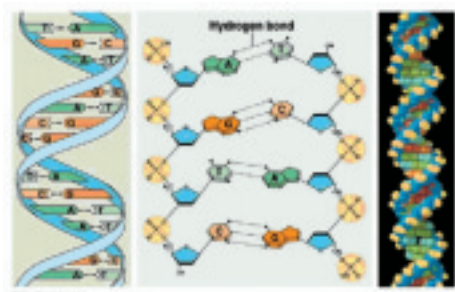


Dansk bioorganisk kemi central i udvikling af genmedicin

De seneste år er der opstået langt bedre mulighed for at udvikle specifikke og mere potente lægemidler, der specifikt kan inhibere udtrykket af muterede og sygdomsfremkaldende gener – også kaldet genmedicin

Af Troels Koch, Santaris Pharma A/S

I 1953 publicerede James Watson og Francis Crick to afhandlinger i Nature [1,2]. Den ene omhandlede strukturen af DNA og den anden dets biologiske virkemåde og strukturens funktion. Når man læser afhandlingerne, forbløffes man over, at stort set alt hvad de postulerede og formodede, i dag er fakta i biokemien. De viste, at DNA er dobbeltstrengt, og at hver streng er opbygget af nucleinsyreenheder, nucleotider (figur 1). Sukker- og fosfatdelen (»backbone«) opbygger kædestrukturen, og baserne sikrer bindingen (hybridiseringen) til de



Figur 1. DNA.

Figuren viser forskellige måder at illustrere strukturen af DNA på. Nucleotiderne er forkortet A, C, G og T, der står for deoxyadenosin, deoxycytidin, deoxyguanosin og deoxythymidin. I RNA er T erstattet med U, uridin. Nucleotiderne er benævnt efter de korresponderende heterocykliske baser: adenin, cytosin, guanin og thymin (uracil for RNA). Nucleotiderne består derudover af en sukkerdel, deoxyribose (DNA) og ribose (RNA) og af en fosfatgruppe.

komplementære baser på den modsatte streng (figur 1). Den molekylære enhed i DNA kaldes for et basepar, og da disse er forskudt ca. 35° ift. hinanden, danner DNA en helix. DNA er bærer af cellens genetiske information (figur 2, A). Den genetiske information overføres fra DNA til RNA, og RNA'et medierer syntesen af proteiner, der er cellens byggesten (enzym, receptorer, strukturelle proteiner, etc.). Alle celler indeholder den samme mængde DNA, men de vil, alt efter behov, kun udtrykke en del af DNA'et. På den måde produceres kun de nødvendige proteiner. Det betyder omvendt også, at opstår der ændringer i DNA'et, f.eks. mutationer, vil de resultere i muterede proteiner, der langt fra har de egenskaber, der er nødvendige for at opretholde cellens normalt tilstand.

Genregulering og kræft

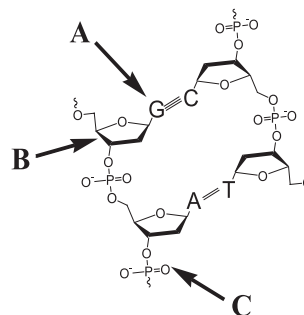
Den samlede mængde DNA i humane celler, genomet, består af ca. 3 mia. basepar. Når cellen deler sig, duplikeres DNA, så hver dattercelle får præcis samme mængde og basesekvens som modercellen. En sådan præcision er mulig, fordi de enzymer, der katalyserer syntesetrimene, er en del af et stort regulerende

og selvregulerende enzymkompleks, der ligger i konstant ligevægt mellem syntese og »proof-reading« af syntese-produkterne. Fejlsynteser vil i stor udstrækning blive korigeret via særskilte »repair«-enzymmer.

Men mange forskellige faktorer kan ændre på balancen. F.eks. er cancerceller karakteriseret ved, at der er sket store ændringer i genomet, hvorved den normale genregulering bringes i ubalance. Generelt tilegner cancerceller sig egenskaber, der ligger langt fra de normale og højt differentierede cellers profil. Cancerceller har et meget højt delingspotentiale og responderer typisk ikke på de signaler, der kontrollerer normale cellers vækst. Hvis disse egenskaber komplementeres med evnen til at sprede sig (metastasere), får man en biologisk profil, der kendetegner ondartede kræftformer [3].

