

# RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÉ OLIGO- NUKLEOTIDOVÉ DNA/RNA ANTIKÓ- DUJÍCÍ SONDY PRO ZOBRAZENÍ KOMPLEMENTÁRNÍ mRNA

Jiří Štěpán

KNM FN Brno a LF MU

34. Pracovní dny radiofarmaceutické sekce, 13. - 15. 6. 2012 - Mladá Boleslav

# || Úvod

- Oligonukleotidy hrají ústřední úlohu v živých organismech
- Jako velké molekuly nesou genetickou informaci (DNA a geny), která se prostřednictvím RNA přenáší do proteinů
- Jako kratší řetězce mají stejně životně důležité úlohy v řadě homeostatických procesů
- Biologické procesy mohou být zobrazeny za použití radioaktivně značených oligonukleotidů

# Úvod

- Značením se rozumí zavedení značky do sloučeniny umožňující její sledování v průběhu různých dějů a procesů
- Značení může být radioaktivní pomocí radioaktivního izotopu (např.  $^{32}\text{P}$ , kdy se detekuje záření) a neradioaktivní pomocí stabilního izotopu (např.  $^{18}\text{O}$  – detekce vibrační spektroskopií, hmotnostní spektrometrií) nebo pomocí snadno rozpoznatelné chemické

- skupiny (např. digoxigeninu - imunochemická detekce, biotinu – detekce na základě afinity k avidinu)
- Látka označená radioaktivním izotopem (značkou) se označuje jako radioaktivní indikátor
- Při použití radioaktivního značení je možno ke sledování značky v organismu využít nukleární zobrazovací metody - PET, SPECT (PET = pozitronová emisní tomografie, SPECT = jednofotonová emisní počítačová tomografie)

# Terminologie

DNA,  
deoxyribonukleová kyselina

RNA,  
ribonukleová kyselina

oligonukleotid

sonda hybridizační

- nukleová kyselina sestávající z jednoho nebo ze dvou až čtyř vzájemně spárovaných polydeoxyribonukleotidových řetězců
- nukleová kyselina sestávající z jednoho nebo dvou polyribonukleotidových řetězců
- polymer složený maximálně z 20 nukleotidů spojených fosfodiesterovými vazbami
- radioaktivně nebo neradioaktivně značená sekvence nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) používaná k vyhledání nukleové kyseliny s komplementární sekvencí

# Terminologie

mRNA, mediátorová  
ribonukleová kyselina

komplementární sekvence  
bází

antikódující řetězec DNA  
(nekódující, protismyslný,  
antisense)

