ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ – ПРИНЦИПИАЛЬНО НОВЫЙ КЛАСС БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ

Д. Б. Утешев[1], С. А. Коростелев[2], А. В. Сергеев[2], Б. С. Утешев[1]

В обзоре литературы рассмотрена биологическая активность антисмысловых олигонуклеотидов. Основной упор сделан на испытании олигонуклеотидов в качестве противоопухолевых и антиастматических препаратов. Подчеркивается принципиальная новизна данного класса веществ.

Ключевые слова: антисмысловые олигонуклеотиды, химиотерапия опухолей, антиастматические средства

Антисмысловые олигонуклеотиды были предложены как лекарственные препараты для специфической генотерапии. Они представляют собой синтетические полимеры, содержащие в среднем около 20 нуклеотидов [1]. Отличительной особенностью антисмысловых олигонуклеотидов является структурная комплементарность молекулам РНК. За счет образования парных соединений с комплементарными основаниями природных РНК олигонуклеотиды нарушают функции последних. Чаще всего мишенью антисмысловых нуклеотидов являются информационная РНК, поэтому экспрессия соответствующих генов тормозится на постранскрипционном уровне. При этом нарушается процессинг мРНК, транспорт мРНК и трансляция. Теломеразные РНК, которые являются матрицей для обратной транскрипции и синтеза ДНК на концах хромосом, также могут быть мишенью для антисмысловых олигонуклеотидов [2]. Под влиянием олигонуклеотидов происходит или индукция РНКазы Н — фермента, гидролизующего РНК в составе ДНК — РНК комплекса или блокада связывания РНК с другими молекулами за счет стерических препятствий. Кроме того, у высоко организованных организмов имеется РНКаза L-эндонуклеаза, которая активируется 2′,5′-олигоаденилатами [3]. Последние связываются антисмысловыми олигонуклеотидами, в результате чего становится возможным деструкция РНК под воздействием РНКазы L [4 – 6]. Имеется также возможность образования комплекса олигонуклеотидов с двуспиральной ДНК и образование тройной спирали. Вследствие этого нарушается экспрессия генов [7].

Большинство работ с использованием антисмысловой биотехнологии выполнена с помощью фосфортиоатных олигонуклеотидов [8] (рисунок). Эти аналоги имеют замещение атома кислорода на серу фосфодиэфирным остовом молекулы. Это замещение делает олигонуклеотиды устойчивыми к нуклеазам. Однако олигонуклеотиды сохраняют способность к неспецифическому взаимодействию с белками [9]. Очевидно, этим объясняется их довольно значительная токсичность.

В последние годы для повышения стабильности, увеличения селективности и биологической активности, а также для снижения активности были предложены новые подходы в синтезе олигонуклеотидов. Модификация сахаристой части молекулы во 2’-положении и/или фосфоэфирного остова позволила получить антисмысловые олигонуклеотиды, которые образуют стабильный дуплекс с РНК. Так, показано, что 2’-0-метилрибонуклеозидные олигонуклеотиды имеют большой аффинитет к РНК и проявляют меньше побочных эффектов, чем фосфортиоатные олигонуклеотиды [10]. Представляют из себя перспективными N3′O5′-фосфорамидатные аналоги олигонуклеотидов. Они являются устойчивыми к нуклеазам и действуют, по-видимому, как антисмысловые молекулы. Другие варианты модификации олигонуклеотидов приведены на рисунке.

Как уже отмечалось, основной мишенью антисмысловых олигонуклеотидов являются иРНК. По-видимому, нет никаких принципиальных запретов для синтеза индивидуальных олигонуклеотидов ко всем разновидностям мРКН, а следовательно, для создания лекарственных препаратов, пригодных для лечения различных заболеваний. В табл. 1 приведен список некоторых заболеваний и соответствующих генов-мишеней, на которых испытаны антисмысловые олигонуклеотиды. Наиболее интенсивно исследования ведутся в области онкологии (табл. 2).