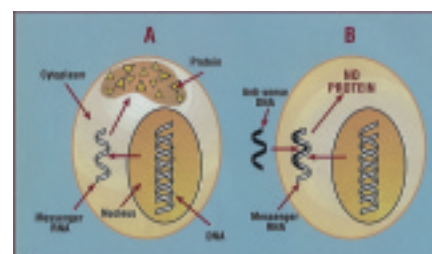
Hybridiseringsbaserede strategier - genmedicin

Med den hastigt stigende forståelse af de genetiske forandringer, der forårsager kræft, har man fået en langt bedre mulighed for at udvikle specifikke og mere potente lægemidler. Den oplagte strategi er naturligvis at udvikle lægemidler, der specifikt kan inhibere udtrykket af muterede og sygdomsfremkaldende gener. Fællesbetegnelsen for dette behandlingsprincip er genmedicin.



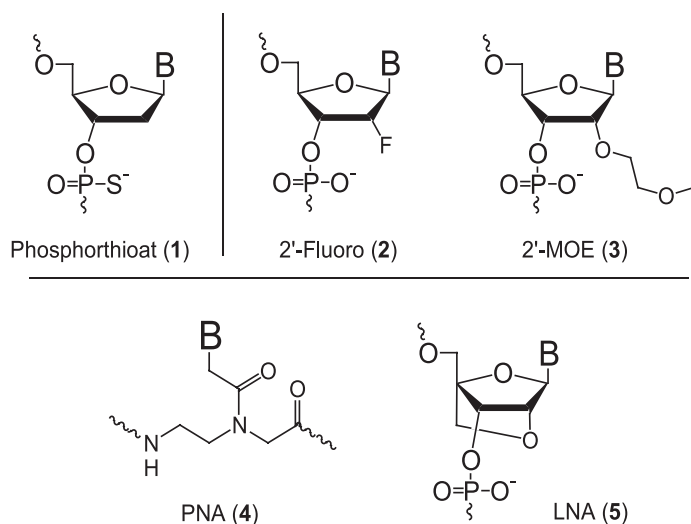
Figur 3. Den kemiske struktur af to basepar i DNA.

Pilene viser de kemiske grundstrukturer, der alle har været genstand for en stor grad af kemisk modificering: A, nucleobasen; B, deoxyribose; og C, fosfatdelen.



Figur 2. Det centrale dogme og antisense.

Ifølge det centrale dogme overføres den genetiske information fra DNA til mRNA, der medierer proteinsyntesen (A). Når celler behandles med komplementært oligonucleotid til en specifik mRNA-sekvens (B), vil antisense oligonucleotidet hybridisere til mRNA og inhibere syntesen af det korresponderende protein.



Figur 4. Den kemiske struktur af udvalgte nucleinsyreanaloger. 1, phosphorothioat; 2, 2'-fluoro-DNA; 3, 2'-MOE-DNA; 4, PNA; 5, LNA.

Watson & Crick var blandt de første, der viste, at nøglen til den molekylære genkendelse af DNA eller RNA (hybridiseringen) var meget enkel: G hybridiserer til C og A til T (U i RNA) (figur 1). Det enkle princip betyder, at hvis man ønsker at fremstille en komplementær streng til DNA/RNA, skal A erstattes med T (U for RNA), C erstattes med G og omvendt. På den måde kan det nye stof binde sig iht. »Watson & Crick«-hybridiseringen. Enkeltheden af dette molekylære genkendelsesprincip betyder, at det er meget let at designe nye korte DNA-stykker, kaldet oligonucleotider, der specifikt binder sig til forudbestemte steder på DNA eller RNA. De kemiske stoffer, som f.eks. oligonucleotider, der binder sig til nucleinsyrer og dermed interfererer med DNA/RNA og proteinsyntesen, har stort farmaceutisk potentiale.

