



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Sallitut selkärankarakenteen modifikaatiot RNAasi H -aktiivisissa antisenseoligonukleotideissa

Essi Melender

Kemia

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

4.6.2025

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pääaine: Kemia

Tekijä(t): Essi Melender

Otsikko: Sallitut selkärankarakenteen modifikaatiot RNAasi H -aktiivisissa antisenseoligonukleotideissa

Ohjaaja(t): Pasi Virta

Sivumäärä: 19 sivua + liitteet 2 sivua

Päivämäärä: 4.6.2025

Antisenseoligonukleotidit (ASO) ovat yksijuosteisia, noin 20 nukleotidin pituisia kemiallisesti modifioituja oligomeerejä, jotka sitoutuvat lähetti-RNA:han Watson-Crick-emäspariutumisen avulla. Terapeuttisia ASO:ita kehitetään neurologisten sairauksien hoitoon niiden geeni-ilmentymää hiljentävän vaikutuksen takia. ASO:iden suunnittelussa hyödynnetään gapmeerimallia, jossa DNA-pohjainen keskiosa ("ikkuna") mahdollistaa RNAasi H -entsyymien katalysoiman lähetti-RNA:n pilkkomisen, joka johtaa sairautta aiheuttavan kohdeproteiinin translaation estämiseen. Keskiosa on herkkä kemiallisille muokkauksille. Sen sijaan reuna-alueissa ("siivet") käytetään usein modifioituja ribonukleosideja farmakologisten ominaisuuksien parantamiseksi.

Oligonukleotideihin tulee tehdä modifikaatioita, sillä modifioimattomat oligonukleotidit pilkkotaan elimistössä nopeasti nukleaasien toimesta. Modifikaatioilla parannetaan myös ASO:iden jakautumista kudoksiin, soluunpääsyä ja affiniteettia kohde-RNA:han. Selkärankarakenteen modifikaatiot parantavat ASO:iden nukleasiresistenssiä. Fosforotioaattimodifikaatio (PS) on tutkituin selkärankarakenteen modifikaatio, ja se voidaan sijoittaa ASO:n ikkuna-alueelle häiritsemättä RNAasi H aktivaatiota. PS-modifikaatiot sitoutuvat proteiineihin, mikä huomattavasti parantaa niiden kudosjakautumista ja soluunpääsyä. Toisaalta epäspesifinen proteiinisitoutuminen aiheuttaa myös toksisuutta. Vaihtoehtoisia selkärankarakenteen modifikaatioita tutkitaan, koska halutaan optimoida ASO:iden terapeuttiset ominaisuudet. Muun muassa amidimodifikaatiota (AM) tutkitaan vaihtoehtoisena selkärankarakenteena, ja se on rakenteeltaan akiraalinen. AM-sidosta ei voida kuitenkaan sijoittaa ASO:n RNAasi H -herkälle ikkuna-alueelle.

Tällä hetkellä tutkimuksessa kiinnostus painottuu ASO:iden kudoskohdentamiseen, toksisuuden vähentämiseen ja alleeliselektiivisyyteen. ASO:iden kudoskohdentamista keskushermostoon on onnistuttu lisäämään fosforyyliguanidiiniidierimodifikaatiolla (PN). Mesyylifosforamidaattimodifikaatiolla (MsPA) on puolestaan vähennetty ASO:iden syto- ja maksatoksisuutta. Alleeliselektiivisyydessä tavoitteena on säilyttää kohteena olevan geenin tyypillinen lähetti-RNA:n muoto, ja vähentää ainoastaan sairauden etenemisen kannalta merkittäviä mutatoituneita lähetti-RNA sekvenssejä. Alleeliselektiivisyyttä pyritään lisäämään muun muassa stereokemiaa muokkaamalla, ja lupaavia tuloksia on saatu PN-modifikaation stereokemiaa kontrolloimalla. Toinen potentiaalinen keino lisätä alleeliselektiivisyyttä on RNAasi H:n katkaisukohtien muuttaminen, ja on havaittu, että etynylifosforaattimodifikaatiolla (EP) katkaisukohtien muuttaminen on mahdollista.

Avainsanat: antisenseoligonukleotidi, RNAasi H, selkärankarakenteen modifikaatio

Sisällysluettelo

Johdanto	1
RNAasi H -aktiiviset antisenseoligonukleotidilääkkeet	1
Vaikutusmekanismi	3
Vaikutuksen kohdentaminen	4
Selkärankarakenteen modifikaatiot.....	5
Fosforotioaatti	6
Mesyylifosforamidaatti	8
Amidi	10
Fosforyyliguanidiinidiesteri	11
Etynyylifosfonaatti.....	15
Johtopäätökset ja yhteenveto	17

Lyhenteet:

ASO, antisenseoligonukleotidi

RNAasi H, ribonukleaasi H

PS, fosforotioaatti

PO, fosfodiesteri

TTR, transtyretiini

MOE, metoksietyyli

MsPA, mesyylifosforamidaatti

cET, lukittu etyyli

AM, amidi

CLSM, konfokaalinen laserpyyhkäisymikroskopia

PN, fosforyyliguanidiinidiesteri

PBS, fosfaattipuskuroitu suolaliuos

ALS, amyotrofinen lateraaliskleroosi

FTD, frontotemporaalinen dementia

EP, etynyylifosfonaatti

Johdanto

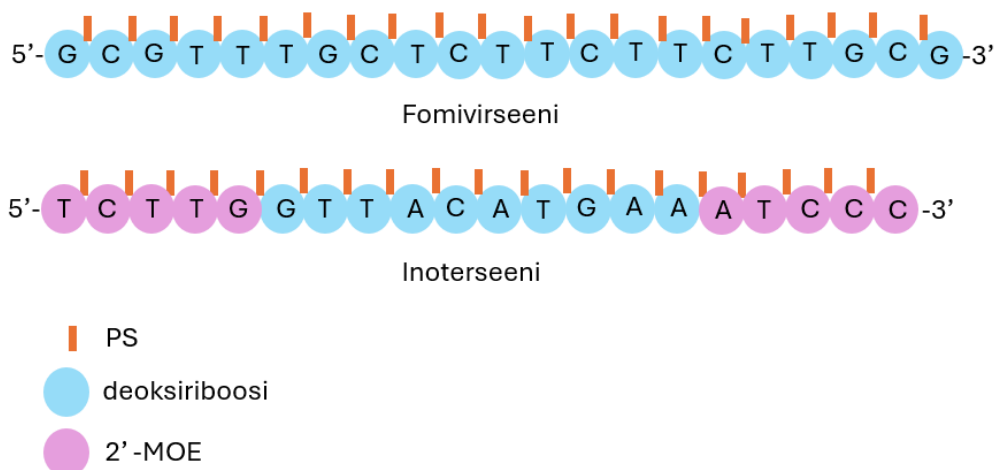
Antisenseoligonukleotidit (ASO) ovat noin 20 nukleotidin pituisia, DNA-juostetta sisältäviä kemiallisesti modifioituja oligomeerejä, jotka sitoutuvat lähetti-RNA:han Watson-Crick-emäspariutumisen avulla [1]. ASO:t ovat yksi RNA:han kohdistuvista lääketeknologioista, ja niillä pystytään hiljentämään geeni-ilmentymää ribonukleaasi H (RNAasi H) -välitteisesti. ASO:lla voidaan hoitaa proteiiniperäisiä sairauksia, joihin ei ole löydetty hoitokeinoja perinteisemmällä lääkekehitysmenetelmällä. Markkinoille hyväksytyt ASO:t on suunniteltu harvinaisia sairauksia sairastavien potilaiden hoitoon. Kliinisissä tutkimuksissa on kuitenkin ASO:ita, jotka on suunniteltu yleisesti esiintyvien neurologisten sairauksien hoitoon, kuten Alzheimerin ja Parkinsonin taudin hoitoon [1]. Oligonukleotidilääkkeiden etu tavanomaisiin pienimolekyylisiin lääkkeisiin verrattuna on se, että lääke voidaan usein suunnitella pelkästään kohdegeenin primäärisekvenssin ja nopealla seulonnalla löydettyjen kandidaattien avulla. Lisäksi oligonukleotidilääkkeiden vaikutus on mahdollista kohdistaa johonkin tiettyyn alleeliin [2].

Kohde-RNA:han sekvenssispesifisesti sitoutuvien oligonukleotidien käyttämistä terapeutisena aineena ehdotettiin ensimmäisen kerran vuonna 1978 [3]. Haasteena oli kuitenkin lääkeaineen kuljetus, stabiilisuus ja spesifisyys [4]. Selkärankarakenteen ja riboosisokerin modifikaatioilla on onnistuttu lisäämään ASO:n stabiilisuutta plasmassa, resistiivisyyttä nukleaaseja vastaan, parantamaan soluunottoa ja kohdespesifisyyttä. Tässä tutkielmassa käsittelemme selkärankarakenteen modifikaatioiden vaikutusta ASO:ihin. Niistä yleisimmin käytetty on fosforotioaatti (PS), jossa fosfodiesterin yksi ei-silloittavasta hapesta on korvattu rikillä [4]. PS-linkkeri parantaa ASO:n nukleaasiresistenssiä, mikä pidentää vaikutuksen kestoa. Lisäksi PS-sidokset tehostavat sitoutumista proteiineihin, mikä on tärkeää ASO:n jakautumisen, soluunoton ja aktiivisuuden kannalta [1]. Toisaalta proteiinisitoutuminen vaikuttaa myös siihen, että osa PS-ASO:ista on syto- ja maksatoksisia. PS-linkkerin aiheuttamien haasteiden takia myös vaihtoehtoisia selkärankarakenteen modifikaatioita tutkitaan [5]. Tutkielmassani esittelen erilaisia selkärankarakenteen modifikaatioita ja sitä, miten ne vaikuttavat RNAasi H -aktiivisten ASO:iden toimintaan.