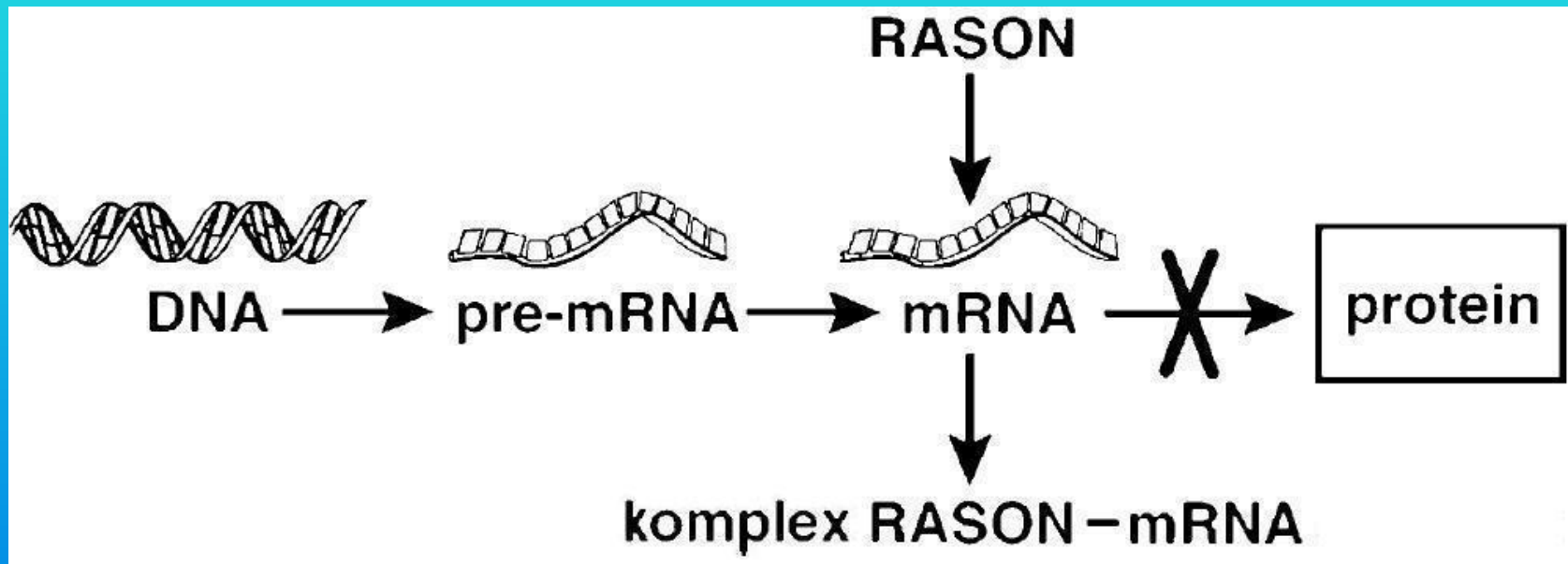
protismyslný oligonukleotid

- ribonukleová kyselina nesoucí přepis genetické informace obsažené ve strukturních genech a sloužící jako matrice pro syntézu polypeptidového řetězce na ribozomu
- sekvence v polynukleotidovém řetězci, ve které jsou všechny báze schopné tvořit páry bází se sekvencí bází v jiném polynukleotidovém řetězci
- DNA-řetězec dvouřetězcové DNA, který většinou celý slouží při transkripci jako matrice (templát) pro syntézu různých druhů RNA
- uměle připravený oligonukleotid, který je komplementární k určitému úseku mRNA, a proto se k němu váže a blokuje tak translaci této mRNA

# Princip použití protismyslných oligonukleotidových sond

- Pouze jeden ze dvou řetězců DNA je přepisován do jednořetězcové mRNA, je to negativní (antikódující, antisense) řetězec
- Sekvence bází v mRNA určuje sled aminokyselin v budoucím proteinu, je tedy ve správné smyslné (sense) orientaci
- Byla vyvinuta skupina molekul nazývaných **protismyslné oligonukleotidy – ASON** (z anglického antisense oligonucleotides), které jsou komplementární k částem mnohem delších molekul mRNA
- protismyslné oligonukleotidy obsahují 15 – 30 bází a vážou se ke komplementárním částem molekuly mRNA, což vede k tvorbě krátké dvouřetězcové sekvence na jinak dlouhé jednořetězcové molekule mRNA
- Komplex ASON-mRNA zabraňuje translaci a tedy syntéze proteinu na polyribosomu
- Navíc buňka považuje dvouřetězcovou část komplexu za nesprávnou, abnormální, a proto dojde k jeho odbourání ribonukleázou H, díky čemu se zastaví genová exprese

# Princip použití protismyslných oligonukleotidových sond



- Schématické znázornění zastavení proteosyntézy radioaktivně značenými protismyslnými oligonukleotidy (RASONs, radiolabelled antisense oligonucleotides) tvorbou komplexu s molekulou mRNA

# Praktické aplikace protismyslných oligonukleotidových sond

- Protismyslné oligonukleotidy se zkoumaly jako terapeutické i diagnostické prostředky proti mRNA z různých genů včetně genů viru lidského imundeficitu ( HIV)
- Protismyslné nukleotidy obsahující fosfodiesterové vazby jsou *in vivo* rychle odbourávány enzymy v plazmě. Aby se zabránilo tomuto odbourávání, byly v jejich strukturách provedeny různé změny (bude ukázáno dále)
- Hybridizace protismyslných nukleotidů s mRNA *in vivo* nastává při pikogramové koncentraci ( $10^{-12}$  g) a malé tumory (o velikosti 0,5 cm) mohou být zobrazeny za 1 – 2 h po injekci
- Vychytávání protismyslných oligonukleotidů *in vivo* buňkami zahrnuje endocytózu (buď receptovou nebo adsorpční) a pinocytózu, ale nikoliv pasivní difuzi přes buněčnou membránu
- Protismyslné oligonukleotidy mají vysokou afinitu k mRNA, ale vážou se pouze ke zlomku všech bází (několik set až tisíc) mRNA kvůli její sekundární a terciální struktuře