Antisense – og nucleinsyremodifikationer

Den kodende streng i DNA (sense-strengen) er hybridiseret til den komplementære streng (antisense-strengen), og den er derfor ikke tilgængelig for almindelig Watson & Crick-hybridisering. I modsætning til DNA er RNA i overvejende grad enkeltstrengt. Det benyttede Zamecnik & Stephenson sig af i 1978, da de som de første syntetiserede et kort stykke DNA på 13 nucleotider, der var designet til at hybridisere til et forudbestemt stykke RNA fra Rous sarcoma virus [4]. De viste, at hybridiseringen effektivt blokerede for mRNA's evne til at udføre syntesen af det tilhørende protein og dermed inhiberede væksten af Rous sarcoma virus. Denne metode til at inhibere udtrykket af mRNA vha. små stykker syntetisk DNA blev senere kaldt for antisense (figur 2, B). Opdagelsen katalyserede en massiv forskningsindsats, der er blevet genstand for mange kommercielle aktiviteter. Potentialet og grænserne for antisense-teknologien skulle afprøves, og et foreløbigt højdepunkt blev nået i 1998, da det første antisense-lægemiddel, Vitravene, blev godkendt og markedsført.

Det har siden 1978 været klart, at naturligt DNA eller RNA aldrig ville kunne bruges som lægemidler. F.eks. vil et naturligt DNA-oligonucleotid meget hurtigt nedbrydes i biologiske organismer. Der måtte altså fremstilles kemiske alternativer eller analoger af DNA-oligonucleotider, og igennem den seneste snes år er der syntetiseret talrige DNA-analoger verden over [5-10]. Som udgangspunkt for dette arbejde modificerede man systematisk den naturlige DNA-struktur på alle tænkelige positioner (figur 3). Den første »generation« af DNA-analoger repræsenteres af phosphorothioaten (figur 4, (1)), hvor phosphor-

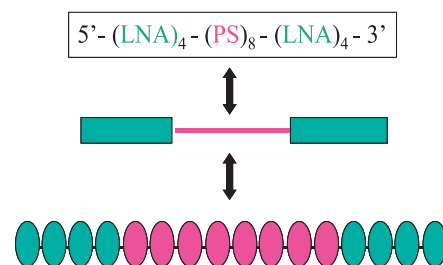
diester-bindingen fra almindeligt DNA er kemisk modificeret til en phosphorothioat-binding. Vitravene er en phosphorothioat, og stofgruppen danner grundlag for en række antisense-lægemidler, der er langt fremme i den kliniske udvikling. Phosphorothioaternes største begrænsning ligger dog i, at de ikke har tilstrækkelig affinitet over for DNA og RNA. Repræsentanter for den næste generation af nucleinsyreanaloger er 2'-fluoro- og 2'-MOE-modificeret RNA (figur 4, 2 og 3), hvor især 2'-MOE er brugt som lægemiddelkandidat. Oligonucleotider opbygget af disse stoffer giver en begrænset affinitetsforbedring. Kulminationen af udviklingsarbejdet kom med stoffer som PNA [11-14] og LNA [15-20], der interessant nok begge er danske opfindelser (figur 4, 4 og 5). Både PNA og LNA har helt unikke kemiske og biologiske egenskaber, der indfrier mange af de ønsker, der så intensivt har været arbejdet på at frembringe [21-23]. PNA var det første eksempel på en radikal modificeret struktur, der effektivt kunne hybridisere til DNA og RNA. I modsætning til langt de fleste andre analoger er PNA opbygget af et polyamidbackbone og repræsenterer derfor sin helt egen klasse. Den videnskabelige interesse omkring PNA er dokumenteret i utallige publikationer gennem årene, og det er blevet vist i en række modeller, at PNA effektivt kan inhibere udtrykket af både DNA og RNA. De videnskabelige resultater har også ledt til industrielle applikationer. PNA bragte et paradigmeskifte inden for design af nucleinsyreanaloger og er givetvis en af de største opfindelser på sit felt.