RNAasi H -aktiiviset antisenseoligonukleotidilääkkeet

RNA:han kohdistuvien lääkkeiden etu perinteisiin pienmolekulaarisiin lääkkeisiin verrattuna on niiden translaatiota edeltävä vaikutusmekanismi, joka ei ole pienmolekyylien

saavutettavissa [1]. Pienmolekyylit sitoutuvat usein tiettyihin proteiineihin, joko entsyymeihin tai solun pintaproteiineihin tai reseptoreihin, kun taas ASO:t vaikuttavat lähetti-RNA tasolla estämällä proteiinin translaation. Ne voivat vaikuttaa myös proteiinisynteesiä ohjaavan lähetti-RNA:n muodostumiseen niin sanotun silmukointiprosessin kautta, jolloin sitoutumisen kohteena on esilähetti-RNA. RNAasi H -aktiiviset ASO:t puolestaan estävät proteiinin tuottamisen pilkkomalla lähetti-RNA:n. RNA:han kohdistuvien lääkkeiden etuna on se, että niitä voidaan suunnitella toimimaan useilla eri mekanismeilla, ja RNAasi H -aktiiviset ASO:t edustavat vain yhtä näistä mekanismeista. RNA:han kohdistuvien lääkkeiden kehityksessä on kuitenkin ollut monia haasteita, jotka on täytynyt ylittää. ASO:iden synteesimenetelmiä täytyi kehittää tehokkaammaksi ja edullisemmaksi. Huolena oli myös oligonukleotidien hajoaminen nukleaasien toimesta, ja uskottiin, ettei oligonukleotidit pääse kulkeutumaan soluun niiden koon ja negatiivisen varauksen takia. Lisäksi ennen kun RNA:han kohdistuvien lääkkeiden kehitys oli mahdollista, täytyi RNA:n rakenne ja toiminta tuntea. ASO-sekvenssin valitseminen vaati myös DNA-sekvensoinnin kehitystä (Kuva 1), [1].



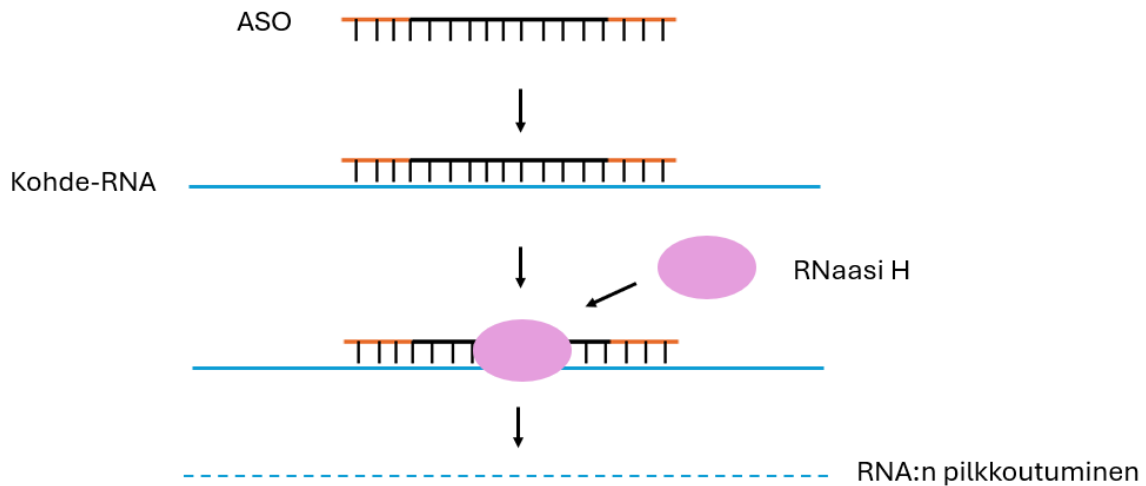
Kuva 1. ASO-lääkkeitä, Fomivirseni ja Inoterseeni. Fomivirseni hyväksyttiin kliiniseen käyttöön vuonna 1998 ja on ensimmäinen hyväksytty terapeuttiivinen ASO. Fomivirseniä käytettiin sytomegaloviruksen aiheuttamaan silmän verkkokalvon rappeutumiseen. Inoterseeni hyväksyttiin vuonna 2018, ja sitä käytetään TTR-geeni-ilmentymän vähentämiseen neurodegeneratiivisen transtyretiiniamyloidoosisairauden hoidossa. PS, fosforotioaatti, 2'-MOE, 2'-metoksietyyli.

Kliiniseen käyttöön on hyväksytty neljä RNAasi H -aktiivista ASO-lääkettä, fomivirseni, mipomerseeni, inoterseeni ja volanesorseeni [1], joista fomivirseni ja mipomerseeni on myöhemmin vedetty pois markkinoilta [6]. Fomivirseni poistettiin markkinoilta, koska

samaan käyttötarkoitukseen kehitettiin erittäin tehokas antiretroviraalinen hoito. Mipomerseeni puolestaan vedettiin pois sen maksatoksisuuden vuoksi. Inoterseeni aiheuttaa myös toksisuutta maksassa ja munuaisissa, ja se on saatavilla ainoastaan rajoitetun jakeluohjelman kautta. ASO:iden haasteena onkin maksa- ja munuaistoksisuuden sekä yliherkkyyshäiriön mekanismien ymmärtäminen. Tästä huolimatta kliinisessä lääkekehityksen vaiheessa on yli 100 ASO:ta ja prekliinisessä vaiheessa vielä enemmän, joten on mahdollista, että ASO-lääkkeet ovat laajemmin käytössä lähitulevaisuudessa [6]. ASO-lääkkeiden potentiaali hoitaa usein esiintyviä neurologisia sairauksia, kuten Alzheimerin ja Parkinsonin tautteja on merkittävä, ja kannustaa jatkamaan ASO:iden tutkimista terapeuttisina aineina. ASO:iden potentiaali sydän ja verisuonitautien osalta on myös todennettu [1].

Vaikutusmekanismi

Kohde-RNA:n pilkkomiseen suunnitellun ASO:n tulee täyttää RNAasi H -entsyymien asettamat erityisvaatimukset [1]. RNAasi H on RNA:ta hajottava entsyymi, joka pilkkoo fosfodiesterisidoksia ja vaatii substraatikseen RNA/DNA-heterodupleksin katkaisua varten (Kuva 2). Tämän takia ASO:ssa tulee olla alue, joka koostuu deoksinukleotideista ja varautuneista fosfaattianalogeista, jotka osallistuvat entsyymattiseen mekanismiin. Tätä aluetta kutsutaan ikkuna-alueeksi. Lisäksi RNAasi H -aktiivisissa ASO:issa on ikkuna-aluetta reunustavat alueet, joita kutsutaan siivekkeiksi. Siivekkeisiin voidaan sijoittaa enemmän modifikaatioita, sillä ne eivät häiritse RNAasi H -entsyymien toimintaa. Siivekkeisiin voidaan lisätä esimerkiksi varausneutraaleita selkäranganrakenteen modifikaatioita [5], [7] ja useita ribosisokerin modifikaatioita [1]. Siivekkeiden modifikaatioilla lisätään ASO:iden spesifisyyttä ja affiniteettia kohde-RNA:han. Kun ASO on sitoutunut kohde-RNA:han, RNAasi H tunnistaa sen substraattina ja pilkkoo sen. Tästä seuraa sairautta aiheuttavan proteiinin translaation estyminen [1].



Kuva 2. Antisenseoligonukleotidi (ASO), joka koostuu DNA-pohjaisesta keskiosasta ja RNA:n kaltaisista reunustavista alueista, sitoutuu kohdetranskriptiin. Muodostunut RNA/DNA-heterodupleksi on substraatti RNaasi H -entsyymille, joka pilkkoo kohdetranskriptin.

Vaikutuksen kohdentaminen

ASO:n vaikutus voidaan kohdentaa lähetti-RNA:n lisäksi myös esilähetti-RNA:han ja pitkään ei-koodaavaan-RNA:han [2]. Koska RNaasi H1 -entsyymiä sijaitsee sekä sytoplasmassa että tumassa, ASO pystyy vaikuttamaan kummassakin. Lisäksi vaikutus on mahdollista kohdistaa tiettyyn alleeliin, kuten pistemutaatioon tai toistolaajennusmutaatioon (repeat-expansion mutation), säästämällä tyypillisesti esiintyvä (wild-type) alleeli. Tällöin ASO vaikuttaa ainoastaan mutatoituihin geeneihin ja lääkkeen haittavaikutukset ovat vähäisemmät, kun tavallisen alleelin proteiinitranslaatio ja fysiologisesti tarpeellisten proteiinien tuotanto säilyy [8]. Monet neurodegeneratiiviset sairaudet johtuvat autosomaalisen geenin dominoivasta mutaatiosta, jotka tuottavat myrkyllisiä proteiineja. Näihin sairauksiin alleeliselektiivinen lähestymistapa on turvallisempi ja siksi potentiaalinen tapa kehittää terapeuttisia ASO:ita tulevaisuudessa [8].

