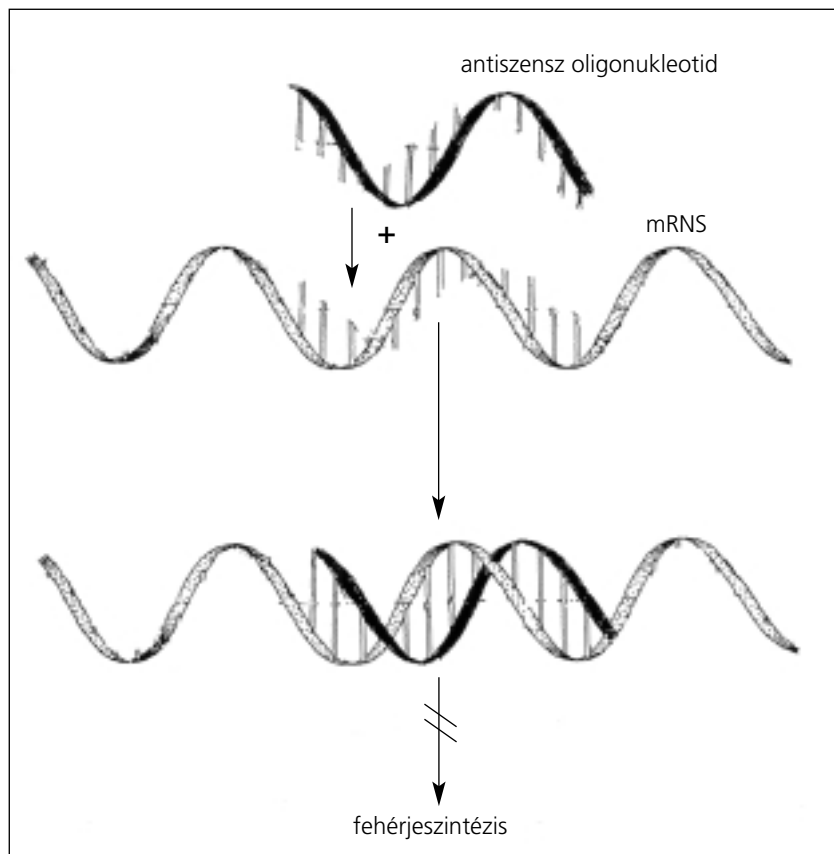
Zamecnik és Stephenson 1978-ban közölt felismerése (27, 31), mely szerint a Rous sarcoma vírus replikációja oligodezoxinukleotidokkal gátolható, a gyógyszeres terápia új, ma még alig felbecsülhető értékű lehetőségét nyitotta meg, elsősorban a vírus- és daganatkemoterápia területén.

A génregulációs oligonukleotidok biológiai hatásukat vagy DNS-sel való triplex vagy RNS-sel való duplex képzése útján fejtik ki. A triplexképzés farmakológiai felhasználása azon alapszik, hogy az oligonukleotid valamely betegség létrejöttében szerepet játszó endogén vagy exogén anyag (baktérium, vírus, patogén gomba) bioszintézisét meghatározó DNS-részlet adott szakaszával komplexet képezve meggátolja a transzkripciót.

Az RNS-sel való duplex *antiszensz* elven fejt ki biológiai hatását. Az antiszensz oligonukleotidok nagy többsége adott messenger-RNS érését ill. translációs effektusát gátolja. Egyes RNS-vírusok esetén a virális RNS transzkripciójának gátlása is kedvező biológiai hatást fejthet ki.

A módszer alapvető gyógyszeralkalmazási lehetősége szelektivitásában rejlik. A szensz nukleinsavszakasszal komplementer 15–25 tagú oligonukleotid igen nagy specificitással kötődik a kóros fehérje translációját kiváltó mRNS-hez. A specificitás olyan mértékű, hogy egyetlen bázis kicserélése egy másikkal (mismatch) a fehérjeszintézis gátlását nagyságrenddel csökkenti, több csere a hatást teljesen megszünteti. Más szóval: a feltüntetett tagszámú oligonukleotid csak egyetlen fehérje specifikus szintézisének gátlását váltja ki (1. ábra).

1. ábra.  
Az antiszensz oligonukleotid hatásmechanizmusa



Az idézett felfedezés a gyógyszeralkalmazásnak csak az elvi lehetőségét teremtette meg. A természetes nukleotidokból felépített oligomerek gyógyszerként nem használhatók az élő szervezetben bekövetkező igen gyors lebomlásuk miatt. Gyógyszercélú felhasználásra az ezt kizáró módosított szerkezetű oligomerek szintézisére volt szükség. A világszerte igen nagy intenzitással megindult kutatások eredményeként ma már több mint ezeröttszáz módosítás vált ismertté (több mint ötven magyar eredetű). A módosítások első típusát a foszfátdiészter-kötés tiofoszfátra való cseréje képviselte. Azóta az oligonukleotid-részek minden egységét (bázisok, dezoxiribóz, internukleotid kötések) igen különböző szerkezeti elemekkel módosították. A nukleázrezisztencia említett követelményét is beleértve az antiszensz oligonukleotidoknak az alábbi tulajdonságokkal kell rendelkezniük:

- megfelelő koncentrációban jusson be a fertőzött sejtbe;
- stabil komplexet hozzon létre a gátolt RNS komplementer részével;
- ellenálló legyen a bontó enzimekkel szemben.