# Praktické aplikace protismyslných oligonukleotidových sond

- Biodistribuční studie s protismyslným fosforothioátovým oligonukleotidem (náhrada fosfátu thiofosfátem) u zvířat ukázala, že mizení z plazmy bylo extrémně rychlé a mělo dvě složky. Nejvyšší akumulace byla v ledvinách a játrech a minimální lokalizace byla v mozku
- Protože genová exprese může být protismyslnými oligonukleotidy zastavena na úrovni transkripce před započítím proteosyntézy v buňce, mnoho nemocí (rakovina, kardiovaskulární onemocnění atd.) může být léčeno za použití vhodného protismyslného oligonukleotidu

pro specifickou mRNA odpovědnou za nemoc

- Byly vyvinuty protismyslné oligonukleotidy zaměřené na mRNA u HIV, protoonkogenů *c-myc*, *c-erbB2*, *c-fos* a onkogenu *v-Ha-ras* a byly použity pro monitorování a prevenci progresu zhoubnosti související s těmito geny pomocí neinvazivního zobrazení

(*c-myc*, *c-fos* = regulační geny kódující transkripční faktory, *c-erbB2* = gen pro receptor 2 lidského epidermálního růstového faktoru, *v-Ha-ras* = gen pro membránovou GTPázu pp21<sup>ras</sup>)

# Praktické aplikace protismyslných oligonukleotidových sond

- Zatímco léčba mnohých nemocí souvisejících s genovou expresí za použití protismyslných oligonukleotidů má velký význam v klinické praxi, jejich použití pro diagnostické účely má stejnou důležitost u odhalování těchto nemocí před jejich plnou expresí
- Pomocí protismyslných oligonukleotidů byly detekovány změny v hyperplazii hladkého svalu po angioplastice koronárních cév a aortokoronárním bypassu (přemostění)
- Mnoho výzkumníků vyvinulo radioaktivně značené protismyslné

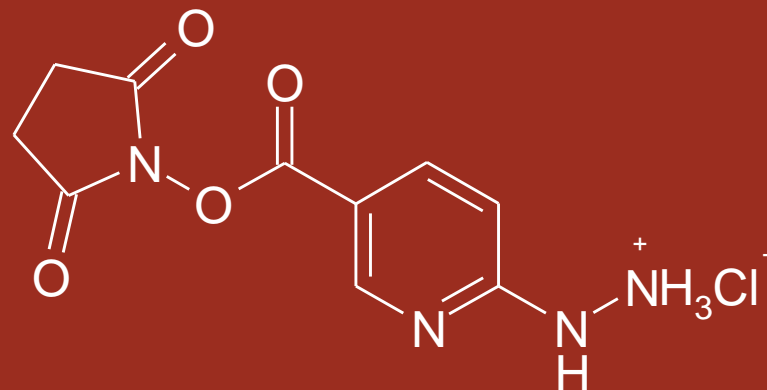
oligonukleotidy pro zobrazení nemocí na úrovni mRNA za použití nukleárních zobrazovacích technik

- Dewanjee aj. (1994) úspěšně poprvé použili protismyslnou oligonukleotidovou sondu pro nukleární zobrazení amplifikovaného protoonkogene *c-myc*. Jednalo se o fosfodiester a monothioester značené  $^{111}\text{In}$  za použití bifunkčního chelatačního činidla diethylentriaminpentaoctové kyseliny (DTPA)
- Obdobné značení bylo oznámeno s  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{125}\text{I}$  a  $^{18}\text{F}$  a většina těchto studií zahrnovala zvířata a jenom málo pokusy na lidech