ASO voidaan injektoida potilaalle esimerkiksi ihon alle, selkäyttimeen tai suonensisäisesti [1]. Myös suoraan kudokseen injektointi on mahdollista, esimerkiksi silmän lasiaiseen [9]. Tulevaisuudessa suun kautta annostelu saattaa olla mahdollista enteropäällysteisenä kapselina, jos hyötyosuutta saadaan kasvatettua [1]. ASO:t pystyvät läpäisemään solukalvon ilman kuljetinta, ja soluunottoon voidaan vaikuttaa erilaisilla modifikaatioilla [1]. Lääkekehityksessä etsitään tällä hetkellä keinoja kohdentaa ASO:iden vaikutus tarkemmin tiettyihin kudoksiin, ja

tähän on löydetty ratkaisuja muun muassa selkärankarakenteen modifikaatiolla, joka parantaa vaikutuksen kohdentamista keskushermostoon [7], ja N-asetyyliagalaktoosiiamiinikonjugaatilla (GalNac), joka kohdistaa vaikutusta maksaan [1].

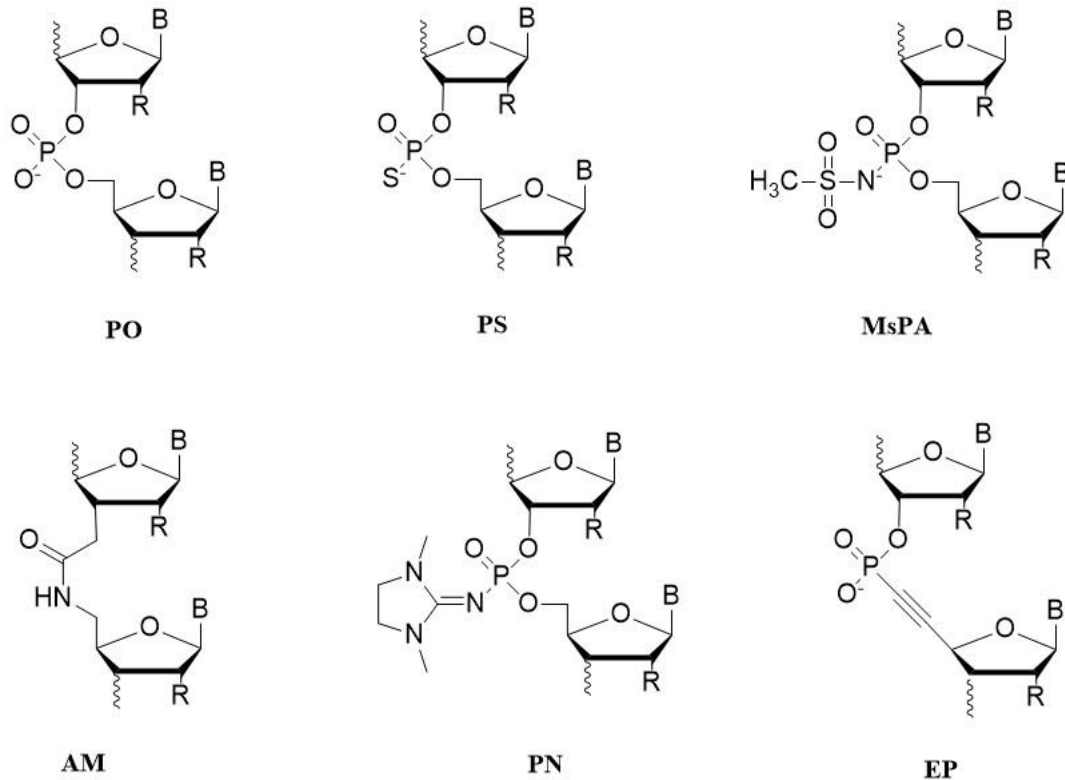
Selkärankarakenteen modifikaatiot

Oligonukleotideihin tulee tehdä modifikaatioita, jotta niitä voidaan käyttää terapeuttisina lääkeaineina [1]. Modifioimattomat oligonukleotidit pilkotaan elimistössä nopeasti nukleaasien toimesta. Selkärankarakenteen modifikaatioilla parannetaan ASO:iden resistenssiä nukleaaseja vastaan. Modifikaatioilla voidaan lisätä myös ASO:iden jakautumista kudoksiin ja soluunpääsyä [2]. Spesifisyyttä ja affiniteettiä kohde-RNA:han pystytään säätämään optimaaliseksi. Vain harvat modifikaatiot ikkuna-alueella tukevat RNAasi H -entsyymin toimintaa. PS-modifikaatio on yleisimmin käytetty selkärankarakenteen modifikaatio, joka on siedetty sekä ikkuna-alueella että siivissä. Siivekkeisiin modifikaatioita voidaan sijoittaa vapaammin, sillä ne eivät häiritse RNAasi H:n toimintaa. Siivekkeisiin onkin tärkeää sijoittaa modifikaatioita muun muassa spesifisyyden ja affiniteetin lisäämiseksi [1], [2].

Oligonukleotideja voidaan modifioida riboosisokerista, emäksestä tai selkärankarakenteesta, ja tässä tutkielmassa keskitytään selkärankarakenteen modifikaatioihin. Selkärankarakenteen modifikaatiot ovat usein RNA:ssa ja DNA:ssa luonnollisesti esiintyvien fosfodiesterisidosten (PO) kaltaisia, mutta ne voivat olla rakenteeltaan myös täysin poikkeavia PO-sidoksista [5]. PS-modifikaatiossa yksi fosfodiesterin ei-silloittavista hapista on korvattu rikillä (Kuva 3). On myös lukuisia muita modifikaatioita, jotka ovat rakenteeltaan fosfodiesterin kaltaisia, kuten tässä tutkielmassa käsiteltävät mesyylifosforamidaatti (MsPA), fosforyyliguanidiinidiesteri (PN) ja etynylyfosfonaatti (EP) (Kuva 3). Amidimodifikaatio (AM) poikkeaa rakenteeltaan muista tässä tutkielmassa esitetyistä modifikaatioista, ja on rakenteeltaan akiraalinen (Kuva 3).

Selkärankarakenteen modifikaatioilla on erilaisia farmakologisia ominaisuuksia. Usein selkärankarakenteen modifikaatiot parantavat erityisen hyvin ASO:iden nukleasiresistenssiä [1], [5], [8], [10]. PS-modifikaatiot parantavat tehokkaasti kudusjakautumista ja soluunottoa sitoutumalla proteiineihin [1], [11]. Jotkut PS-ASO-sekvenssit sitoutuvat kuitenkin liian tiukasti tiettyihin proteiineihin tehden niistä toksisia [12]. Näiden sekvenssien toksisuutta on onnistuttu vähentämään lisäämällä MsPA-modifikaatioita tiettyyn kohtaan PS-ASO:issa [13]. ASO:iden kudusaltistusta ja farmakodynaamisten ominaisuuksien tehostumista

keskushermostossa on parannettu lisäämällä ASO:ihin PN-modifikaatioita [7]. EP-modifikaatiolla puolestaan voidaan vaikuttaa RNAasi H:n katkaisukohtiin [10].



Kuva 3. Selkärankarakenteen modifikaatioita, joita voidaan sijoittaa RNAasi H -aktiivisiin antisenseoligonukleotideihin. Modifikaatioilla korvataan luonnollisesti esiintyvä PO eli fosfodiesteri, joka yhdistää nukleosidit toisiinsa. AM- ja PN-modifikaatiot ovat varausneutraaleja. PO, fosfodiesteri; PS, fosforotioaatti; MsPA, mesyylifosforamidaatti; AM, amidi; PN, fosforyyliguanidiinidiesteri; EP, etynnylifosfonaatti.

Fosforotioaatti

Fosforotioaatti (PS) on yksi eniten käytetyistä modifikaatioista oligonukleotidilääkkeissä [2]. PS-linkkeri parantaa ASO:n nukleasiresistenssiä, ja se voidaan sijoittaa sekä ikkuna-alueelle että siipiin, ilman että RNAasi H -välitteinen pilkkoutuminen estyy [2]. PS-sidos lisää sitoutumista plasman ja solukalvon proteiineihin, mikä edistää jakautumista kudoksiin ja kertymistä soluihin, sekä vähentää ASO:n suodattumista munuaisissa [11]. PS-sidoksia on käytetty kaikissa kaupalliseen käyttöön hyväksytyissä ASO:issa [14]. PS-sidoksen lisääminen ASO:ihin aiheuttaa myös epäsuotuisia ominaisuuksia. PS-sidos heikentää affiniteettia kohde-RNA:han, mikä toisaalta voidaan kompensoida riboosisokerin modifikaatiolla ASO:n siivekkeissä [1]. Jotkut PS-ASO:t ovat myös toksisia [1], [12].

Kirjallisuudessa keskustellaan, onko PS-sidoksen kiraalisuudella merkitystä ASO:n farmakologisiin ominaisuuksiin. On todettu, että Sp-konfiguraatio tekee ASO:sta stabiilimman nukleaaseja vastaan, kun taas Rp-konfiguraatiolla on parempi sitoutuminen RNA:han [15]. On myös havaittu, että 3'-SpSpRp-5'-stereokemiallinen yhdistelmä parantaisi RNAasi H -aktiivisuutta eniten *in vivo* ja *in vitro* [16]. Toisaalta on havaittu, että kiraalisuuden stereokontrollointi ei merkittävästi parantanut ASO:n terapeutista potentiaalia [15]. Havaittiin, ettei PS-kiraalisuuden kontrolloimisella saatu nopeampi pilkkoutuminen korreloinut lisääntyneen tehon kanssa soluissa tai hiirissä. Huomattiin myös, että paljon Rp-konfiguraatiota sisältävät toksisen mallin ASO:t aiheuttivat enemmän kaspasiin aktivaatiota ja p54nrb:n väärää lokalisaatiota, eli olivat toksisempia kuin stereosatunnaiset ASO:t, mutta paljon Sp-konfiguraatiota sisältävät ASO:t aiheuttivat myös kaspasiin aktivaation. Puolestaan ikkuna-alueella täysin Sp-konfiguraatiota sisältävä ASO ei aiheuttanut p54nrb:n väärinsijoittumista, mutta oli teholtaan vain kymmenesosan stereosatunnaiseen ASO-juosteeseen verrattuna. Kyseisessä tutkimuksessa todettiin myös optimaalisena konfiguraatiokaavana pidetyn SpSpRp-mallin olevan teholtaan verrattavissa stereosatunnaiseen ASO-juosteeseen. Toksisen mallin SpSpRp-ASO osoitti toisaalta vähentyneitä kaspasiin nousua stereosatunnaiseen ASO-juosteeseen verrattuna, mutta aiheutti kuitenkin ALT-arvon nousua hiirillä [15].