Другое направление в олигонуклеотидной технологии — это разработка антисмысловых олигонуклеотидов, предназначенных для лечения бронхиальной астмы. Бронхиальная астма, очевидно, представляет собой полигенное заболевание. В силу этого генная терапия этой патологии практически невозможна. Однако большие перспективы имеет эпигенетическая терапия, под которой подразумевается модуляция экспрессии генов, а не манипулирование генами как таковыми. Антисмысловая терапия является примером такой эпигенетической терапии бронхиальной астмы.

[1] Кафедра фармакологии (зав. — проф. Б. С. Утешев) Российского государственного медицинского университета, Москва, 117869, ул. Островитянова, 1.
[2] РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, 115478, Каширское шоссе, 24.

© 2004 Коллектив авторов

Другими причинами, побудившими интенсивное развитие олигонуклеотидной технологии бронхиальной астмы, являются отсутствие необходимых препаратов.

Наиболее эффективными препаратами для лечения бронхиальной астмы в настоящее время являются глюкокортикоиды. С их помощью удается контролировать практически все случаи заболевания. Однако у этой группы антиастматических средств имеются два существенных недостатка. Во-первых, даже при местном ингаляционном использовании, не говоря уже о системном применении, им свойственны побочные эффекты: развитие катаракты, гипергликемия, остеопороз, задержка роста, ожирение и др. Во-вторых, глюкокортикоиды хотя и супрессируют синтез интерейкинов Т × 2 — профиля, однако они не стимулируют продукцию цитокинов Т × 1 ряда. Другими словами, в процессе лечения глюкокортикоидами не происходит смещения нарушенного равновесия иммунной системы в сторону Т × 1. Поэтому после отмены препаратов в течение некоторого времени вновь развивается поляризация иммунной реактивности в направлении Т × 2, и бронхиальная астма рецидивирует.

Таким образом, глюкокортикоиды, несмотря на высокую эффективность, отнюдь не являются идеальными препаратами. В связи с этим идут постоянные разработки новых антиастматических средств. Принципиально новой группой препаратов являются олигонуклеотиды.

Сущность антисмысловой технологии состоит в том, что в качестве лекарственного препарата используется короткий, синтетический, односпиральной ДНК или РНК олигонуклеотид, который имеет специфическую для определенного гена нуклеотидную последовательность. В результате взаимодействия антисмыслового олигонуклеотида с комплементарным участком происходит нарушение экспрессии данного гена. Конкретной причиной торможения экспрессии гена является либо нарушение рибосомального считывания информации, либо активация РНКазы Н, эндогенного фермента, который селективно деградирует иРНК. Антисмысловая терапия имеет по крайней мере на один порядок более высокую специфичность по сравнению с традиционными препаратами [30]. Длительное время основным сдерживающим фактором в разработке антисмысловых олигонуклеотидов, а, следовательно, и терапии заболеваний являлась трудоемкость и дороговизна синтеза олигонуклеотидов. В настоящее время эта проблема решена и развертываются масштабные разработки таких препаратов. Некоторые олигонуклеотиды проходят уже 3 фазу клинических испытаний [30]. Какие же преимущества имеет олигонуклеотидная технология перед традиционными антиастматическими препаратами?

1. Мишенью препарата является только мРНК.
2. Олигонуклеотиды являются более эффективными.
3. Высокая специфичность.
4. Уникальная избирательность действия.
5. Большая активность (олигонуклеотиды действуют в малых, а следовательно, в безопасных дозах).
6. Применительно к бронхиальной астме возможность ингаляционного применения.

Мишенью антисмысловой технологии могут являться любые медиаторы, любые рецепторы, цитокины, хемокины, адгезивные молекулы, ферменты, транскрипционные факторы, вторичные посредники и вообще любая макромолекула. Для лечения бронхиальной астмы созданы антимысловые олигонуклеотиды для IgE, CCR3, GATA 3, NF-Kb, I1-4, IL-5, Syk протеин киназы. Далее коротко рассмотрим полученный на сегодняшний день материал по активности антисмыловых нуклеотидов.

H. Kim и соавт. [31] использовали на сенсибилизированных мышах антисмысловые олигонуклеотиды к FceRIa и получили почти полное торможение аллергических реакций, опосредуемых IgE.