Ezeken túlmenően a megfelelő farmakológiai hatásnak feltétele az RNáz-H-val való hasíthatóság is. Az RNáz-H működése lehetővé teszi, hogy a szerek ne csak egy molekula mRNS-ének translációját akadályozzák meg, hanem a gátolt nukleinsav elbontása után az antiszensz vegyület újabb mRNS-hez kötődjön. A folyamat többször megismétlődhet. Az RNáz-H-indukció nagymértékben függ az oligonukleotid-módosítástól.

Az antiszensz stratégia hatékonyságát mutatja, hogy az első alapvető eredmény megjelenését követően – a kilencvenes évek közepén közzétett szkeptikus vélemények (4, 26) ellenére – alig két évtized múlva az első antivirális dezoxioligonukleotid az Egyesült Államokban gyógyszerként (Vitravene) forgalomba került, két daganatellenes vegyületet engedélyeztek, és már 2002-ben több mint 30 származék volt a klinikai vizsgálatok különböző fázisaiban (6). Bár egyes vélemények e vizsgálatokkal kapcsolatosan csalódottságról beszélnek (25), az antiszensz gyógyszerek jelentőségét mutatja, hogy a kutatásukra specializálódott csoportok mellett, illetve azokkal együttműködve, újabb gyógyszergyártó világcégek (Lilly, Novartis) is részt vesznek a fejlesztésekben. Az engedélyezett ill. klinikailag vizsgált vegyületek több mint fele daganatkemoterápiai célt szolgál.

Ebben a közleményben két olyan oligonukleotid vegyületcsoporttal végzett vizsgálatot foglalunk össze, melyek elvi alapjait hazánkban dolgozták ki, és citosztatikus hatásuk megismerése magyar kutatási eredmény.

### Pirimidinbázis-módosított vegyületek

A vegyületcsoportba azok a vegyületek tartoznak, melyekbe az oligonukleotidok timin bázisai helyett 5-alkil-, 5-(1-alkenil)- ill. 5-(1-alkinil)-uracilok, a citozin helyett a pirimidinyűrű 5-pozí-

ciójában ugyanezen szubsztituenseket tartalmazó bázisok kerültek beépítésre.

A nukleozidok szintézisét az 1975 utáni években dolgozták ki (17, 18) az MTA Központi Kémiai Kutató Intézet munkatársai. Széleskörűen tanulmányozták DNS-be történő enzimatisz beépülésük specificitását (14, 16), egyes származékok antivirális és citosztatikus hatását (7, 8, 18, 19), valamint az antiszensz alkalmazhatóság szempontjából alapvető fontosságú nukleázrezisztenciát (21) a belőlük enzimekatalizált szintézissel előállított polinukleotidokkal.

A nukleozidokból szilárdfázisú oligonukleotid-szintézisekhez alkalmazható foszforamiditeket és H-foszfonátokat szintetizáltunk. A kívánt szekvenciájú oligomert automata szintetizátorokkal állítottuk elő és HPLC technikával tisztítottuk. A tiofoszfát oligonukleotidok szintéziséhez a kénatom beépítésére tetraetil-tiuram-diszulfid reagenst használtunk. A vegyületek tisztaságát tömegspektrumuk igazolta.

Laboratóriumunkban mindhárom, a bevezetőben említett alapvető antiszensz oligonukleotid tulajdonságot vizsgáltuk. Ehhez az egyes módosított nukleotidokból (5-R-dC - dA)<sub>10</sub> illetve (5-R-dC - dG)<sub>6</sub> oligonukleotidokat szintetizáltunk a fentiekben említett módon, és meghatároztuk ezek sejtbe jutási, hibridstabilitási és nukleázhasíthatósági értékeit, összehasonlítva a természetes bázisokat tartalmazó (dT-dA)<sub>10</sub> ill. (dC-dG)<sub>6</sub> oligomerekével. Mivel a citosztatikus hatástani vizsgálatokat módosított uracilt tartalmazó vegyülettel végeztük, csak az uridinszármazékokkal nyert eredményeket foglaljuk össze.

### Sejtbe jutási tulajdonságok

A 2'-deoxi-oligonukleotidok sejtbe jutási készségének meghatározása 5' végén <sup>35</sup>S-tiofoszfát csoportokat tartalmazó radioaktív vegyületek felhasználásával valósult meg MT4 hibridoma sejt-vonalon. A radioizotópos vegyületek szintézise polinukleotid katalizálta reakcióban történt  $\gamma$ -<sup>35</sup>S-ATP foszfátdonor alkalmazásával.

Az 5-R-dU tartalmú oligomerek a pirimidingyűrű 5-helyzetében C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> szénatomszámú alkil-, 1-alkenil- ill. 1-alkinil szubsztituenset tartalmaztak. A 24 órán át <sup>35</sup>S-jelzett (5-(1-alkinil)dU-dA)<sub>10</sub> ODN-ekkel gátolt, majd feltárt sejtek azonos térfogatú mintáinak a (dT-dA)<sub>10</sub>-5'-<sup>35</sup>S- $\gamma$ -foszfáthoz viszonyított relatív radioaktivitását az 1. táblázat foglalja össze.

Az értékek jó korrelációt mutatnak a vegyületek hidrofobicitásával (23) (2. ábra). Utóbbiak a nukleozidokra kidolgozott HPLC retenciók idő mérésére alapozott eljárással (30) kerültek meghatározásra.