LNA- og oligodesign

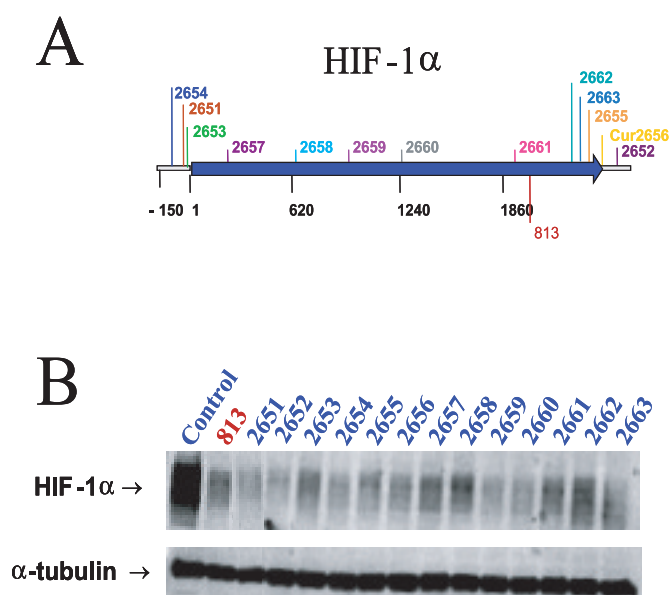
I modsætning til PNA er LNA strukturelt set meget mere lig DNA. Den eneste kemiske ændring i DNA er, at LNA-monomeren indeholder en ekstra ring mellem 2' - og 4' -positionen på sukkeren (4'-CH₂-O-2') (figur 4, 5). Det blev allerede tidligt vist, at denne bicykliske struktur inducerede en rekordstor stigning i affiniteten over for især RNA, men også over for DNA. Da syntesen af LNA foregår efter helt samme metode som DNA- og RNA-syntese, er det muligt at blande DNA/RNA- og LNA-monomerer i samme

oligonucleotid. De tidlige arbejder viste entydigt, at hver eneste LNA-monomer bragte de ønskede egenskaber med sig i oligonucleotidet på additiv vis. Denne meget interessante egenskab betød, at LNA kunne bruges i et hvilket som helst oligonucleotid og frembringe forbedrede bindings-egenskaber og ydermere øge den biologiske stabilitet [19-24]. LNA's præference for RNA gjorde det oplagt at bruge det til at forbedre de generelle egenskaber for antisense oligonucleotider.

Den bedste måde at »blande« DNA- og LNA-monomerer på var at bygge oligomeren op af tre segmenter: et centralt DNA-segment, typisk bestående af 8 DNA- eller 8 phosphorothioat-enheder og flankere dette med to LNA-segmenter med hver 4 LNA-monomerer (figur 5). Det kaldes for et »gap-mer«-design, og det har gennem mange eksperimenter vist sig at være et meget potent design for LNA [25-27]. I det følgende fokuseres der på anvendelsen af LNA-gap-merer i antisense.



Figur 5. Skematisk illustration af LNA-oligonucleotider brugt i antisense. Det typiske design illustrerer et oligonucleotid bestående af 16 monomerer (16-mer), hvor et centralt segment af 8 phosphorothioater flankeres af to LNA-segmenter hvert bestående af 4 monomerer. Dette design kaldes for et »gap-mer«-design.



Figur 6. »GeneWalk«.

A. Skematisk illustration af HIF-1 α -genet (mRNA). Den blå pil repræsenterer den kodende del af RNA'et, der er flankeret af korte ikke-kodende RNA-fragmenter. Strengene med nummerangivelse viser de steder, hvor de forskellige LNA-gap-merer hybridiserer.

B. Et Western-plot der viser genudtrykket (proteinproduktionen) før og efter behandling med LNA (koncentration=100 nM). α -tubulin er taget med som kontrol. Det er et urelateret gen, der ikke skulle påvirkes af de udvalgte LNA-gap-merer.