PS-sidokset parantavat huomattavasti ASO:iden sitoutumista proteiineihin [12]. Koska rikkiatomi on suurempi kuin happiatomi, PS-sidoksen varausjakauma, sidoskulmat ja venytys eroaa olennaisesti PO-sidoksista. Rikin suurempi koko levittää varausjakautumaa laajemmalle alueelle ja tekee PS-ASO:sta suhteellisesti rasvaliukoisemman kuin PO-ASO:t. Plasmaproteiineihin sitoutuminen on tärkeää PS-ASO:iden jakautumiselle kudoksiin. Ilman plasmaproteiinisitoutumista ASO:t huuhtoutuisivat nopeasti munuaisissa, jolloin ne eivät pääsisi leviämään kaukana oleviin kudoksiin. PS-ASO:t kuitenkin sitoutuvat lukuisiin proteiineihin plasmassa eri sitoutumisaffiniteeteilla. Albumiiniproteiinin pitoisuus plasmassa on korkea, joten PS-ASO:iden sitoutuminen plasman albumiiniin on keskeistä. Merkittävä sitoutuminen plasman proteiineihin vaatii noin 10-12 PS-sidosta. Suurin osa PS-ASO:iden soluunotosta tapahtuu endosomien kautta. PS-ASO:t pääsevät soluun pintaproteiinien kautta joko suoraan sitoutumalla tai konjugoitujen ligandien välityksellä [12].

Sen lisäksi, että proteiinit määrittävät pitkälti ASO:iden toiminnan elimistössä, ASO:t myös vaikuttavat monien proteiinien toimintaan, joiden kanssa ne vuorovaikuttavat [1], [12]. Paraspeckle-proteiinit, kuten p54nrb, ovat välttämättömiä useille soluprosesseille, muun muassa transkriptiolle, silmukoinnille, translaatiolle ja DNA:n korjaamiselle. PS-ASO:t, joissa

on toksinen sekvenssi, on havaittu sitoutuvan paraspeckle-proteiineihin suurella affiniteetilla. Toksiset PS-ASO:t myös aiheuttavat paraspeckle-proteiinien väärinsijoittumisen tumajyväseen, mikä estää esilähetti-RNA:n transkriptiota ja prosessointia. Tämä laukaisee stressin tumajyväsessä ja johtaa lopulta apoptoottiseen solukuolemaan. Erilaisilla riboosisokerin 2' -modifikaatioilla, sekä selkärankarakenteen MsPA-modifikaatiolla on pystytty vähentämään tätä toksisuutta [12],[13].

Mesyylifosforamidaatti

Mesyylifosforamidaatti (MsPA) on potentiaalinen kandidaatti selkärankarakenteen modifikaatioksi, koska sen on havaittu lisäävän nukleasiresistenssiä, joka pidentää sen vaikutusaikaa PS-sidoksiin verrattuna [13]. Vain harvat modifikaatiot tukevat RNAasi H -aktiivisuutta ikkuna-alueella, ja MsPA on yksi niistä. MsPA-sidosten lisääminen vähensi epäspesifistä proteiinisitoutumista ja syto- ja maksatoksisuutta. MsPA-linkkeri lisättiin ASO:ihin Staudingerin reaktiolla, jossa metaanisulfonyyliatsidi reagoi kolmiarvoisen fosfiittivälituotteen kanssa, joka on valmistettu fosforamidiittikytkennällä [13].

MsPA-sidoksen sijoittaminen tiettyyn kohtaan vaikuttaa ASO:n aktiivisuuteen ja toksisuuteen [13]. MsPA-modifikaation optimaalista paikkaa tutkittiin toksisen sekvenssimallin PS-ASO:ssa, jossa on siivissä cET-riboosisokerimodifikaatiot. MsPA-ASO:n antisense-aktiivisuutta ja toksisuutta tutkittiin soluissa. Kun MsPA:ta sijoitettiin koko ikkuna-alueelle, vähensi se ASO:n sytotoksisuutta, mutta myös tehoa verrattuna täysin PS-modifioituun toksisen mallin ASO-juosteeseen. Sen sijaan MsPA:n sijoittaminen siipiin ei vähentänyt sytotoksisuutta tai tehoa. Seuraavaksi tutkittiin, voisiko paikkakohtainen PS:n korvaaminen MsPA:lla ikkuna-alueella säilyttää tehon ja vähentää sytotoksisuutta. Yhden MsPA-sidoksen lisäämisellä oli vain minimaalinen vaikutus tai ei ollenkaan vaikutusta tehoon tai sytotoksisuuteen. Kahden MsPA-sidoksen lisäämisellä havaittiin selvempi vaikutus ja havaittiin merkittävää sytotoksisuuden vähenemistä, kun MsPA sijoitettiin 2, 3 ja 3, 4 aseisiin 5'-cET/DNA-liitoskohdasta.

3-5 MsPA-sidosta 5' puolen ikkuna-alueella vähensi toksisen ASO-mallin maksatoksisuutta hiirissä ilman tehon heikkenemistä. Alkuperäinen PS-ASO on erittäin myrkyllinen 15mg/kg GalNAc-konjugaattina annosteltuna, kun taas MsPA-modifioiduista ASO:ista 3 MsPA-sidosta sisältävä ASO oli hieman maksatoksinen, sillä mitattu ALT-arvo oli vähän koholla. Puolestaan 4 ja 5 MsPA-sidosta sisältävät ASO:t olivat turvallisia tällä annoksella. Kyseisessä

tutkimuksessa 4 MsPA-sidosta sisältävä ASO osoitti optimaalisen tehon sekä syto- ja maksatoksisuuden lieventämisen.

MsPA-sidoksen kiraalisuuden kontrolloimisella ei havaittu parempaa tehoa, terapeutista indeksia tai nukleasiresistenssiä raseemiseen MsPA-linkkeriin verrattuna, kun tutkittiin kahden vierekkäisen MsPA-sidoksen stereokemiaa. Tutkittiin myös MsPA-modifioinnin vaikutusta PS-ASO:iden proteiinisitoutumisominaisuuksiin. MsPA-ASO:ita arvioitiin NanoBRET-määrittelyllä ja tähän käytettiin kolmea malliproteiinia; PC4, yksijuosteinen sitova proteiini (SSBP) ja RNAasi H1. Kaikkien PS-sidosten korvaaminen ASO:ssa tai vain ikkuna-alueella vähensi merkittävästi epäspesifistä proteiinisitoutumista. Kahden MsPA-sidoksen lisäämisellä PS-ASO-juosteeseen oli minimaalinen vaikutus, jos ne sijoitettiin 5'- tai 3'-cET-siipiin, kun taas ikkuna-alueella proteiinisitoutumisen lieventävä vaikutus oli voimakkaampi. Vähentynyt proteiinisitoutuminen liittyi myös vähentyneeseen toksisuuteen hiiren maksassa ja vähentyneeseen p54nrb-paraspeckleproteiinin väärinsijoittumiseen tumajyväseen soluissa, mikä viittaa siihen, että MsPA-modifikaatio vähentää apoptoottista solukuolemaa.

PS-ASO:t voivat aiheuttaa tulehdusta edistäviä vaikutuksia solu- ja eläinmalleissa, jotka ovat PS- ja sekvenssirippuvaisia. Tulehdusta edistäviä vaikutuksia tutkittiin kolmella tulehdusta edistävällä ASO-mallilla, joissa arvioitiin MsPA-modifikaation merkitystä sytokiinin induktioon BJAB-soluissa. ASO:issa korvattiin joko kaksi PS-sidosta MsPA:lla ASO:n kummassakin päässä, tai korvattiin kolme PS-sidosta MsPA:lla 3'- tai 5'-päässä ikkuna-alueella. MsPA 3'-päässä ikkuna-alueella vähensi tulehdusta lisäävää vaikutusta parhaiten 3-10-3 -cET-gapmeeri-ASO:ssa, kun taas 3-14-3 -MOE-gapmeeri-ASO:ssa parhaan vasteen antoi 5'-päässä ikkuna-alueella oleva MsPA-modifikaatio. Nämä havainnot viittaavat siihen, että kemiallinen modifikaatio voi vaikuttaa ASO:n vuorovaikutukseen immuunijärjestelmän proteiinien kanssa ja MsPA:lla voidaan vähentää näitä vuorovaikutuksia ja vähentää tulehdusta lisääviä vaikutuksia.

MsPA-sidos paransi myös nukleasiresistenssiä, ja testattiin voisiko PS-sidoksen korvaaminen MsPA:lla ikkuna-alueella pidentää ASO:n farmakodynaamisen vaikutuksen kestoa hiirissä. Tästä oltiin erityisen kiinnostuneita siksi, että PS-ASO:issa DNA:sta koostuva ikkuna-alue on herkempi metaboliselle hajoamiselle kuin 2'-modifioidut siivekkeet. Tutkimuksessa arvioitiin 3-10-3 -cET-gapmeeri-ASO:ita, jotka kohdistuivat hiiren FXII-proteiiniin, joka syntetisoituu hepatosyyteissä ja erittyy veressä toimien siten antisense-aktiivisuuden markkerina maksassa.

