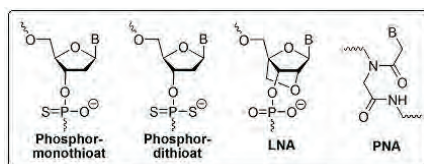


Naturen prøver at fortælle dig noget

Analysér altid dine fejlslagne eksperimenter! Nogle af de største opdagelser i naturvidenskab var tilfældige opdagelser gjort af den opmærksomme forsker. Stop, træk vejret og tænk næste gang dit kontroleksperiment ikke arter sig

Af Daniel Sejer Pedersen, Senior Post Doc ved University of Adelaide, Department of Chemistry. E-mail: daniel.pedersen@adelaide.edu.au

Danmark har gennem årene markeret sig stærkt internationalt indenfor nukleinsyre-kemi, i særdeleshed indenfor oligonukleotider til brug som antisense-lægemidler.¹ Tankerne falder umiddelbart på Otto Dahl's² forskning med phosphormono- og dithioater, Ole Buchardt³ og Peter Nielsen⁴ for opdagelsen af Peptide Nucleic Acid (PNA)⁵ og ikke mindst Jesper Wengel⁶ for Locked Nucleic Acid (LNA).⁷ (Figur 1)



Figur 1.

PNA og LNA har i særdeleshed profileret Danmark stærkt, da disse to nukleotidanaloger har enestående kemiske og biologiske egenskaber. Både PNA og LNA har ledt til dannelsen af biotek-virksomheder,⁸ der forsøger at kommercialisere teknologien. Personligt startede jeg min karriere som nukleotidkemiker ved Københavns Universitet og arbejdede i en periode i biotekselskabet Cureon A/S⁹ med LNA oligonukleotider. Det forskningsområde ligger stadig mit hjerte nær, og derfor har jeg gennem årene prøvet at følge med i udviklingen indenfor nukleotid-analoger og antisense-lægemidler. Det fangede derfor min interesse da Kleinman *et al.*¹⁰ for nylig publicerede en artikel omhandlende siRNA og gene silencing, som er et nært beslægtet forskningsområde. Men først lidt baggrundsinformation.

Antisense anstrengelser

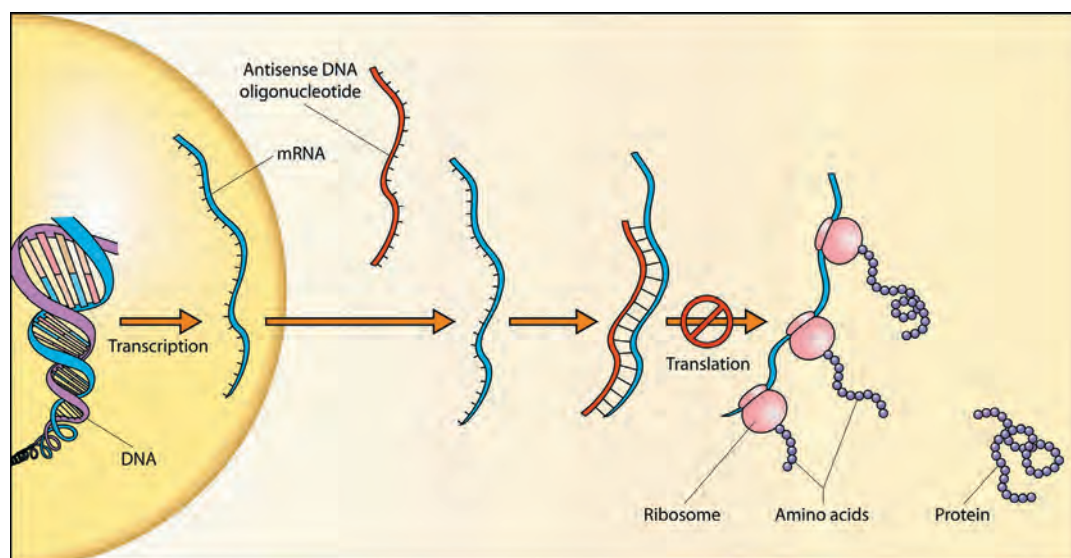
Antisense-teknologien adskiller sig fra traditionel lægemiddelforskning, der fokuserer på interaktion med proteiner, ved at man i stedet designer lægemidler til at inhibere translationen af eller nedbryde messenger RNA (mRNA). Grundlæggende forsøger man at stoppe

syntesen af uønskede proteiner ved at forhindre translation af mRNA (Figur 1). Umiddelbart er dette en rigtig god og elegant ide, men der er en række problemer med denne teknologi *in vivo*.