Target-identifikation

Det næste skridt i udviklingsarbejdet er at selektare det sygdomsfremkaldende gen. Man regner med, at det humane genom indeholder ca. 30.000 gener, hvoraf ca. 5000 forventes at have farmaceutisk betydning. Udvalgelsen af et passende gentarget er en kompleks proces, hvor man bl.a. skal vurdere dets biologiske og kliniske relevans - herunder om inhibering eller nedregulering vil have nogle synergistiske effekter med allerede kendte lægemidler. Et eksempel på et klinisk interessant gen er HIF-1 α , der spiller en vigtig rolle i dannelsen af nye blodkar. Genet er derfor vigtigt under tumorers vækst, da en voksende tumor har stort behov for ilt og næringsstoffer. Hvis genet nedreguleres, betyder det derfor, at tumoren »udsultes«. Et andet klinisk relevant gen er H-Ras, et klassisk oncogen der spiller en central rolle i kontrollen af cellevækst. Cancerceller vil hyppigt have en muteret eller overudtrykt form af genet, der derved stimulerer cellen til ukontrolleret vækst.

»Gene walk«

Først udføres et »gene walk«. Denne betegnelse dækker over, at der syntetiseres en række oligonucleotider, hvis basesekvens er forudbestemt til at binde til forskellige steder på det kodende mRNA (figur 6 A). På den måde finder man det sted på mRNA, der er mest følsomt over for det valgte oligodesign, og som en konsekvens heraf blokeres genudtrykket mest effektivt. Den første kolonne i figur 6 B viser udtrykket af HIF-1 α -genet i en ikke behandlet prøve, og de følgende kolonner illustrerer de forskellige LNA-gap-merers evne til at inhibere udtrykket af HIF-1 α . Det ses, at de udvalgte LNA-gap-merer nedsætter genudtrykket og bremser genudtrykket ved en lav koncentration. LNA-gap-merer viser specifik aktivitet ved en betydelig lavere koncentration end de traditionelle antisense-reagenser, og LNA er derfor en af de mest potente stofgrupper i antisense [28].

Et »gene walk« skal naturligvis følges op af en række andre eksperimenter, der tilsammen skal bruges til at udvælge det stof, der dernæst skal testes *in-vivo* (dyreforsøg).

In-vivo-undersøgelser

Af de mange stoffer, der er undersøgt i de indledende forsøg, vælges de mest lovende til dyreforsøg. En af de klassiske dyremodeller, der anvendes inden for cancerforskningen, er *xeno-graft*-modellen [29,30]. Den etableres ved at cellerne fra en human tumorcellelinje overføres subcutant til mus eller rotter, og derefter følges tumorens vækst. Et eksempel på et sådant forsøg er vist i figur 7, hvor en udvalgt LNA-gap-mer er rettet mod H-Ras.

Den røde kurve i figur 7 repræsenterer både for Miapaca- og 15PC3-tumorerne den ikke

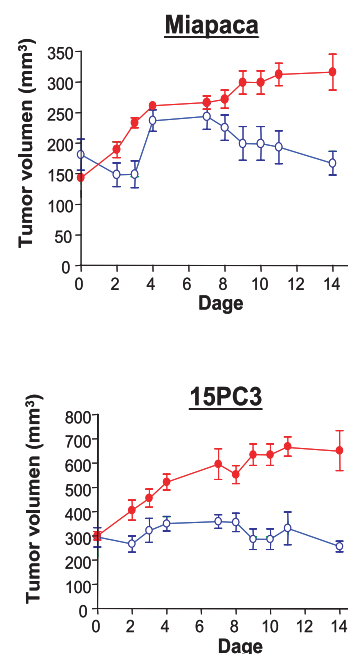
behandlede gruppe. Det fremgår, at tumorernes vækst øges støt de 14 dage forsøget varer. Den blå kurve repræsenterer den behandlede gruppe. For Miapaca ses indledningsvis ikke nogen nævneværdig ændring af vækstforløbet, men efter 8 dage reduceres tumorstørrelsen markant, og efter 14 dage er den mindre end ved påsætningstidspunktet. For 15PC3-tumoren er væksten i hele forløbet inhiberet.