Neljän PS-sidoksen korvaamisella MsPA:lla ikkuna-alueella oli merkittävä vaikutus ASO:n kestoon. Tämä tulos viittaa siihen, että ASO:n annosteluväliä potilaalle voitaisiin mahdollisesti pidentää jopa neljästi tai kahdesti vuodessa annosteltavaksi [13].

Amidi

Amidisidos (AM) selkärankarakenteessa on mielenkiintoinen modifikaatio kandidaatti sen varausneutraalisuuden ja akiraalisuuden takia [5]. AM-ASO:n syntetisointiin voidaan käyttää vakiintunutta kiinteän faasin peptidisynteesimenetelmä. AM-sidosta ei voida kuitenkaan sijoittaa ASO:n ikkuna-alueelle, sillä se ei tue RNAasi H -aktivaatiota.

AM-sidoksen lisäämistä ASO:n ikkuna-alueelle tutkittiin lisäämällä yksittäisiä AM-sidoksia muuten modifioimattomalle, fosfodiesterisidoksista koostuvalle ikkuna-alueelle [5]. AM-ASO:n kykyä aktivoida RNAasi H -välitteinen pilkkoutuminen testattiin fluoreseinilla leimatulla kohde-RNA:lla. Kohde-RNA:n pilkkoutumista ei kuitenkaan havaittu AM-ASO:illa, vaan ainoastaan kontrolli-ASO:lla. Tämä tarkoittaa sitä, ettei AM-sidosta voida sijoittaa RNAasi H -aktiivisen ASO:n ikkuna-alueelle.

AM-sidosta testattiin myös PO-ASO:n siivekkeissä. Kontrolleina käytettiin PO-ASO:ita, joista toinen oli täysin modifioimaton ja toisessa siivekkeet olivat 2'-OMe modifioidut. Reaktiopuskurit, jotka sisälsivät E. Coli RNAasi H:ta, fluoreseinilla leimatua kohde-RNA:ta ja katalyyttisen määrän ASO:ta analysoitiin geelielektroforeesilla. Geelit osoittavat, että kaikki testatut ASO:t aiheuttavat täydellisen kohde-RNA:n hajoamisen 30 minuutissa 37°C:ssa. Kvantitointi vahvisti, että AM-gapmeeri-ASO aktivoi RNAasi H:n yhtä tehokkaasti kuin kontrollit. Tämä todistaa sen, että AM-modifikaatio voidaan sijoittaa ASO:n siipiin häiritsemättä RNAasi H -aktivaatiota, ja että AM-ASO toimii katalyyttisesti.

Tutkittujen gapmeeri-ASO:iden sulamislämpötilojen ei havaittu vaikuttavan kohde-RNA:n katkaisunopeuksiin. AM-modifikaatio heikentää hieman kaksoiskierteen pysyvyyttä kohde-RNA:n kanssa, verrattuna 2'-OMe-modifikaatioon, joka lisää affiniteettia kohde-RNA:han. AM-modifikaatio ei aiheuttanut merkittävää häiriötä kierteisyyteen sirkulaaridikroismikokeissa (circular dichroism experiment) modifioimattomaan ASO:hon verrattuna, mikä on johdonmukaista AM-ASO:n korkean RNAasi H -vasteen kanssa.

AM-ASO:n nukleasiresistenssiä tutkittiin naudan sikiön seerumissa. AM-modifikaatio paransi ASO:n nukleasiresistenssiä ja pidentäsi ASO:n käyttöikää seerumissa modifioimattomaan ja 2'-OMe-ASO-juosteeseen verrattuna, jotka molemmat hajosivat

nopeasti seerumissa. Kyseisessä tutkimuksessa AM-ASO:n nukleasiresistenssiä ei verrattu muihin selkärankarakenteesta modifioituihin ASO:ihin.

AM-ASO:n soluunoton tehoa testattiin konfokaalisella laserpyyhkäisymikroskopiolla (CLSM). Tässä kokeessa AM-gapmeeri-ASO ja kontrolli-ASO:t leimattiin fluoresoivasti 5'-päästä. HeLa-soluja inkuboitiin näiden ASO:iden kanssa seerumittomassa alustassa ja analysoitiin CLSM:llä kiinnityksen jälkeen. Vähemmän negatiivista varausta sisältävä AM-ASO osoitti lisääntyntä solunsisäistä kertymistä kontrolli-ASO:ihin verrattuna, joissa jokainen sidos on negatiivisesti varautunut fosfodiesterisidos [5].

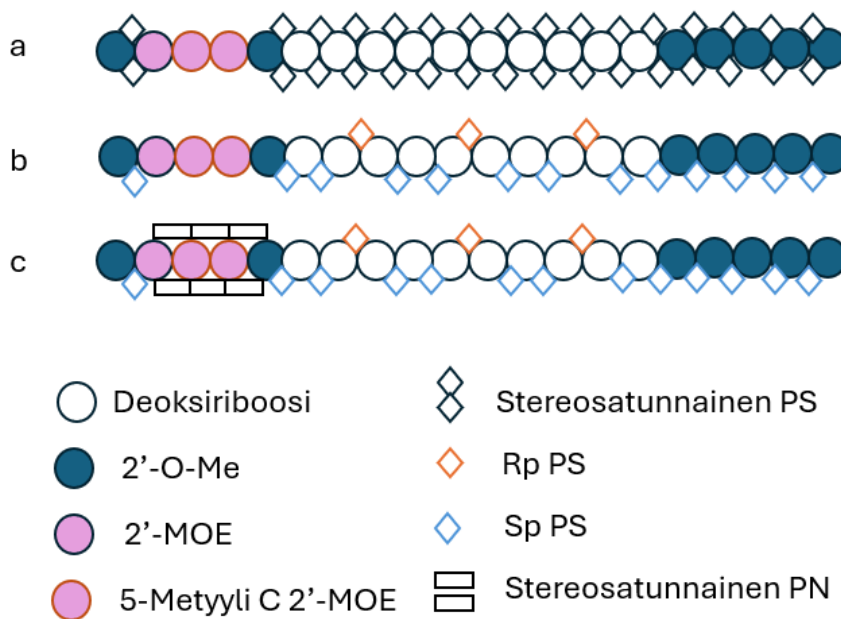
Fosforyyliguanidiinidiesteri

ASO:n, jossa on SpSpRp-konfiguraatioyhdistelmän PS-linkkereitä ja fosforyyliguanidiinidiesterilinkkereitä (PN), on havaittu lisäävän kudosalvistusta aivoissa [7]. Niillä on havaittu tehokkaampi ja kestävämpi aktiivisuus koko keskushermostossa, verrattuna selkärankarakenteesta ainoastaan PS-modifioituihin ASO:hin. PN-sidoksen lisääminen siipiin lisäsi hiljentymistä todennäköisesti RNAasi H:sta riippumattomalla mekanismilla, koska PN-sidoksia sisältävät ASO:t eivät eronneet stereopuhasta PS/PO-ASO:ista RNAasi H -kokeissa, joissa arvioitiin niiden aktiivisuustasoja ja katkaisukuvioita. Tehon kasvu ei todennäköisesti johtunut myöskään sulamislämpötiloista, koska PN-sidokset eivät oleellisesti muuttaneet heterodupleksien lämpöstabiilisuutta kohde-RNA:han [7].

Fosforyyliguanidiinidiestereitä on monenlaisia, ja niitä voidaan käyttää parantamaan ASO:n ominaisuuksia [7]. PN-sidoksessa olevan imidatsolidiinirenkaan kokoa voidaan muuttaa. Havaittiin, että PN-sidokset, joissa rengaskoko on 5-7 atomia olivat hyvin vertailukelpoisia keskenään aktiivisuuden suhteen ASO:issa. Tästä syystä lisätutkimuksia päätettiin tehdä 5-renkaisella PN-sidoksella, sillä sen valmistamiseen tarvittava atsidireagenssi oli helposti saatavilla. PN-sidosten syntetisoimiseen käytettiin fosforamidititeja ja atsidireagensseja.

Metastaasiin liittyvä keuhkojen adenokarsinooman transkripti 1 (Malat1) koodaa kaikkialla ilmentyvää pitkää ei-koodaavaa RNA:ta, ja sitä voidaan käyttää kohde-RNA:na, kun arvioidaan kemiallisten modifikaatioiden vaikutusta RNAasi H -aktiivisiin ASO:ihin. Malat1 sijaitsee pääasiassa tumassa, ja sitä on myös aivokudoksissa, jonka takia se valittiin tutkittavaksi kohdetranskriptiksi, kun arvioitiin selkärankarakenteen modifikaatioiden ja stereokemian vaikutusta ASO:n farmakologiaan keskushermostossa.

PN-modifikaation vaikutusta ASO:n aktiivisuuteen testattiin lisäämällä 3-4 PN-linkkeriä PS-modifikaatioita sisältävän ASO:n siipiin. PN-sidoksia lisättiin ainoastaan sellaisiin ASO:ihin, joissa ikkuna-alueella oli SpSpRp-konfiguraatiokaavan mukaisia PS-sidoksia, koska aiemmin oltiin todettu niiden olevan tehokkaampia kuin stereosatunnaisten ASO-juosteiden (Kuva 4). Valmistettuja ASO-juosteita arvioitiin biokemiallisissa määrityksissä, joissa mitattiin lämpöstabiilisuutta, RNAasi H -aktiivisuutta ja katkaisukohtaa, sekä Malat1 vähentymistä viljellyissä ihmisen iCell-hermosoluissa. PN-sidoksia sisältäviä ASO-juosteita vertailtiin ASO-juosteisiin, joissa oli PO- ja PS-sidoksia. PN-sidosten lisääminen ei muuttanut olennaisesti heterodupleksien lämpöstabiilisuutta. Stereopuhdas PS/PO-ASO, jossa ikkuna-alueella on SpSpRp-konfiguraatio, oli aktiivisempi RNAasi H -määrityksissä, kuin stereosatunnainen PS/PO-ASO. PN-sidosten lisääminen siipiin ei muuttanut tätä biokemiallista aktiivisuutta. Solumäärityksissä huomattiin, että PN-sidoksia sisältävät ASO:t olivat aktiivisempiä kuin PS/PO-ASO:t. Samankaltainen hiljentävä vaikutus hermosoluissa havaittiin kaikilla PN-ASO:illa, ja silloin kun PN-sidosten kiraalisuutta ei kontrolloitu, tai kun PN-sidokset olivat kaikki joko Rp- tai Sp-konfiguraatioissa.