Hasonló korrelációk valamennyi sorozatban bizonyítottak, így az antiszensz oligonukleotidok tervezésénél megfelelő biztonsággal figyelembe vehetők.

### Hibridstabilitás

Az antiszensz hatékonyság kifejtése szempontjából alapvető jelentőségű kérdés a megfelelő stabi-

litású duplex kialakítása a komplementer nukleinsavszakasszal.

A komplexek stabilitását – általánosan – hővel szembeni stabilitásuk mérésével, az ún. T<sub>m</sub> pont megadásával jellemzik. A T<sub>m</sub> pont (thermal transition midpoint) az a hőmérséklet, amelyen az eredeti duplex 50%-a még „natív” kettős hélix, 50%-a pedig már „denaturált” állapotú. A T<sub>m</sub> pont az UV-fényelnyelés-hőmérséklet összefüggés görbéiről olvasható le.

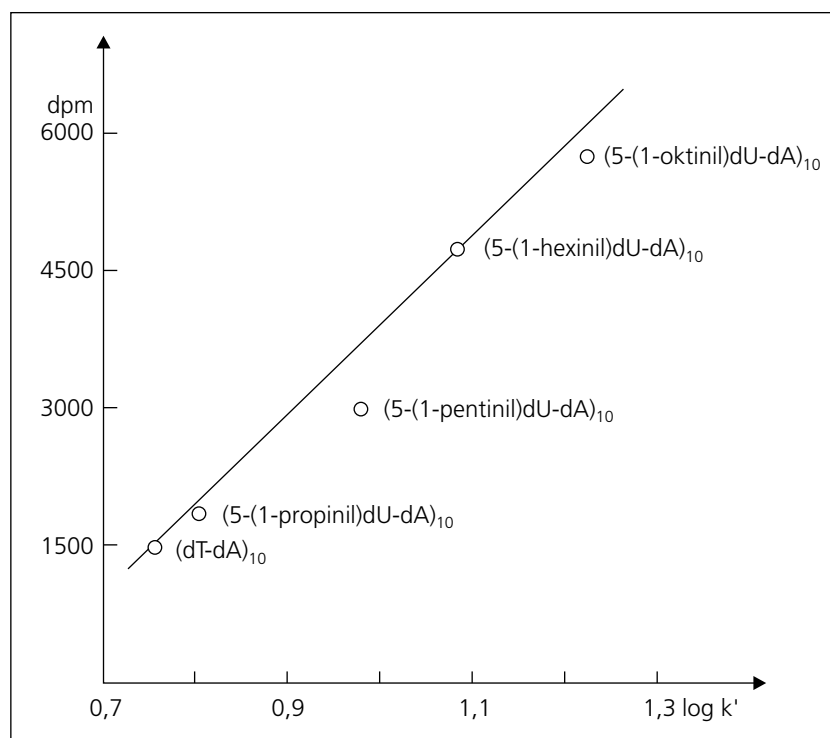
A vizsgált vegyületsorozatok közül az 5-alkil-dU-tartalmú oligomerekben a szubsztituens hosszával arányosan csökken a komplex stabilitása (2. táblázat).

Az 5-alkil szubsztituáció a dU egységben csökkeneti a duplexstabilitást, így ez a módosítás használhatatlan antiszensz vegyületek előállítására. Az 5-(1-alkinil)dU egységeket tartalmazó ODN-ek közül a propinil-, pentinil-, és hexinil szubsztituens növeli az oligomerek T<sub>m</sub> értékeit, ezáltal a módosítás javítja az antiszensz tulajdonságokat. A hexinilnél hosszabb 1-alkinil-csoportok az alkil szubsztituenshez hasonlóan kedvezőtlen hatású-

1. táblázat. (dT-dA)<sub>10</sub> és 5-(1-alkinil)dU analógjaik relatív sejtbe jutási készsége

dU 5-helyzetű szubsztituense	Relatív radioaktivitás (%)
metil	100
1-propinil	118
1-butinil	160
1-pentinil	212
1-hexinil	305
1-heptinil	355
1-oktinil	405

2. ábra. 5-(1-alkinil)dU tartalmú oligonukleotidok [(dU-dA)<sub>10</sub> analógok] hidrofobicitása és sejtbejutási készsége közötti összefüggés



ak. A  $(dT-dA)_{10}$  analógok  $T_m$  adatainak összefoglalását a 2. táblázat adja meg.

### Nukleázrezisztencia

A megfelelő stabilitású hibrid képzése mellett az antiszensz oligonukleotidokkal szembeni legfontosabb követelmény a nukleázokkal szembeni ellenállóképesség biztosítása. Az irodalomban található igen nagyszámú módosítás a természetes oligonukleotidok foszfátdiészter-kötése ill. a cukorrész módosításán alapul. A polinukleotidokkal nyert eredményekre alapozva a hazai vizsgálatok a bázismódosított vegyületek felhasználását tűzték ki célul az előzőekben már tárgyalt 5-szubsztituált pirimidinek felhasználásával. A kísérletek e módosítás használhatóságát teljes mértékben igazolták.