Sideløbende med *xeno-graft*-studierne udføres en række andre undersøgelser, der skal give et samlet billede af det udvalgte stofs virkningsmønster. En fast del af denne proces er, at der skal udføres undersøgelser af vævsfordelingen og stoffets metabolisme. Inden de egentlige kliniske undersøgelser på mennesker kan begynde, skal der udføres en udvidet toksikologisk undersøgelse af stoffet [31].

Her er blot vist nogle udvalgte eksempler på de tidlige faser af udviklingsprocessen af genmedicin. Hele udviklingsforløbet er både langvarigt og kostbart.

Det kompliceres ofte ved, at de bedste stoffer fra f.eks. et »gene-walk« ikke viser de forventede resultater i dyreforsøgene, og at de bedste stoffer fra dyreforsøgene ikke giver de forventede resultater i de kliniske undersøgelser. Hver gang man bevæger sig fra et niveau til et andet, spiller mange nye og ukendte faktorer ind. Det er spillets regler, og en af årsagerne til at det let kan tage 10 år at udvikle et nyt lægemiddel. De kommende år vil vise, i hvor stor udstrækning de store forventninger til oligonucleotider bliver indfriet, og dermed i hvor høj grad det farmaceutiske potentiale af denne stofgruppe bliver realiseret.

Der rettes en speciel tak til Anja Høg og Paul Kristjansen, Laboratoriet for Eksperimentel Onkologi ved Københavns Universitet, og Kees Flüiter, Department of Neurogenetics AMC, University of Amsterdam, for at have bidraget til dette arbejde.



Figur 7. Xeno-graft-eksperiment (dyreforsøg).

Humane tumorceller fra en prostata – og en pancreas cancer, hhv. 15PC3 og Miapaca, implanteres subcutant på en gruppe af mus. Ved en given størrelse af tumoren begynder behandlingen. For begge forsøg repræsenterer den røde kurve den ubehandlede gruppe, og den blå kurve repræsenterer den behandlede gruppe, der her er behandlet med en LNA-gap-mer.