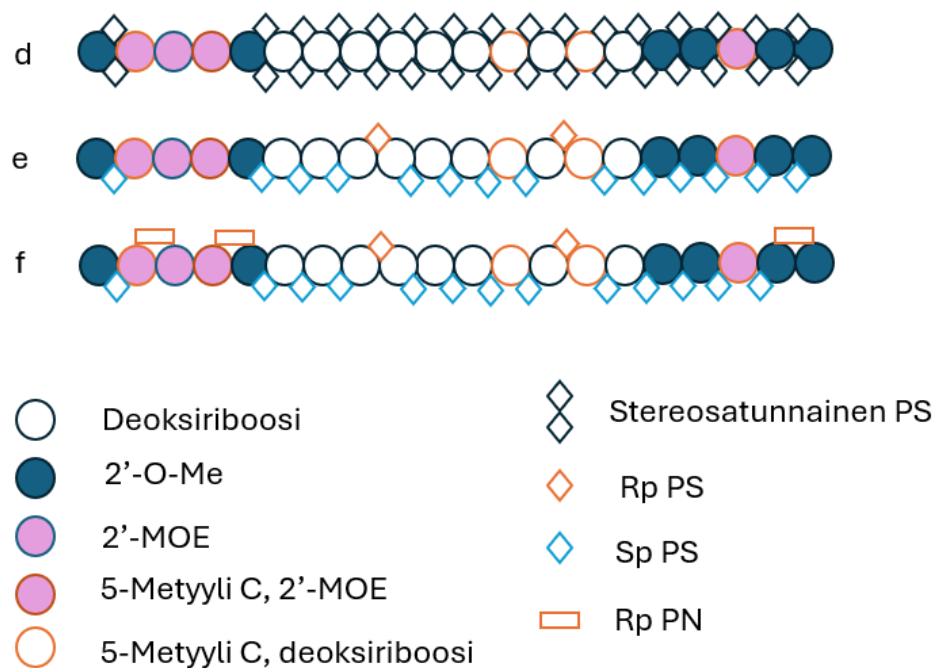
Kuva 4. Malat 1 RNA:han kohdistuvia PS/PO- ja PS/PN-ASO:ita. A, stereosatunnainen PS/PO-ASO. B, stereopuhdas PS/PO-ASO, joka oli 10 kertaa tehokkaampi kuin a. iCell-hermosoluissa. C, PS/PN-ASO, jossa PN-sidokset ovat stereosatunnaisia, oli 10 kertaa tehokkaampi kuin b. ja 70 kertaa tehokkaampi kuin a. iCell-hermosoluissa. B:tä ja c:tä käytettiin myös tutkimaan Malat1:n ilmentymistä hiirillä. Selkäytimessä c:tä voitiin annostella puolet vähemmän jotta saatiin aikaan sama vaikutus kuin b:llä, ja aivokuoressa c:tä voitiin

annostella neljäsosa b:n annostuksesta, jotta saatiin sama vaikutus. 2'-O-Me, 2'-O-metyyli; 2'-MOE, 2'-O-metoksietyyli; PS, fosforotioaatti; PN, fosforyyliguanidiinidiesteri. Kuva on mukailtu lähteestä [7].

Tutkittiin, ilmeneekö PN-linkkerin iCell-hermosoluissa havaittu tehon parantuminen myös *in vivo*-kokeissa keskushermostossa, arvioimalla Malat1:n villityyppialleelin (wild type) ilmentymistä hiirillä. PN-linkkereitä sisältävien ja sisältämättömien ASO:iden aktiivisuutta arvioitiin selkäytimessä ja aivokuoressa. Stereopuhdas PS/PO-ASO vähensi Malat1:n ilmentymistä selkäytimessä 10 tai 20 µg kerta-annoksella 50% verrattuna kontrolliin, fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS) perfusoituun hiireen. Puolestaan yksi 5µg annos PN-linkkeriä sisältävää ASO:ta vähensi ilmentymistä saman 50%, ja 20 µg annos vähensi Malat1:n ilmentymistä 8%:iin. Aivokuoressa tarvittiin 20 µg annos stereopuhdasta PS/PO-ASO:ta vähentämään Malat1:n ilmentymää noin 50%, kun taas PS/PN-ASO vähensi ilmentymistä vastaavan määrän 5µg annoksella. Havaittiin siis, että PN-modifikaatio ASO:n siivissä lisäsi ASO:n tehoa sekä selkäytimessä että erityisesti aivokuoressa. PN-linkkerin havaittiin myös pidentävän vaikutuksen kestoa. Havaittiin, että neljän viikon kuluttua 100 µg injektiosta suoraan aivokammion aivo-selkäydinnesteeseen (ICV-injektio) stereopuhdas PS/PO-ASO ja PS/PN-ASO vähensivät Malat1-RNA:n ilmentymistä yhtä paljon. Mutta 10 viikon kuluttua PS/PO-ASO:lla hoidetuilla eläimillä Malat1:n ilmentyminen oli palannut ja oli yli 50% kaikissa tutkituissa keskushermoston kudoksissa. Puolestaan PS/PN-ASO:lla hoidetuilla eläimillä ilmentyminen pysyi alle 20%:ssa normaalista ilmentymistasosta, ja joka pysyi muuttumattomana 4 viikon kohdalla mitatusta tasosta.

Lisäksi testattiin, voidaanko PN-modifikaatiolla parantaa ASO:iden aktiivisuutta ja farmakologiaa, kun kohteena on C9orf72-geeni (Kuva 5). C9orf72 on haastavampi kohde kuin Malat1, koska halutaan saavuttaa alleeliselektiivinen aktiivisuus transkriptimuunnelmien osajoukosta. Tavoitteena oli vähentää V3-variantin osuutta ja säilyttää V2-variantti, joka on yleisin C9orf72-transkripteistä. Syntetisoitiin PN-modifikaatiota sisältäviä ASO:ita, ja niiden aktiivisuutta vertailtiin stereosatunnaisiin ja stereopuhdaisiin PS/PO-kontrolleihin viljellyissä motorisissa hermosoluissa. Kaikilla oligonukleotidella on sama 2'-riboosimodifikaatioiden asymmetrinen malli (pattern) ja sama sekvenssi. Nämä oligonukleotidit suunniteltiin poistamaan selektiivisesti C9orf72-toistolajennusmutaation (repeat-expansion mutation) sisältäviä transkriptejä, ja siksi niitä tutkittiin ihmisen iPSC-johdannaisissa motorisissa hermosoluissa. Hermosolut oli tuotettu amyotrofisen lateraaliskleroosipotilaan (ALS) soluista, jotka sisältävät C9orf72-heksanukleotiditoiston mutaation. Kuten Malat1:n kohdalla, havaittiin

että PS/PO/PN-ASO:t olivat tehokkaampia kuin niiden stereopuhdaat ja stereosatunnaiset PS/PO-vastineet. 0,4 μM stereopuhdasta PS/PO-ASO:ta aiheutti noin 60% C9orf72 V3 - transkriptin vähenemisen, kun taas 2 μM stereosatunnaista vastinetta aiheutti vastaavan tuloksen. PS/PO/PN-ASO:iden kohdalla 0,08 μM tuotti keskimäärin 50% C9orf72 V3 - transkriptin vähenemisen, ja 2 μM keskimäärin 95% vähenemiseen. Halutun vaikutusmekanismin aikaansaamiseksi C9orf72-toistolaajennukseen kohdistuvien ASO:iden on säästettävä V2:n ilmentyminen, ja tätä tutkittiin arvioimalla PS/PO/PN-ASO:iden aktiivisuutta kaikilla C9orf72-transkriptin varianteilla ALS-motorisissa hermosoluissa. ASO:t joissa PN-sidokset ovat Rp-konfiguraatiossa, säilyttivät yli 50% C9orf72-transkriptin kokonaisilmentymästä kaikilla testatuilla pitoisuuksilla. Ne olivat tehokkaita V3:ta vastaan ja selektiivisiä sille. ASO:t, joissa PN-sidokset ovat stereosatunnaisia tai Sp-konfiguraatiossa todettiin liian tehokkaiksi kaikkia variantteja kohtaan.



Kuva 5. C9orf72-transkriptiin kohdistuvia ASO:ita. D, stereosatunnainen PS/PO-ASO; e, stereopuhdas PS/PO-ASO; f, stereopuhdas PS/PO/PN-ASO. E ja f ovat alleeliselektiivisiä V3-transkriptin suhteen, säilyttäen V2-variantin. PN-linkkeri paransi f:n tehoa ja vaikutuksen kestoja keskushermostossa. 2'-O-Me, 2'-O-metyyli; 2'-MOE, 2'-O-metoksietyyli; PS, fosforotioaatti; PN, fosforyyliguanidiinidiesteri. Kuva on mukailtu lähteestä [7].