A 3. táblázat az 5-R-dU tartalmú oligomerek enzim hasíthatóságát foglalja össze kígyóméreg foszfodiészteráz (PDE) katalizálta reakcióban és humán szérumban végzett kísérletekben. Az antiszensz-alkalmazási szempontból való analízis egyszerűsítése céljából a táblázatban szereplő értékek a természetes bázist (T) tartalmazó vegyületre vonatkoztatott relatív adatok. A részle-

2. táblázat.  
 $(dT-dA)_{10}$  analógok  
duplexstabilitása  
fiziológiás\* sóoldatban

dU 5-helyzetű szubsztituense	$T_m$ (°C)
metil	47,4
n-propil	34,9
n-butil	33,8
n-pentil	32,1
n-hexil	<5
n-oktil	<5
1-propinil	58,4
1-pentinil	54,4
1-hexinil	52,5
1-heptinil	44,0
1-oktinil	18,3

\*0,1 M NaCl, 20 mM Na-foszfát puffer (pH 7,2), 2 mM  $MgCl_2$

3. táblázat. Oligonukleotidok relatív hidrolízis-sebessége humán szérumban és PDE-katalizált reakcióban

dU 5-helyzetű szubsztituense	Hidrolízist kiváltó ágens	
	PDE	szérum
metil	100	100
n-propil	79	-
n-butil	27,5	36
n-pentil	2,8	0
n-hexil	0	0
1-propinil	38	11,5
1-pentinil	0	0
1-hexinil	0	0

tes kinetikai vizsgálatok az irodalomban (15) található. Az eredmények azt igazolják, hogy már a telített megfelelő hosszúságú alkilszubsztituensek is csökkentik a nukleáz általi hasíthatóságot, mely még sokkal hatékonyabban érvényesül az 1-alkenil- és még kifejezettebben az 1-alkinil-származékok esetén. A pentinilnél hosszabb 5-(1-alkinil)-dU-t tartalmazó oligomerek nem hidrolizálnak a megadott kísérleti körülmények között, így antiszensz oligonukleotidokba való beépítésük igen előnyös lehet.

### Összegző analízis

Az előzőekben tárgyalt vizsgálatok szerint a 2'-dezoxiuridin pirimidinyűrűjének 5-helyzetébe beépített alkil- és 1-alkinil-szubsztituensek a három antiszensz kritériumot nem azonos mértékben változtatják meg, sőt adott esetben ellentétes hatásúnak bizonyultak. Az 5-alkil-helyettesítők pl. a szénlánc növelésével arányosan csökkentik a nukleáz általi hasíthatóságot, ugyanakkor a hibridképződési készséget rontják. A tényezők összegző analízise arra az eredményre vezetett, hogy legmegfelelőbb az 5-7 tagszámú, hármas kötést tartalmazó szubsztitúció. Az összes paraméter figyelembevételével a leghatékonyabbnak az 5-(1-hexinil)dU alkalmazása látszott. Ennek igazolására szintetizáltunk HIV- valamint HSV-ellenes ODN-eket, továbbá kollagenázinhibitor antiszenszket. Az *in vitro* mikrobiológiai vizsgálatok elképzelésünk helyességét meggyőzően bizonyították. A timidin 5-(1-hexinil)dU-val történő kicserélése az oligonukleotidok HIV (16), valamint HSV (29) elleni hatékonyságát legalább egy nagyságrenddel növelte. Előkísérletek alapján hasonló mértékű effektus volt várható a kollagenázinhibitorok esetén is (16).

### Kollagenáz enzim gátlása 5-(1-hexinil)dU-tartalmú oligonukleotidokkal tumorsejtekben

A mátrixmetalloproteázok (MMP) közé tartozó kollagenáz-IV enzim két izoenzimjének (MMP-2 és MMP-9) aktivitása és a tumormetasztázis közötti korrelációra számos irodalmi utalás található (1, 2, 11, 24). Mindkét izoenzim katalizálja a bazális membránfehérjék lebontását, ami a tumormetasztázis kialakulásának első lépése. E felismerés szerint a kollagenázinhibitoroktól tumorellenes hatás várható. Mind az MMP-2, mind az MMP-9 mRNS-szekvenciája ismert, így lehetőség kínálkozik antiszensz típusú oligonukleotid inhibitorok tervezésére.

A humán kollagenáz antiszensz oligonukleotidokkal történő gátlását már vizsgálták (22). Az 1-hexinil-dU módosítás hatásának tanulmányozása céljából szintetizáltuk az alábbi vegyületeket.

- 1 5'-CTGGGCAGATTCCAAACC-3'
- 2 1 oligomer tiofoszfát származéka
- 3 5'-CHiGGGCAGAHiHICCAAACC-3'  
Hi = 5-(1-hexinil)dU
- 4 3 oligomer tiofoszfát származéka

A HT1080 human fibrosarcoma sejtekkel végzett kollagenázgátlási kísérletek eredményeit a 4. táblázat összegzi. A kollagenázaktivitás mérése zselatin zimografias módszerrel történt. Az adatok szerint a 4 vegyület, mely a tiofoszfát-módosított oligomerben 5-(1-hexinil)dU egységeket tartalmaz, inhibitor aktivitása egy nagyságrenddel nagyobb, mint a T-t tartalmazó 3 vegyületé. A 4. táblázatban szereplő 1 és 2 vegyületek foszfátdiészter-kötést tartalmaznak, nem tiofoszfát-módosított származékok. Az 1-ben T, a 2-ben 5-(1-hexinil)dU szerepel. Ez az összehasonlítás is mutatja az alkinilszubsztitúció hatását, de mértéke az 1 bizonytalan értéke miatt nem definiálható. A 3 és 4 közötti nagyságrendi IC<sub>50</sub> különbözőség igazolja az alkinil-bázismódosítás kedvező hatását a tumorelles antiszensz oligonukleotidok körében.