To af de største problemer er stabilitet af oligonukleotiderne *in vivo* og transport af oligonukleotiderne gennem cellemembranen. Arbejdet med kommercielt at udvikle antisense-lægemidler har stået på siden 80'erne, men efter min bedste viden er det til dato kun lykkedes Isis Pharmaceuticals¹¹ at udvikle og markedsføre et antisense lægemiddel, som hedder VitraveneTM. VitraveneTM¹² benyttes til behandling af Cytomegalovirus retinitis¹³ infektioner, som er en DNA virus der beskadiger øjets nethinde og i værste fald fører til blindhed. VitraveneTM er dog ikke en særlig overbevisende demonstration af antisenseteknologi som behandlingsform, eftersom lægemidlet skal injiceres direkte i øjet. Dermed undgås det meste af kroppens stofskifte, såsom fordøjelsessystemet, leveren, blodet osv. Ydermere, repræsenterer øjne relativt set et fredeligt enzymatisk miljø sammenlignet med resten af kroppen.

Sluk for generne

Mens forskere og virksomheder forsøger at realisere antisense-drømmen har et nyt koncept, kendt som gene silencing,¹⁴ baseret på siRNA (small interfering RNA), trådt ind i rampelyset.



Figur 2. Simplificeret illustration af proteinsyntese og antisense.

Gene silencing blev i sin tid opdaget ved et tilfælde. Et forsøg på at lave en mere violet petunie ved at indsætte et ekstra gen, der koder for petuniens naturlige farve, resulterede overraskende i at nogle af petunierne blev hvide!

Meget simplificeret fungerer gene silencing ved at små dobbeltstrengede RNA molekyler (20-30 nukleobaser i længde) forhindrer matchende mRNA sekvenser i at blive translateret, hvilket i sidste ende resulterer i at det kodende gen »slukkes«. En række selskaber verden over forsøger at udvikle lægemidler baseret på dette princip, og ligesom der var stor begejstring omkring antisense i 80'erne og 90'erne, er der nu stor begejstring omkring siRNA og gene silencing. Faktum er dog, at præcis de samme problemstillinger er gældende for gene silencing som for antisense, nemlig stabilitet *in vivo* og transport over cellemembranen.

Kontroleksperimenter

Artiklen som Kleinman *et al.*¹⁰ publicerede for nylig antyder dog, at gene silencing har større og mere fundamentale problemer som behandlingsform. Artiklen illustrerer hvor kompliceret det er at udvikle lægemidler, og hvor vigtigt det er at udføre gode kontroleksperimenter og så vidt muligt afklare lægemidlets biologiske mekanisme. I dette studie forsøgte forskerne at behandle sygdommen macular degeneration¹⁵ ved brug af siRNA. Macular degeneration medfører ukontrolleret dannelse af blodkar i øjet og kan resultere i blindhed. Udover at forhindre blindhed hos især ældre mennesker er macular degeneration et interessant mål for siRNA af to grunde.

For det første minder macular degeneration i høj grad om angiogenese (dannelse af blodkar i kræftsvulster).¹⁶ Med andre ord hvis det er muligt at forhindre macular degeneration, kan teknologien muligvis også anvendes til at forhindre angiogenese hos kræftpatienter.

For det andet er øjnene et fremragende mål for RNA og DNA baserede lægemidler, da man forbipasserer det meste af kroppens stofskifte. I den aktuelle artikel benyttede Kleinman *et al.* siRNA til gene silencing af vascular endothelial growth factor (VEGF)¹⁷ som er direkte involveret i angiogenese, og til deres store glæde virkede strategien over al forventning.

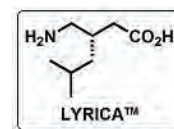
Det eneste der manglede for at runde historien af var et par kontroleksperimenter, og det er her korthuset ramler sammen. Det viste sig nemlig, at det var fuldstændig underordnet hvilken RNA-sekvens de brugte. Så længe RNA-sekvensen havde en længde på mindst 21 nukleobaser virkede den fremragende. Forsøg på gene silencing af gener, der ikke udtrykkes i øjet, brug af fuldstændig tilfældige siRNA sekvenser, siRNA sekvenser som skulle gøre sygdommen værre, mRNA sekvenser fra planter osv. virkede alle lige godt. Forskerne må have undret sig over hvad der foregik!