PN-modifikaatio pidensi myös ASO:n vaikutusta hiiren aivokuoressa. Tätä tutkittiin vertailemalla C9orf72:seen kohdistuvien ASO:iden aktiivisuutta hiiren keskushermostossa

keskittyen kudoksiin, joihin C9orf72-toistolaaajennusmutaation aiheuttama patologia vaikuttaa, esimerkiksi frontotemporaalisessa dementiaassa (FTD) ja ALS-taudissa. Aktiivisuuden kestoa arvioitiin mittaamalla C9orf72 V3:n ilmentymistä selkäytimessä ja aivokuoressa 2, 4 ja 8 viikkoa ICV-injektion jälkeen. Aiemmin oltiin tutkittu, että nämä C9orf72-transkriptiin kohdistuvat ASO:t olivat hyvin siedettyjä hiirillä 100 µg ICV-injektiona annosteltuna. Stereopuhdas PS/PO-ASO vähensi merkittävästi V3-ilmentymistä verrattuna BPS-kontrolliin selkäytimessä, kun keskimääräinen C9orf72 V3 -ilmentyminen 2 viikon kohdalla oli 31%, 4 viikon kohdalla 28% ja 8 viikon kohdalla 67%. PS/PO/PN-ASO tuotti tehokkaamman ja pidempikestoisen hiljennyksen selkäytimessä, C9orf72 V3 -ilmentymisen ollessa 2 viikon kohdalla 18%, 4 viikon kohdalla 14% ja 8 viikon kohdalla 16%. Stereopuhdas PS/PO-ASO ei ollut yhtä tehokas aivokuorella, koska C9orf72 V3 -ilmentyminen oli 2 viikon kohdalla 80%, 4 viikon kohdalla 68% ja 8 viikon kohdalla 88%. Puolestaan PS/PO/PN-ASO:lla C9orf72 V3 -ilmentyminen aivokuoressa oli 2 viikon kohdalla 54%, 4 viikon kohdalla 48% ja 8 viikon kohdalla 30%. Näistä tuloksista huomataan, että PN-sidoksen lisääminen paransi aktiivisuutta ja kestoa keskushermostossa. Havaittiin myös, että PN-sidoksia sisältävän ASO:n parempi aktiivisuus ei riippunut ainoastaan kudosalitukseen lisääntymisestä. Tutkittiin vielä, että säilyykö V2-variantti arvioimalla kaikkien C9orf72-transkriptin varianttien ilmentymistä siirtogeenisillä hiirillä. Tutkittiin lisäksi C9orf72-proteiinin ilmentymistä, sillä kyseisen proteiinin säilyttäminen riittävällä tasolla haploinsufektiivisuuden välttämiseksi on pääasiallinen syy varianttiselektiivisen lähestymistavan valitsemiseen. 8 viikkoa kestäneessä kokeessa hiirillä havaittiin kaikkien C9orf72-varianttien yli 50%:n ilmentyminen kaikkina arvioituina ajankohtina selkäytimessä ja aivokuorella molemmilla ASO:illa. Nämä C9orf72-transkriptin ilmentymistasot olivat riittäviä säilyttämään C9orf72-proteiinin ilmentymisen, eikä havaittu merkittäviä muutoksia proteiinin ilmentymisessä selkäytimessä tai aivokuoressa PBS-kontrolleihin verrattuna. Nämä tiedot osoittavat, että PN-sidokset lisäävät tutkitun ASO:n aktiivisuutta keskushermostossa säilyttäen alleeliselektiivisen vaikutusmekanismin C9orf72-transkriptin variantteja kohtaan [7].

Etynyylifosfonaatti

Etynyylifosfonaattimodifikaatiolla (EP) voidaan säädellä RNAasi H -välitteistä katkaisukohtaa, ja se on siksi potentiaalinen lääkekehityksen kohde alleeliselektiivisestä näkökulmasta [10]. EP-sidos syntetisoitiin kahden tymidiinin välille palladiumkatalysoidulla ristikytkentä-reaktiolla. Yleensä ASO-juosteiden synteesissä 5'-asemassa oleva hydroksyyli-ryhmä toimii nukleofiilinä synteesin aikana. Tätä ei voitu hyödyntää EP-modifikaation liittämiseen, joten

valmistettiin EP-sidoksen sisältävä dimeeri, jota käytettiin oligonukleotidisynteesissä. EP-sidoksen sisältävä dimeeri syntetisoitiin palladiumkatalysoidun H-fosfonaatin ja dibromialkeenin ristikytkennällä. EP-sidoksia sisältävien oligonukleotidien synteesi suoritettiin automatisoidulla DNA-syntetisaattorilla [10].

Dupleksin muodostuskykyä mitattiin UV-sulamiskokeiden avulla ja saatiin selville, että tutkimuksessa käytettyjen ASO-juosteiden affiniteetti heikkeni ja dupleksin sulamislämpö laski 3-4°C astetta, kun ASO-juosteeseen lisättiin yksi EP-sidos [10]. Yhdistämällä EP-modifikaatio ja 2',4'-BNA/LNA-modifikaatio, saatiin dupleksin sulamislämpöä kasvatettua luonnolliseen vastineeseen verrattuna. PO- ja EP-linkitettyjä dimeereitä tutkittiin sirkulaaridikroismilla, ja havaittiin, että EP-linkitetyn dimeerin intensiteetti oli heikompi kuin PO-linkitetyn dimeerin. EP-sidosten havaittiin siis häiritsevän emäs-emäs -vuorovaikutusta ja tämä tulos on yhtenevä sulamislämpömittausten kanssa. Puolestaan 2',4'-BNA/LNA-modifikaation sisältävä dimeeri paransi intensiteettiä luonnolliseen dimeeriin verrattuna. Dimeeri, jossa oli sekä EP-linkkeri että 2',4'-BNA/LNA-modifikaatio, oli intensiteetiltään samankaltainen luonnollisen dimeerin kanssa. 2',4'-BNA/LNA-modifikaatiolla pystyttiin siis palauttamaan EP-linkkerin aiheuttama emäspinoutumisen heikkeneminen.

EP-linkkerin sisältävien oligonukleotidien nukleasiresistenssiä testattiin 3'- ja 5'-eksonukleaaseja vastaan. EP-sidos lisäsi vähän stabiilisuutta 3'-eksonukleaasia vastaan. Puolestaan 5'-eksonukleaasia vastaan EP-sidos osoitti korkeaa stabiilisuutta. Huomattavasti parantunut stabiilisuus 5'-eksonukleaasia vastaan selittyy etynyylisubstituentin alhaisella reaktiivisuudella.

Arvioitiin myös EP-sidoksen sisältävien oligonukleotidien kyky aktivoida RNAasi H. Valmistettiin 14-meerisiä gapmeeri-ASO-juosteita, joiden siivekkeet oli 2'-O-metyylimodifioituneet, ja ikkuna-alue koostui tymiiniemäksistä. Vertailtiin ASO:ita, joissa ikkuna-alue oli täysin PS-modifioitu, ja ASO:ita, joissa yksi PO-sidos oli korvattu EP-sidoksella neljässä eri kohdassa. Kun ASO:t olivat muodostaneet dupleksirakenteen fluoreseenillä 5'-päästä leimattuun kohde-RNA:han, lisättiin RNAasi H ja seosta pidettiin 37°C:ssa 40 minuuttia. Sen jälkeen seos erotettiin denaturoivalla ureapolyakryyliamidigeelielektroforeesilla ja pilkottuja leimatun kohde-RNA:n 5'-fragmenteja seurattiin fluoresenssikuvauksjärjestelmällä. Havaittiin, että täysin PO- ja PS-sidoksia sisältäneet ASO:t indusoivat pääasiassa kohde-RNA:n pilkkoutumisen 3'-pään siivekkeen ja ikkuna-alueen välisestä kohdasta. EP-sidoksella modifioituneet ASO:t puolestaan muuttivat kohde-RNA:n

katkaisukohtia. EP-sidoksen sisällyttäminen RNAasi H:n tunnustusalueeseen johti vähentyneeseen entsyymaattiseen hydrolyysiin vastaavassa kohdassa. Tämä tarkoittaa sitä, että katkaisukohtia voidaan ohjata EP-modifikaatiolla. Tämän ominaisuuden ansiosta on mahdollista, että EP-modifioituja ASO:ita voitaisiin hyödyntää alleeliselektiiviseen geenisäätelyyn [10].

Johtopäätökset ja yhteenveto

ASO:iden tutkiminen terapeuttisena lääkeaineena on lisääntynyt, ja vaikka monia haasteita on jo ylitetty, haasteita on edelleen. Eri selkärankarakenteen modifikaatioilla on erilaisia vaikutuksia ASO:n ominaisuuksiin. PS-modifikaatio on tutkituin selkärankarakenteen modifikaatio, ja PS-ASO:n etu muihin ASO:ihin on sen kyky sitoutua proteiineihin, joka parantaa sen jakaantumista ja soluunpääsyä [1]. Yleensä ASO:iden soluunpääsy on haasteellista niiden koon ja varauksen vuoksi. PS-ASO:t pääsevät kuitenkin suhteellisen helposti soluun, koska ne pystyvät sitoutumaan suoraan solun pintaproteiineihin [12]. PS-modifikaation käyttö terapeuttisissa ASO:issa ei ole kuitenkaan täysin ongelmatonta, koska epäspesifinen proteiinisitoutuminen aiheuttaa toksisuutta. Ei tarkkaan tiedetä, miksi jotkut sekvenssit sitoutuvat tiukemmin paraspeckle-proteiineihin kuin toiset, mutta tiedetään, että paraspeckle-proteiineihin sitoutuminen on kytköksissä PS-ASO:iden toksisuuteen [12]. PS-modifikaation lisäksi tutkitaan muitakin selkärankarakenteen modifikaatioita, ja arvioidaan niiden farmakologisia ominaisuuksia. Varausneutraali AM-sidos parantaa soluunpääsyä luonnolliseen PO-sidokseen verrattuna, mutta sitä ei voida sijoittaa ASO:n ikkuna-alueelle [5]. Soluunottoa voidaan tehostaa myös muilla keinoilla, esimerkiksi konjugaatilla [1], [2]. Tämä saattaisi mahdollistaa muiden selkärankarakenteen modifikaatioiden käytön ASO:issa, jotka eivät muuten pääse kulkeutumaan soluun.