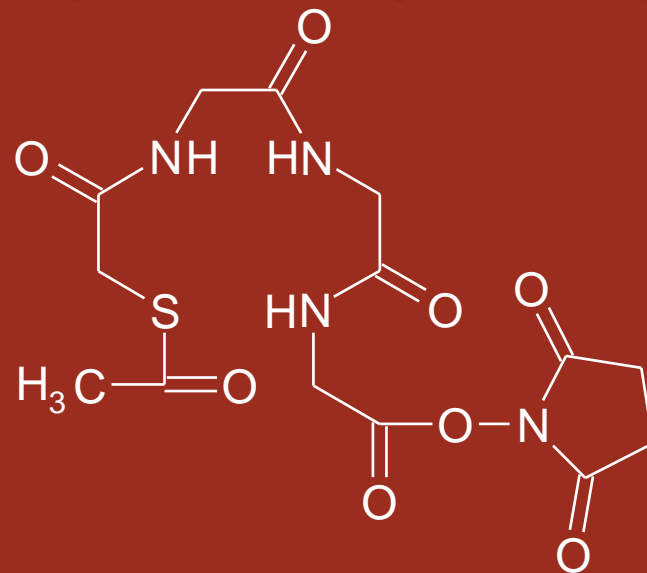
# Chemie značení oligonukleotidů a polynukleotidů $^{99m}\text{Tc}$

- Značení oligonukleotidů  $^{99m}\text{Tc}$  je možné po navázání bifunkčního chelatačního činidla jako 6-hydrazinonikotinamidu (hynic), pentetové kyseliny (DTPA), merkaptoacetyltri-glycinu (MAG<sub>3</sub>) na molekulu oligonukleotidu. Tento chelátor potom váže  $^{99m}\text{Tc}$
- Na oligonukleotid se nejprve na 3' nebo 5' konec připojí primární aminoskupina a k opačnému konci biotin
- Na primární aminoskupinu se naváže bifunkční chelátor – hynic a MAG<sub>3</sub> pomocí jejich derivátů s *N*-hydroxysukcinimidem, DTPA přes cyklický anhydrid
- Vlastní značení techneciem-99m probíhá po jeho redukci přímo (DTPA) nebo transchelatací přes  $^{99m}\text{Tc}$ -glukoheptonát (hynic) nebo  $^{99m}\text{Tc}$ -vínan (MAG<sub>3</sub> – nejčastější způsob značení)
- Rychlostní konstanty asociace pro hybridizaci byly stejné pro DNA modifikovanou všemi třemi chelátory a nativní DNA
- Pořadí akumulace  $^{99m}\text{Tc}$  v nádorových buněčných liniích pozitivních na R1alfa mRNA bylo DTPA > hynic > MAG<sub>3</sub>, a rychlost výtoku  $^{99m}\text{Tc}$  z buněk byla MAG<sub>3</sub> > hynic > DTPA

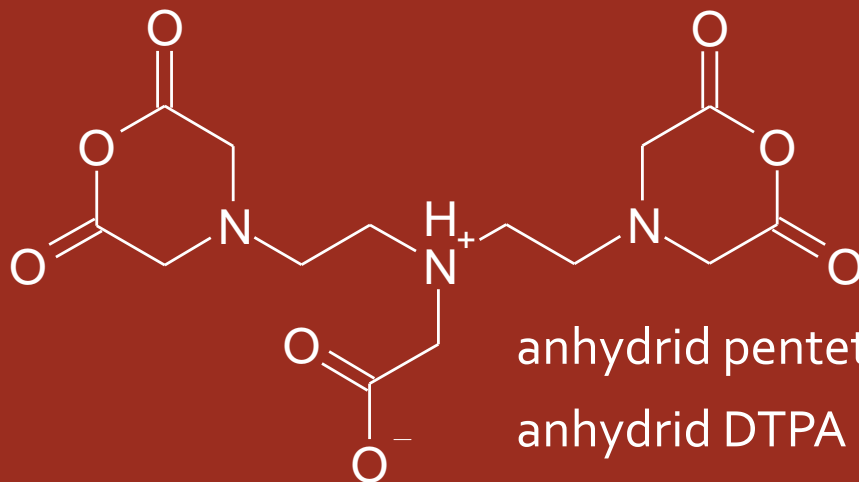
# NHS-deriváty MAG<sub>3</sub> a hynic a cyklický anhydrid DTPA



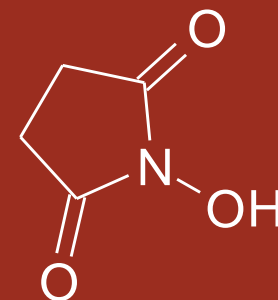
sukcinimidylhydraziniumnikotínát  
hydrochlorid, SHNH