### Antiszensz-irányított prodrugok

#### Antiszensz-irányított prodrug-koncepció

A prodrug-kutatások több mint negyven éves történetében az utolsó évtized a rohamos fejlődés és a koncepcióváltás időszaka. Utóbbi alatt az értenődő, hogy míg korábban elsősorban az adott gyógyszer farmakokinetikai paramétereinek (felszívódás, szerveloszlás, kiürülés, metabolizmus) hatástani kedvező irányú változtatása volt a cél, jelenleg a kóros sejtekre ill. azok betegségben szerepet játszó alkotórészeire (biopolimerjeire) gyakorolt szelektív hatásváltozás vált fő célkitűzéssé. Ezt a „pro” („módosító”) egység szerkezeti és biokémiai sajátosságai biztosítják. Ilyen módon jöttek létre az ADEPT (antibody directed enzyme prodrug therapy) és a GDEPT (gene directed enzyme prodrug therapy) koncepciók, melyekben a szelektív felismerést az antitest ill. a sejtidegen bevitt gén biztosítja. A módszerek elsősorban daganatterápiái szerepek fejlesztésében nyertek felhasználást (10).

A szelektivitás biztosítására igen racionálisnak tűnt egy adott gyógyszernek kóros sejtekre specifikus antiszensz oligonukleotidhoz való kapcsolása. A hazánkban felvetett (20) antiszensz irányított prodrug-terápia (antisense directed prodrug therapy; ADPT) lényege, hogy ismert gyógyszermolekulát egy antiszensz oligonukleotidhoz kapcsolunk kovalens kötéssel. Ebben a rendszerben a specifikus felismerést a kórképre jellemző nukleinsav-szegmenssel végbemenő specifikus hibridizáció biztosítja. A lokálisan lehasadó gyógyszermolekula a szelektív felhalmozódás révén egyrészt nagyobb hatást vált ki, mint az oligomerhez nem kötött vegyület, másrészt a nem kóros sejtek kevésbé károsodnak.

A módszer elvét a 3. ábra mutatja citosztatikus hatású prodrugokra alkalmazva.

#### Telomeráz-FdU konjugátumok tumorelles hatása

Az ADPT daganatterápiái lehetőségének bizonyítására első vegyületsoporként telomerázinhibitorokat választottunk. A telomeráz típusát tekint-

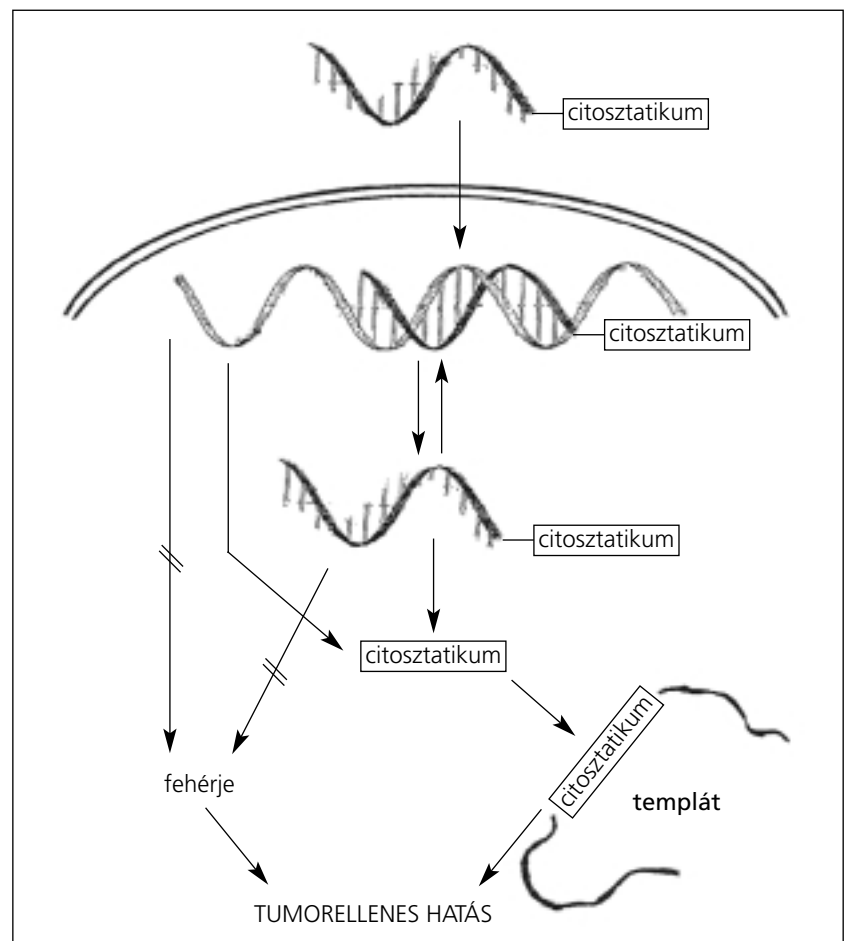
ve reverz transzkriptáz, a kromoszóma végén elhelyezkedő néhány ezer ismétlődő, humán kromoszómákban TTAGGG hexanukleotidból felépülő, speciális térszerkezetű oligonukleotid – telomer – szintézisét katalizálja. A telomerek az apoptózis bekövetkezéséig védik a kromoszómákat különböző hatásokkal szemben.