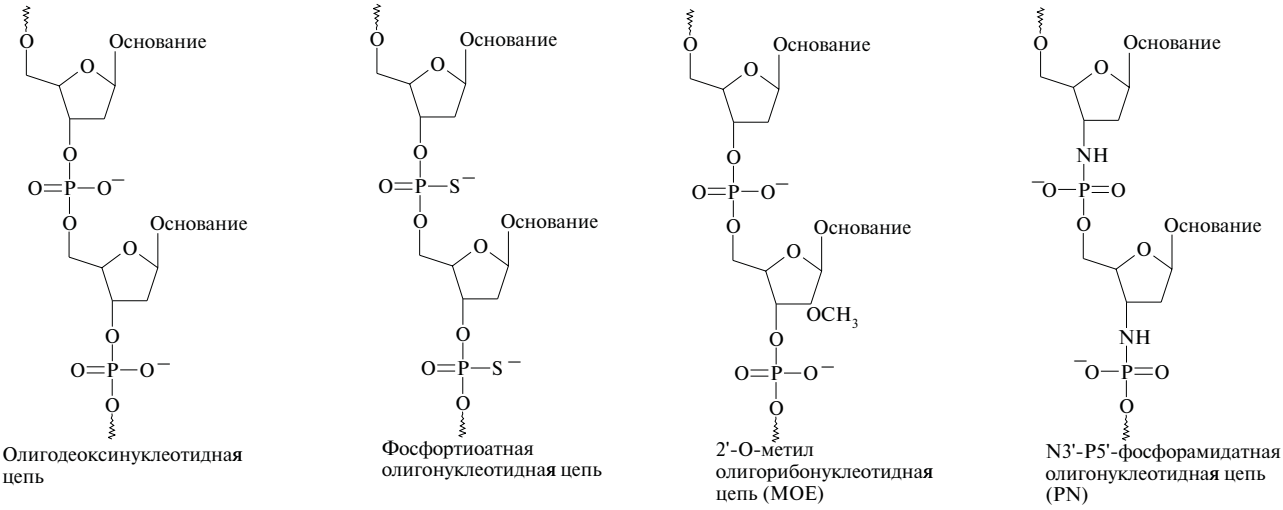
В работах J. M. Nuce и W. S. Metzger [32, 33] описано применение антисмысловых олигонуклеотидов для воз-

Таблица 1. **Некоторые заболевания, при которых испытаны антисмысловые олигонуклеотиды**

Заболевание	Ген-мишень	Литература
Болезнь Крона	ICAM-1	[11]
Воспаление	Киназа, ассоциированная с рецептором к интерлейкину-1	[12]
Эпилепсия	Глутаматные рецепторы	[13]
Гипертензия	Рецепторы к ангиотензину-1	[14]
Гиперплазия интимы	PDGF-рецепторы	[15]
Гиперплазия неоинтимы	Cdc-2 киназа	[16]
Аутологичная и аллогенная трансплантация	VLA-4	[17]
Трансплантация сердца	C-raf	[18]
Бета-таласемия	Ген бета-глобина	[19]
Гепатит	fas	[20]

Таблица 2. **Некоторые виды опухолей, на которых исследованы антисмысловые олигонуклеотиды**

Тип опухоли	Ген-мишень	Литература
Гепатоцеллюлярная карцинома	Ras	[21]
Рак грудной железы	Протеин киназа А	[22, 23, 24]
Рак толстой кишки	Протеин киназа А	[24, 25]
Рак легкого	Протеин киназа А	[24]
Рак простаты	Рецептор к андрогенам	[26]
Мелко клеточная карцинома легких	c-muc	[27]
Лейкоз	c-muc	[28]
Рак простаты	Рецептор к андрогенам	[26]
Рак простаты	c-muc	[27]
Мелко клеточная карцинома легких	c-muc	[28]
Лейкоз	c-muc	[7]
Рак простаты	Теломераза	[5]
Рак яичника	Теломераза	[6]
Лейкоз	Дигидрофолат редуктоза	[29]



Антисмысловые олигонуклеотидные аналоги, используемые для создания препаратов

действия на продукцию аденозиновых рецепторов. А двукратное ингаляционное введение олигонуклеотида сенсибилизированным кроликам полностью предупреждало реакцию на аденозин, устраняло ранний бронхоспазм на аллерген и снижало чувствительность к гистамину. Продолжительность действия олигонуклеотидов от 6,83 дня до 10 сут.