E-mail-adresse
Troels Koch: tk@santaris.com

Referencer

1. J.D.Watson; F.H.C.Crick *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
2. J.D.Watson; F.H.C.Crick *Nature* **1953**, *171*, 964-967.
3. Douglas Hanahan; Robert A.Weinberg *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
4. Paul C.Zamecnik; Mary L.Stephenson *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1978**, *75*, 280-284.
5. Eugen Uhlmann; Anusch Peyman *Chemical Reviews* **1990**, *90*, 544-579.
6. Susan M.Freir; Karl-Heinz Altmann *Nucleic Acid Research* **1997**, *25*, 4429-4443.
7. Altmann, K.-H.; Dean, N. M.; Fabbro, D.; Freier, S. M.; Geiger, T.; Häner, R.; Hüskén, D.; Martin, P.; Monia, B. P.; Müller, M.; Natt, F.; Nicklin, P.; Phillips, J.; Piesles, U.; Sasmor, H.; Moser, H. E. *Chimia* **1996**, *50*, 168-176.
8. Cook, P. D. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 1141-1162.
9. Uhlmann, E. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **2000**, *3*, 203-213.
10. Leumann, C. J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, *10*, 841-854.
11. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
12. Hanvey, J. C.; Peffer, N. J.; Bisi, J. E.; Thomson, S. A.; Cadilla, R.; Josey, J. A.; Ricca, D. J.; Hassman, C. F.; Bonham, M. A.; Au, K. G.; Carter, S. G.; Bruckenstein, D. A.; Boyd, A. L.; Noble, S. A.; Babiss, L. E. *Science* **1992**, *258*, 1481-1485.
13. Corey, D. R. *TIBTECH* **1997**, *15*, 224-229.
14. Demidov, V. V.; Frank-Kamenetskii, M. D. *TIBS* **2004**, *29*, 62-71.
15. Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Morio, J. A. K.; In, Y.; Ishida, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron lett.* **1997**, *38*, 8735-8738.
16. Singh, S. K.; Nielsen, P.; Koshkin, A.; Wengel, J. *Chem.Comm.* **1998**, 455-456.
17. Koshkin, A.; Nielsen, P.; Meldgaard, M.; Rajwanshi, V. K.; Singh, S. K.; Wengel, J. *J.Am.Chem.Soc.* **1998**, *120*, 13252-13253.
18. Koshkin, A.; Singh, S. K.; Nielsen, P.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Meldgaard, M.; Olsen, C. E.; Wengel, J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607-3630.
19. Wengel, J.; Koshkin, A.; Singh, S. K.; Nielsen, P.; Meldgaard, M.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Skouv, J.; Nielsen, C. B.; Jakobsen, N.; Olsen, C. E. *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1365-1370.
20. Wengel, J.; Petersen, M.; Nielsen, K. E.; Jensen, G. A.; Hakansson, A. E.; Kumar, R.; Sorensen, M. D.; Rajwanshi, V. K.; Bryld, T.; Jacobsen, J. P. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 389-396.
21. Braasch, D. A.; Corey, R. *Chemistry & Biology* **2000**, *55*, 1-7.
22. Wahlestedt, C.; Salmi, P.; Good, L.; Kela, J.; Johnsson, T.; Hokfelt, T.; Broberger, C.; Porreca, F.; Lai, J.; Ren, K.; Ossipov, M.; Koshkin, A.; Jakobsen, N.; Skouv, J.; Oerum, H.; Jacobsen, M. H.; Wengel, J. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **2000**, *97*, 5633-5638.
23. Wengel, J.; Vester, B.; Lundberg, L. B.; Douthwaite, S.; Sorensen, M. D.; Babu, B. R.; Gait, M. J.; Arzumanov, A.; Petersen, M.; Nielsen, J. T. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 601-604.
24. Frieden, M.; Hansen, H. F.; Koch, T. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1041-1043.
25. Kurreck, J.; Wyszko, E.; Gillen, C.; Erdmann, V. A. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1911-1918.
26. Braasch, D. A.; Liu, Y.; Corey, D. R. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5160-5167.
27. Frieden, M.; Christensen, S. M.; Mikkelsen, N. D.; Rosenbohm, C.; Thue, C. A.; Westergaard, M.; Hansen, H. F.; Orum, H.; Koch, T. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6365-6372.
28. Grunweller, A.; Wyszko, E.; Bieber, B.; Jahnel, R.; Erdmann, V. A.; Kurreck, J. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3185-3193.
29. Wachek, V.; Heere-Ress, E.; Halaschek-Wiener, J.; Meyer, T. L. H.; Eichler, H.-G.; Jansen, B. *J.Mol.Med.* **2001**, *79*, 587-593.
30. Fluiter, K.; Ten Asbroek, A. L.; De Wissel, M. B.; Jakobs, M. E.; Wissenbach, M.; Olsson, H.; Olsen, O.; Oerum, H.; Baas, F. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 953-962.
31. Galderisi, U.; Cipollaro, M.; Cascino, A. *Emerging Drugs* **2001**, *6*, 69-79.



HOLME PATENT A/S

add value to your technological development

Patenter
Varemærker
Design
Brugsmodeller
Nyheds-
undersøgelser
Overvågninger
Licensaftaler
Krænkelser
Indsigelser
Appeller

HOLME PATENT A/S yder rådgivning og assistance i Danmark og udlandet i forbindelse med ansøgning om og opnåelse af immaterialretsbeskyttelse.

Besøg vor stand C2-049 på Biotech Forum + Scanlab udstillingen i Bella Centeret d. 5. – 7. oktober 2004 eller kontakt en af vore rådgivere indenfor life science, kemi og biomedicoteknik.

HOLME PATENT A/S, Vesterbrogade 20, 1620 København V,
holme@holmepatent.dk - www.holmepatent.dk
Tlf. 33 24 21 21 - Fax: 33 24 91 21

Europæiske patentagenter, Europæiske varemærke- og designagenter,
Medlem af De Danske Patentagenter Forening. Medlem af FICPI og AIPPI.