Az érett sejtekben a telomerázműködés megszűnik, utat engedve a sejt programozott lebontásának. A telomeráz által katalizált telomerszintézis Kim és munkatársa vizsgálatai szerint (9) a daganatsejtekben nem áll le, így azok korlátozás nélkül szaporodhatnak. Az elmúlt három évben több mint száz közlemény bizonyította, hogy a telomerázaktivitás és a daganatos folyamatok közötti korreláció igen szoros. A legjobb összefüggést emlő-, prosztatata- és tüdőcarcinoma esetén mutatták ki, de gyakorlatilag minden rosszindulatú sejt szaporodásra jellemző az aktív telomeráz

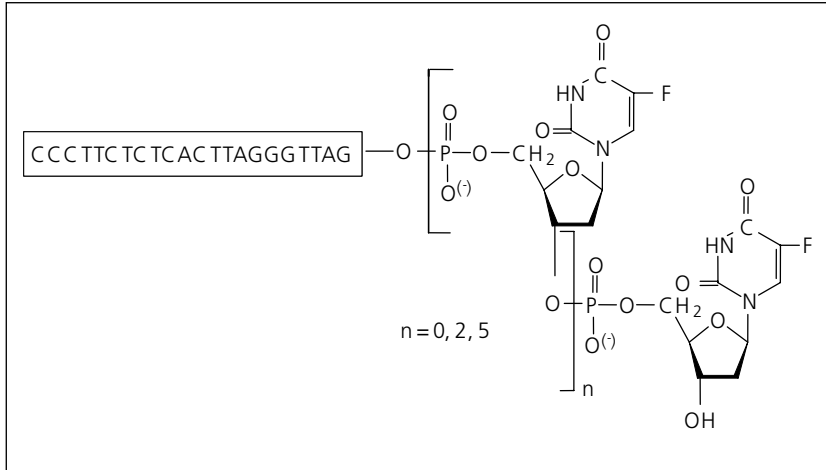
4. táblázat.  
Különbözően módosított MMP-9-inhibitor AON-ek kollagenázgátló hatása HT1080 sejtekben

Vegyületszám	AON szerkezeti jellemző	IC <sub>50</sub> µg/ml	µM
1	Módosítatlan	>75	>15
2	Hi-módosított	8,5	1,70
3	P-S-módosított	2,0	0,40
4	Hi- és P-S-módosított	0,18	0,035

3. ábra. Antiszensz-irányított prodrug-terápia (ADPT) elve citosztatikumokra specializálva (ADPT = antisense directed prodrug therapy)



4. ábra.  
Telomerázinhibitor  
AON-t és FdU  
egységeket tartalmazó  
oligonukleotid  
prodrugok



5. táblázat. Telomerázinhibitor 5 és FdU-3' konjugátumának FdU-hoz viszonyított antiproliferatív aktivitása HT1080 sejtvonalon

Vegyület	IC <sub>50</sub> (μM)	FdU-tartalom (%)	Relatív hatékonyság*
FdU	9,35	100	1
<u>5</u>	>40	-	-
<u>6</u>	0,69	3,0	13,5

\*IC<sub>50</sub> (FdU)/n x IC<sub>50</sub>(AON-(FdU)<sub>n</sub>)

6. táblázat. Telomerázinhibitor (5) konjugátumainak FdU-hoz viszonyított antiproliferatív aktivitása HT29 sejtvonalon

Vegyület	IC <sub>50</sub> (μM)	Relatív hatékonyság*
FdU	10,16	1
<u>6</u>	2,05	5,0
<u>7</u>	0,18	18,8
<u>8</u>	0,66	26,6

\*IC<sub>50</sub> (FdU)/n x IC<sub>50</sub>(AON-(FdU)<sub>n</sub>)

7. táblázat. Az FdU, az MMP-9 AON és az AON-(FdU)<sub>n</sub>-3' konjugátumok hatása a sejtproliferációra HT1080 fibrosarcoma sejtvonalon

Vegyület	IC <sub>50</sub> (μM)	Relatív hatékonyság*
FdU	9,35	1
<u>1</u>	>15,0	-
<u>9</u>	2,38	3,93
<u>10</u>	0,56	5,56
<u>11</u>	0,46	3,39

\*IC<sub>50</sub> (FdU)/n x IC<sub>50</sub>(AON-(FdU)<sub>n</sub>-3')

jelenléte. Ezt a felismerést használja a telomeráz-aktivitás meghatározásán alapuló daganatdiagnosztika (12).

A telomeráz tumorsejt-specifitása kiváló lehetőséget ad antiszensz irányított prodrugok tervezésére. A telomerázinhibitorok specifikusan felismerik a daganatsejtet, és lokálisan nagymérték-

ben megnövekedett relatív koncentrációt biztosítanak a hozzájuk kapcsolt citosztatikum számára.

A telomerázinhibitorok alkalmazása az ADPT-ben említett alapvető következményen kívül az alábbi előnyökkel is jár:

- A telomerázaktivitás és ennek gátlása az igen jól kidolgozott TRAP módszerrel (9) pontosan mérhető.
- Irodalmi adatok (5) és saját eredményeink bizonyították, hogy addig, amíg a telomerázműködés megfelelő inhibitor-koncentráció esetén 24 óra alatt teljesen megszűnik, az inhibitor gyakorlatilag nem okoz sejtproliferáció-gátlást. Ilyen hatás eléréséhez 10 napon túli idő szükséges. Ez azt jelenti, hogy a telomeráz nem zavarja a konjugátumból felszabaduló FdU citosztatikus hatásának a kiértékelését.