Антисмысловые олигонуклеотиды к цитокинам IL-4 и IL-5 S. Molet и соавт. [35] применяли для обработки CD4 + Т-клеток крыс в системе сингенного переноса. Обработка донорских лимфоцитов в течение 48 часов перед переносом их реципиентам анти-IL-4 олигонуклеотидами приводила к устранению поздней реакции на аллерген, к значительному торможению экспрессии IL-4 и IL-5 у реципиента и к снижению эозинофилии в легких у крыс-реципиентов. Если перед переносом CD4 + Т-лимфоциты обрабатывали анти-IL-5 олигонуклеотидами, что наблюдалось лишь небольшое снижение уровня IL-5 в лаважной жидкости реципиентов.

Однако в другой работе, с анти-IL-5-антисмысловым олигонуклеотидом, выполненной, правда, на мышах, было получено значительное и длящееся 17 дней торможение легочной эозинофилии, и поздней бронхоконстрикторной реакции на аллергенную провозацию. Эти эффекты развились на фоне полного торможения синтеза IL-5 [36].

В экспериментах G. R. Stenton и соавт. [37] антисмысловые олигонуклеотиды были использованы в виде аэрозоля для супрессии Suk протеин тирозин киназы альвеолярных макрофагов, стимулированных IgG анти-IgG комплексом. Было обнаружено, что после обработки олигонуклеотидами продукция TNF-α и окиси азота макрофагами резко снижается, в то время как синтез IL-1b не нарушался. 2 типа фосфорамидатных антисмысловых олигонуклеотидов были синтезированы для супрессии NF-kB. В исследованиях L. Wang и соавт. [38] эти олигонуклеотиды использовались для торможения *in vivo* синтеза IL-6 у мышей, стимулированных LPS. В другой работе [39] олигонуклодиды были применены в культуре эндотелиальных клеток для блокады экспрессии ICAM-1.

В заключение следует отметить, что антисмысловые олигонуклеотиды в настоящее время уже проходят различные фазы клинических испытаний. В аллергологии они нашли применение для анализа клеточных популяций. В этом отношении олигонуклеотиды имеют ряд преимуществ даже перед такими высоко специфичными агентами, как моноклониальные антитела.

Для изучения патофизиологии клеток антисмысловые олигонуклеотиды имеют ряд преимуществ и перед такой экспериментальной моделью, как нокаутирование генов.

ЛИТЕРАТУРА

1. B. Kuss and F. Cotter, *Ann. Oncol.*, **10**, 495 – 502 (1999).
2. L. R. Kelland, *Anticancer. Drugs*, **11**(7), 503 – 513 (2002).
3. A. B. Zhou, A. Hasse, and R. H. Silverman, *Cell*, **72**(5), 753 – 765 (1993).
4. S. Mukai, Y. Kondo, S. Koga, T., et al., *Cancer Res.*, **60**(16), 4461 – 4467 (2000).
5. Y. Kondo, S. Koga, T. Komata and S. Kondo, *Oncogene.*, **19**(18), 2205 – 2211 (2000).
6. D. M. Kushner, J. M. Paranjape, B. Bandyopadhyay, et al., *Gynecol. Oncol.*, **76**(2), 183 – 192 (2000).
7. C. V. Catapano, E. M. McGuffie, D. Pacheco, and G. M. Carbone, *Biochemistry*, **39**(17), 5126 – 5138 (2000).
8. S. Agrawal, and E. R. Kandimalla, *Mol. Med. Today*, **6**(2), 72 – 81 (2000).
9. L. Brukner and G. A. Tremblay, *Biochemistry*, **39**(37), 11463 – 11466 (2000).
10. S. Agrawal, Z. Jiang, Q. Zhao, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(6), 2620 – 2625 (1997).
11. U. Steidl, R. Haas, and R. Kronenwett, *Ann. Hematol.*, **79**(8), 414 – 423 (2000).
12. F. Guo, and S. Wu, *Immunopharmacology*, **49**(3), 241 – 246 (2000).
13. R. S. Greenwood, Z. Fan, R. McHugh and R. Mekker, *Mol. Cell. Neurosci.*, **16**(3), 233 – 243 (2000).
14. M. I. Phillips, S. M. Galli, and J. L. Mehta, *Drugs*, **60**(2), 239 – 248 (2000).
15. N. Noiseux, C. H. Boucher, R. Cartier, and M. G. Sirois, *Circulation*, **102**(1), 1330 – 1336 (2000).