PS-ASO:iden yksi merkittävä haaste on epäspesifisestä proteiinisitoutumisesta aiheutuva toksisuus. Tähän ongelmaan pyritään löytämään ratkaisua modifikaatiolla, joka vähentää proteiinisitoutumista, mutta ei aiheuta tehon heikkenemistä [13], [5]. ASO:iden proteiinisitoutuminen johtuu pääasiassa PS-sidoksista, minkä takia hyvä ratkaisu epäspesifisen proteiinisitoutumisen vähentämiseen on vähentää PS-sidosten määrää, ja korvata osa PS-sidoksista toisella selkärankarakenteen modifikaatiolla [13]. Tästä syystä tutkittiin MsPA-sidosten lisäämistä PS-ASO:ihin, mikä samalla vähensi PS-sidosten lukumäärää ASO:ssa. MsPA-modifikaatio voitiin sijoittaa ASO:n ikkuna-alueelle häiritsemättä RNAasi H aktivaatiota. Tämä on merkittävää sen takia, koska MsPA-sidosten lisääminen ikkuna-alueelle

vähensi epäspesifistä proteiinisitoutumista ja sytotoksisuutta, kuin taas siipiin sijoitetuilla MsPA-sidoksilla ei ollut toksisuutta vähentävää vaikutusta. Tehon säilymisen ja toksisuuden vähentämisen kannalta optimaalista oli lisätä neljä MsPA-sidosta toksisen sekvenssimallin PS-ASO:n 5' puoleisen pään ikkuna-alueelle [13].

ASO:iden kudostargetointia pyritään parantamaan, jotta ASO:iden turvallisuutta voidaan lisätä. Keskushermostoon kohdentaminen on haastavaa, koska lääkkeen täytyy läpäistä veri-aivoeste. Tästä johtuen lääke täytyy annostella joko selkäydinkanavaan tai aivokammion sisään injektoidulla [4], [7]. ASO:n kestävyttä ja tehoa pyritään lisäämään keskushermostossa, jotta annoskoko voidaan pienentää ja annosväliä pidentää. Tässä on onnistuttu lisäämällä PN-modifikaatioita ASO:ihin [7]. PN-modifikaation tehoa tutkittiin keskushermostossa, kun kohteena oli Malat1 tai C9orf72-geeni, jonka kohdalla tutkittiin lisäksi alleeliselektiivisyyttä. Sekä Malat1- että C9orf72-kokeissa PN-modifikaation ansiosta annostuksen määrää voitiin vähentää ilman tehon heikkenemistä selkäytimessä ja aivokuoressa. Erityisen hyvin teho säilyi PN-modifikaation ansiosta, kun kohteena oli aivokuori. PN-modifikaation ansiosta teho oli siis parempi, ja PN-sidos pidensi myös vaikutuksen kestoa keskushermostossa sekä Malat1- että C9orf72-kohteen osalta [7].

Tulevaisuuden kannalta ASO:iden alleeliselektiivinen lähestymistapa on tärkeä huomioida [8]. Alleeliselektiivisessä lähestymisessä pyritään säilyttämään tyypillisesti esiintyvä (wild-type) alleeli ja vähentämään ainoastaan sairautta aiheuttavien alleelien ilmentyminen. Tällöin vaikutus voidaan kohdentaa suoraan esimerkiksi pistemutaatioon tai toistolaajennusmutaatioon (repeat-expansion mutation) [7], [8]. Alleeliselektiivinen lähestyminen mahdollistaa proteiinin ilmentymisen villityypin juosteesta, jolloin haitalliset sivuvaikutukset ovat vähäisemmät [8]. Alleeliselektiivisyyttä voidaan lisätä selkärankarakenteen modifikaatioiden stereokemialla kontrolloimalla [7]. PN-modifikaatioiden stereokontrollointi mahdollisti C9orf72-kohteen alleeliselektiivisen vaikutuksen. Vaikutus onnistuttiin kohdistamaan toistolaajennusmutaation sisältäviin variantteihin, säilyttäen villityypin alleeli [7]. On mahdollista, että alleeliselektiivisyyden voidaan vaikuttaa myös muuttamalla RNAasi H -entsyymin katkaisukohtia [10]. EP-modifikaatiolla voidaan ohjata katkaisukohtia, jonka takia on mahdollista, että EP-modifikaatiota voitaisiin hyödyntää alleeliselektiiviseen geenisäätelyyn [10].

Yhteenvetona voidaan todeta, että ASO:iden potentiaali neurologisten sairauksien hoitoon on merkittävä, ja selkärankarakenteen modifikaatioilla voidaan muokata ASO:iden

farmakologisia ominaisuuksia. Selkärankarakenteen modifikaatioilla voidaan vaikuttaa moniin ASO:iden ominaisuuksiin, kuten soluunottoon, toksisuuteen, kudostehdentämiseen ja alleeliselektiivisyyteen.

Lähteet:

- [1] S. T. Crooke, X. H. Liang, B. F. Baker, and R. M. Crooke, “Antisense technology: A review,” *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 296, 2021, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100416.
- [2] T. C. Roberts, R. Langer, and M. J. A. Wood, “Advances in oligonucleotide drug delivery,” *Nat Rev Drug Discov*, vol. 19, no. 10, pp. 673–694, 2020, doi: 10.1038/s41573-020-0075-7.
- [3] P. C. ZAMECNIK and M. L. STEPHENSON, “INHIBITION OF ROUS-SARCOMA VIRUS-REPLICATION AND CELL TRANSFORMATION BY A SPECIFIC OLIGODEOXYNUCLEOTIDE,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 75, no. 1, pp. 280–284, 1978, doi: 10.1073/pnas.75.1.280.
- [4] L. Mounné, A. C. Marie, and N. Crouvezier, “Oligonucleotide Therapeutics: From Discovery and Development to Patentability,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 2, 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14020260.
- [5] S. Epple, C. Thorpe, Y. R. Baker, A. H. El-Sagheer, and T. Brown, “Consecutive 5'- and 3'-amide linkages stabilise antisense oligonucleotides and elicit an efficient RNase H response,” *CHEMICAL COMMUNICATIONS*, vol. 56, no. 41, pp. 5496–5499, 2020, doi: 10.1039/d0cc00444h.
- [6] F. Alhamadani *et al.*, “Adverse Drug Reactions and Toxicity of the Food and Drug Administration-Approved Antisense Oligonucleotide Drugs,” *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION*, vol. 50, no. 6, pp. 879–887, 2022, doi: 10.1124/dmd.121.000418.
- [7] P. Kandasamy *et al.*, “Impact of guanidine-containing backbone linkages on stereopure antisense oligonucleotides in the CNS,” *Nucleic Acids Res*, vol. 50, no. 10, pp. 5401–5423, 2022, doi: 10.1093/nar/gkac037.
- [8] J. Helm, L. Schöls, and S. Hauser, “Towards personalized allele-specific antisense oligonucleotide therapies for toxic gain-of-function neurodegenerative diseases,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 8, 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14081708.
- [9] S. T. Crooke, J. L. Witztum, C. F. Bennett, and B. F. Baker, “RNA-Targeted Therapeutics,” *Cell Metab*, vol. 27, no. 4, pp. 714–739, 2018, doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.004.

- [10] M. Horiba, T. Yamaguchi, and S. Obika, "Synthesis and properties of oligonucleotides having ethynylphosphonate linkages," *JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY*, vol. 85, no. 4, pp. 1794–1801, 2020, doi: 10.1021/acs.joc.9b01318.
- [11] H. J. Gaus, R. Gupta, A. E. Chappell, M. E. Ostergaard, E. E. Swayze, and P. P. Seth, "Characterization of the interactions of chemically-modified therapeutic nucleic acids with plasma proteins using a fluorescence polarization assay," *Nucleic Acids Res*, vol. 47, no. 3, pp. 1110–1122, 2019, doi: 10.1093/nar/gky1260.
- [12] S. T. Crooke, T. A. Vickers, and X. H. Liang, "Phosphorothioate modified oligonucleotide-protein interactions," *Nucleic Acids Res*, vol. 48, no. 10, pp. 5235–5253, 2020, doi: 10.1093/nar/gkaa299.
- [13] B. A. Anderson *et al.*, "Towards next generation antisense oligonucleotides: mesylphosphoramidate modification improves therapeutic index and duration of effect of gapmer antisense oligonucleotides," *Nucleic Acids Res*, vol. 49, no. 16, pp. 9026–9041, 2021, doi: 10.1093/nar/gkab718.
- [14] M. Egli and M. Manoharan, "Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics," *Nucleic Acids Res*, vol. 51, no. 6, pp. 2529–2573, 2023, doi: 10.1093/nar/gkad067.
- [15] M. E. Ostergaard *et al.*, "Understanding the effect of controlling phosphorothioate chirality in the DNA gap on the potency and safety of gapmer antisense oligonucleotides," *Nucleic Acids Res*, vol. 48, no. 4, pp. 1691–1700, 2020, doi: 10.1093/nar/gkaa031.
- [16] N. Iwamoto *et al.*, "Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides," *Nat Biotechnol*, vol. 35, no. 9, pp. 845–+, 2017, doi: 10.1038/nbt.3948.