Az irodalom részletesen foglalkozik a telomerázban szereplő RNS-rész enzimaktivitás szempontjából legfontosabb régióinak felderítésével. Az összegzett eredmények alapján megállapítható, hogy a legaktívabb templátrész a humán telomeráz RNS 5' végéhez közeli 40-70 nukleotid egységben található. Erre alapozva állították elő (30) a 46-65 RNS-szekvenciával komplementer 5 oligonukleotidot (5' - CCCTTCTCACTTAGGGTTAG - 3'), mely módosítás nélkül is jelentős enziminhibíciót fejt ki.

Vizsgálatainkhoz az 5 oligomer olyan konjugátumait állítottuk elő, melyekben 5 minden internukleotid kötése tiofoszfát jellegű, és ehhez foszfátdiészter-kötéssel a 3' végén 1,3, ill. 6 FdU-t kapcsoltunk (6, 7, 8).

A tiofoszfát és az oligomert FdU-val összekapcsoló foszfodiészter-kötés hidrolízisebessége között kigyómerég PDE-vel és humán szérummal végzett hasítási kísérletek szerint több nagyságrend differencia van, így az FdU monofoszfát képződése, az oligonukleotid intakt jellegének megőrzése mellett biztosítható mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között.

Az FdU-nak a konjugátum citosztatikum egységeként való választását kiemelkedő daganatellenes tulajdonságán kívül indokolja, hogy

- a prodrugból az FdU 5'-monofoszfát képződése közben szabadul fel, ami a szabadon szervezetbe vitt FdU hatásához is elengedhetetlenül szükséges metabolit, és ehhez ebben az esetben timidinkináz sem szükséges;
- az FdU 3'- és 5'-OH csoportjai közötti foszfátdiészter-kötés kiépítésével több FdU is kapcsolható egyetlen antiszensz oligonukleotidhoz.

A telomeráz-(FdU)<sub>n</sub> konjugátumok sematikus szerkezeti felépítését a 4. ábra mutatja.

A proliferációgátlási vizsgálatok egyrészt HT1080 humán fibrosarcoma, másrészt HT29 humán colon adenocarcinoma sejtekkel történtek. Az eredményeket az 5. és 6. táblázat tartalmazza.

A táblázatok adatai jól demonstrálják, hogy az antiszensz oligonukleotidhoz való kötés nagymértékben megnöveli az FdU hatékonyságát. (A több FdU-t tartalmazó konjugátumok esetén az adatok számolás alapján egyetlen FdU egység hatásereőség-változását mutatják.) Az eredmények az anti-

szensz-irányított prodrug-koncepció helyességét teljes mértékben igazolják. A hatáserősség változása olyan jelentős, hogy amennyiben az *in vitro* eredményeket *in vivo* kísérletek is alátámasztják, a telomerázinhibitor-FdU konjugátumok gyógyszerfejlesztése kifejezetten indokolt lesz.

Az ADPT elv érvényességének alátámasztására az FdU-t a korábbiakban említett kollagenázinhibitor oligonukleotidhoz (1 vegyület) kapcsoltuk a 3' végen foszfordiészter-kötéssel (9, 10, 11 vegyületek). A sejtproliferációs kísérletek eredményeit a 7. táblázat foglalja össze. A 3-FdU egységet tartalmazó konjugátum (10) FdU-ra vonatkoztatott hatékonysága ebben az esetben is meghaladta a fél nagyságrendet, de a többiek (9, 11) esetén is legalább háromszoros.

Az FdU-ra vonatkoztatott relatív hatékonyságnövelés a vizsgálat eredményei szerint tág határok között változik. Ennek számos oka lehetséges. A hatékonyság mindenképpen függ a bioaktivációt kiváltó nukleázok aktivitásától, az exo- és endonukleázok arányától. Jelentős effektus, hogy a 3. ábrán feltüntetett citosztatikum-felszabadulás az RNS-inhibitor duplexből, vagy a vele egyensúlyban levő oligonukleotid prodrugból történik-e. Igen erősen befolyásolja az FdU-5'-foszfát keletkezését modellkísérletek alapján (13) az a szerkezeti tulajdonság, hogy az FdU milyen szekvenciájú oligonukleotidhoz kötött. Utóbbi hozzájárulhat a telomeráz és az MMP-9-inhibitor konjugátumból felszabaduló citosztatikum aktivitáskülönbségéhez.

Megjegyezzük, hogy bár az FdU-t tartalmazó oligonukleotid prodrugok a tárgyalt eredmények alapján önmagukban is lehetőséget adnak új, hatékony citosztatikumok kifejlesztésére, az ADPT alkalmazhatósága sokkal szélesebb körű. A különböző antiszensz ODN-ek és a velük konjugálható eltérő szerkezetű citosztatikumok igen nagyszámú vegyület előállítását teszik lehetővé. A módszer az antiszensz gyógyszerfejlesztési stratégia új irányát jelöli ki.

## Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki Jeney Andrásnak és munkatársainak a sejtproliferációs kísérletek elvégzéséért és az eredmények értékeléséért. A kísérleteket az OTKA T032620 pályázat támogatta.