Selv injektion af siRNA'er direkte i fordøjelsessystemet fremfor i øjet havde den »ønskede effekt«. Forskerne måtte sande, at mekanismen umuligt kunne være gene silencing. Efter en omfattende og grundig analyse af resultaterne og en række yderligere eksperimenter stod det klart, at effekten skyldes RNA-molekylernes interaktion med en celleoverflade-receptor kaldet toll-like receptor 3 (TLR3). Denne interaktion resulterer i induktion af γ -interferon¹⁸ og interleukin 12,¹⁹ hvilket stopper dannelse af blodkar. Artiklen er fremragende (omend en anelse kompliceret for en simpel kemiker) og kan anbefales på det varmeste. Denne artikel illustrerer (ikke overraskende) at siRNA ikke er en mirakelkur men en yderst kompliceret affære. Aktivering af TLR3 kan muligvis benyttes som en generel behandling af angiogenese. Eller måske er interaktionen mellem TLR3 og siRNAs et stort problem, som det bliver svært at komme uden om, da man naturligvis ikke ønsker at aktivere TLR3 hver gang siRNA bruges i mennesker.

Held og lykke

Mange af de største opdagelser indenfor naturvidenskab bliver gjort ved et tilfælde. Den grundige og ambitiøse forsker analyserer altid sine fejlslagne eksperimenter og prøver at forstå hvad der skete. F.eks. blev gene silencing opdaget da en petunie blev hvid og ikke kraftigt violet, fordi forskerne analyserede deres data grundigt.

Min specialevejleder yndede at sige ”naturen prøver at fortælle dig noget”, når min kemi slog fejl, og det bør du måske også overveje, næste gang din reaktion ikke virker. Hav specifikke mål med din forskning, men hold øjne og ører åbne så du ikke overser »guldet« og smider det i B-Dunken. Tilfældighedernes videnskab har mange ansigter, hvilket illustreres af en fremragende artikel af Richard B. Silverman i *Ange-wandte Chemie*²⁰, som jeg vil anbefale til alle der kan lide en god kemisk historie eller beskæftiger sig med medicinsk kemi. Silverman beskriver den usædvanlige situation hvor et stof (Lyrica™, Figur 3) udviklet i en akademisk institution ender som et lægemiddel, faktisk som et blockbuster lægemiddel, hvilket vil sige at salget af overstiger 1 mia. US\$ om året.



Figur 3.

Det er fascinerende at læse Silverman's historie, der beskriver rationelt design af et lægemiddel, der senere viser sig at virke gennem en anden mekanisme end forventet, hvorefter det meget senere opdages at der i virkeligheden er tale om en helt tredje og radikalt anderledes biologisk mekanisme. En fascinerende beskrivelse fra syntesen af et potentielt lægemiddel ved et universitet i 1988 til markedsføringen i 2004 med alle de dertilhørende klinisk undersøgelser, mekanistiske overraskelser, fusionering af virksomheder etc.

Referencer:

- [1] http://en.wikipedia.org/wiki/Antisense_RNA
- [2] Lektor Otto Dahl, Kemisk Institut, Københavns Universitet. Pensioneret.
- [3] Professor Ole Buchardt, Kemisk Institut, Københavns Universitet. Afdød.
- [4] Professor Peter E. Nielsen, Institut for Cellulær og Molekylær Medicin, Københavns Universitet
- [5] http://en.wikipedia.org/wiki/Peptide_nucleic_acid
- [6] Professor Jesper Wengel, Institut for Fysik og Kemi, Syddansk Universitet
- [7] http://en.wikipedia.org/wiki/Locked_nucleic_acid
- [8] LNA diagnostisk: <http://www.exiqon.com/>, LNA og PNA baserede lægemidler: <http://www.santaris.com/>
- [9] Biotekselskaberne Cureon og Pantheco fusionerede i 2003 og skiftede navn til Santaris Pharma.
- [10] M. E. Kleinman *et al.*, Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3, *Nature*, 2008, web: [doi:10.1038/nature06765](https://doi.org/10.1038/nature06765)
- [11] <http://www.isispharm.com/>
- [12] <http://www.isispharm.com/vitravene.html> og <http://en.wikipedia.org/wiki/Fomivirsen>
- [13] http://en.wikipedia.org/wiki/Cytomegalovirus_retinitis
- [14] <http://en.wikipedia.org/wiki/RNAi>
- [15] http://en.wikipedia.org/wiki/Macular_degeneration
- [16] Angiogenese: accelereret dannelse af nye blodkar i kræftsvulster. <http://en.wikipedia.org/wiki/Angiogenesis>
- [17] http://en.wikipedia.org/wiki/Vascular_endothelial_growth_factor
- [18] <http://en.wikipedia.org/wiki/Interferon>
- [19] <http://en.wikipedia.org/wiki/IL-12>
- [20] R. B. Silverman, From basic science to blockbuster drug: the Discovery of Lyrica, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, 47, web: [doi:10.1002/anie.200704280](https://doi.org/10.1002/anie.200704280)