16. R. Morishita, G. H. Gibbons, K. E. Ellison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **190**(18), 8474 – 8478 (1993).
17. R. Kronenwett, S. Martin, and R. Haas, *Stem. Cells.*, **18**(5), 320 – 330 (2000).
18. S. M. Stepkowski, X. Qu, M. E. Wang, et al., *Transplantation*, **70**(4), 656 – 661 (2000).
19. H. Shirohzu, H. Yamaza, and Y. Fukumaki, *Int. J. Hematol.*, **72**(1), 28 – 33 (2000).
20. H. Zhang, J. Cook, J. Nickel, et al., *Nat. Biotechnol.*, **18**(8), 862 – 867 (2000).
21. Y. Liao, Z. Y. Tang, S. L. Ye, et al., *Ytpatogastroenterology*, **47**(32), 365 – 370.
22. K. Ru, S. Schmitt, W. I. James, and J. H. Wang, *Oncol. Res.*, **11**(11 – 12), 505 – 512 (1999).
23. F. Ciardiello, R. Caputo, G. Pomatico, et al., *Int. J. Cancer*, **85**(5), 710 – 715 (2000).
24. H. Wang, Q. Cai, X. Zeng, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**(24), 13989 – 13994 (1999).
25. G. Tortora, R. Bianco, V. Damiano, et al., *Clin. Cancer Res.*, **6**(6), 2506 – 2512 (2000).
26. I. E. Eder, Z. Culig, R. Ramoner, et al., *Cancer Gene. Ther.*, **7**(7), 997 – 1007 (2000).
27. L. C. Boffa, S. Scarfi, M. R. Mariani, et al., *Cancer Res.*, **60**(8), 2258 – 2262 (2000).
28. K. Akie, H. Dosaka-Akita, An Murakami, and Y. Kawakami, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **10**(4), 243 – 249 (2000).
29. M. Morganti, M. Coronnello, B. Caciagli, et al., *Anticancer drugs*, **11**(94), 285 – 294 (2000).
30. S. Akhtar, S. Agrawal, *Trend Pharmacol. Sci.*, **18**, 12 – 8 (1997).
31. H. Kim, K. Kim, E. Lee, *Immunology*, **93**, 589 – 594 (1998).
32. J. W. Nyce, W. S. Metzger, *Nature*, **385**, 721 – 725 (1997).
33. J. W. Nyce, *Trend Pharmacol. Sci*, **37**, 67 – 81 (1999).
34. W. J. Metzger, J. W. Nyce, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **104**, 260 – 266 (1999).
35. S. Molet, D. Ramos-Barbon, S. G. Matin, and Q. Hamid, *J. Allergy Clin. Immunology*, **104**, 205 – 214 (1999).
36. J. G. Karras, R. McGraw, R. A. McKay, et al., *J. Immunology*, **164**, 5409 – 5415 (2000).
37. G. R. Stenton, M. K. Kim, O. Nohara, et al., *J. Immunology*, **164**, 3790 – 3797 (2000).
38. L. Wang, S. Gryaznov, M. Nezemberg, *Inflammation*, **23**, 583 – 590 (1999).
39. F. Guo, Y. Li, and S. Wu, *Inflammation*, **23**, 535 – 540 (1999).

Поступила 03.03.03

ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW CLASS OF BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULES

D. B. Uteshev[1], S. A. Korostelev[2], A. V. Sergeev[1], and B. S. Uteshev[1]

[1] Department of Pharmacology, State Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117869 Russia
[2] Blokhin Oncological Research Center, Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115478 Russia

Data available in literature on the biological activity of antisense oligonucleotides are reviewed with emphasis on the results of tests of the related antitumor and antiasthmatic preparations and the basic novelty of these drugs.