## Irodalomjegyzék

1. Delong RK, Miller PS. Inhibition of human collagenase activity by antisense oligonucleoside methylphosphonates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:273-280, 1996
2. Fidler IJ, Kuniyasu H, Greene GF, et al. Molecular diagnosis to predict the metastatic potential of human prostate cancer. *Prog Anti-Cancer Chem* 4:153-161, 2000
3. Glukhov AI, Zimnik OV, Gordeev SA, et al. Inhibition of telomerase activity of melanoma cells *in vitro* by antisense oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 248:368-371, 1998
4. Gura T. Antisense has growing pains. *Science* 270: 575-577, 1995
5. Herbert BS, Pitts AE, Baker SI, et al. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14276-14281, 1999
6. Hogrefe RI. An antisense oligonucleotide primer. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9:351-357, 1999
7. Jeney A, Barrie SE, Taylor GA, et al. 5-Ethyl-2'-deoxyuridine: an explanation for its lack of cytotoxic action *in vivo*. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22:557-562, 1986
8. Jeney A, Kopper L, Hidvégi E, et al. Pharmacobiochemical properties of 5-alkyl-deoxyuridines. Effects of 5-hexyl-2'-deoxyuridine on tumor growth and glycoconjugate synthesis. *Int J Exp Clin Chem* 4:104-111, 1991
9. Kim NW, Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucl Acids Res* 25:2595-2597, 1997
10. Knox RJ, Connors TA. Prodrugs in cancer chemotherapy. *Pathol Oncol Res* 3:309-324, 1997
11. Liotta L, Steeg P, Stetler-Stevenson W. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64:327-336, 1991
12. McKenzie KE, Umbricht CB, Sukumar S. Applications of telomerase research in the fight against cancer. *Mol Med Today* 5:114-122, 1999
13. Ötvös L, Bajor Z, Kraicsovits F, et al. Synthesis and enzymatic characterization of P1-thio-P2-oxo trideoxynucleoside diphosphates having AZT, FdU, or dT at the 3'-position. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 21:79-92, 2002
14. Ötvös L, Sági J, Kovács T, et al. Substrate specificity of DNA polymerases I. Enzyme-catalysed incorporation of 5-(1-alkenyl)-2'-deoxyuridines into DNA. *Nucleic Acids Res* 15:1763-1777, 1987
15. Ötvös L, Sági J, Sági G, et al. Base modified oligodeoxynucleotides. II. Increase of stability to nucleases by 5-alkyl-, 5-(1-alkenyl)- and 5-(1-alkynyl)-pyrimidines. *Nucleosides Nucleotides* 18:1929-1933, 1999
16. Ötvös L, Sági J, Sági G, et al. Enzymatic hydrolysis and biological activity of oligonucleotides containing 5-substituted pyrimidine bases. *Nucleosides Nucleotides* 18:1665-1666, 1999
17. Ötvös L, Szabolcs A, Sági J, et al. Study of the synthesis of 5-alkyl and 5-halogen substituted 2'-deoxyuridines. *Nucleic Acids Res* 1:49-52, 1975
18. Ötvös L, Tüdös H. A Hevizos hatásának molekulárfarmakológiai alapjai. *Acta Pharm Hung* 63:237-242, 1993
19. Ötvös L. Nucleosides and nucleotides containing 5-alkyl pyrimidines. In: *Carbohydrate Mimics*. Ed. Chapleur Y, Wiley-VHC Press, New York 1998, pp 537-552
20. Ötvös L. Nukleinsav támadáspontú gyógyszerek. *Magyar Tudomány* 48:593-606, 2003
21. Sági J, Ötvös L. Modified polynucleotides. V. Slow-down of nuclease action by 5-alkyluracil-containing DNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 95:156-162, 1980
22. Sági J, Szabolcs A, Szemző A, et al. Modified polynucleotides I. Investigation of the enzymatic polymerization of 5-alkyl-dUTP-s. *Nucl Acid Res* 4:2767-2777, 1977
23. Sági J, Szemző A, Ébinger K, et al. Base-modified oligodeoxynucleotides. I. Effect of 5-alkyl, 5-(1-alkenyl) and 5-(1-alkynyl) substitution of the pyrimidines on duplex stability and hydrophobicity. *Tetrahedron Lett* 34:2191-2194, 1993
24. Schutz A, Schneidenbach D, Aust G, et al. Differential expression and activity status of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in tumor and stromal cells of squamous cell carcinomas of the lung. *Tumour Biol* 23:179-184, 2002
25. Sioud M. Therapeutic siRNAs. *Trends Pharmacol Sci* 25:22-28, 2004
26. Stein CA. Does antisense exist? *Nat Med* 1:1119-1120, 1995
27. Stephenson ML, Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:285-288, 1978
28. Szabolcs A, Sági J, Ötvös L. Synthesis of 5-alkyl-2'-deoxyuridines. *J Carbohydr Nucleos Nucleot* 2:197-211, 1975
29. Uhlmann E, Hornung L, Hein S, et al. Enhanced biological activity of antisense oligonucleotides containing 5-(1-hexynyl)-substituted pyrimidine nucleotides. *Nucleosides Nucleotides* 16:1717-1720, 1997
30. Valkó K, Fellegvári I, Sági J, et al. Correlation of nucleotide incorporation rate and HPLC retention parameters of substituted nucleosides. *J Liq Chromatogr* 12:2103-2116, 1989
31. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:280-284, 1978