S-acetyl-N-hydroxysukcinimid ester  
MAG<sub>3</sub>, S-acetyl-NHS-MAG<sub>3</sub>

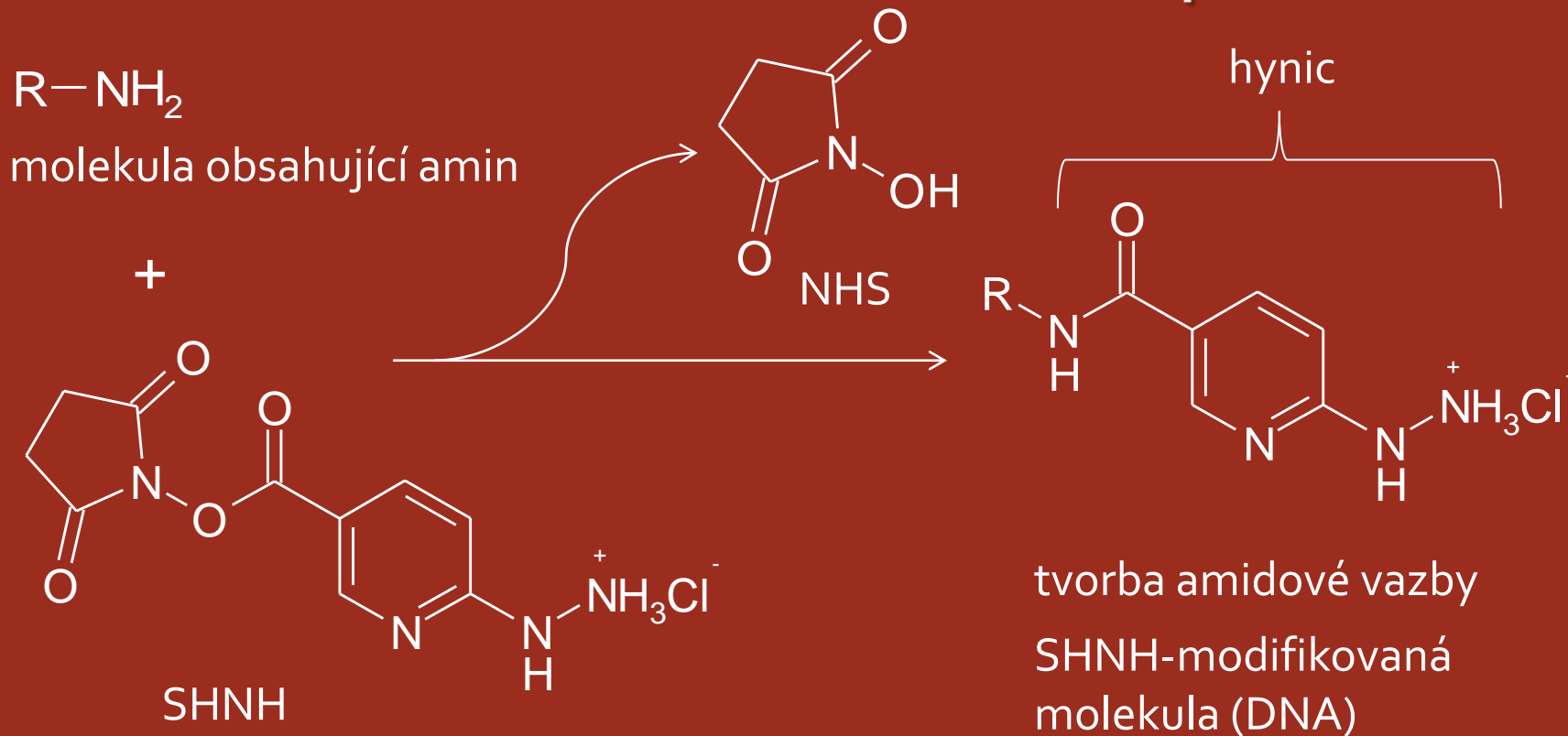


anhydrid pentetové kyseliny,  
anhydrid DTPA



N-hydroxysukcinimid  
NHS

# Tvorba amidové vazby – navázání chelátoru na molekulu s aminoskupinou



- navázání *S*-acetyl-MAG<sub>3</sub> probíhá obdobně reakcí *S*-acetyl-NHS-MAG<sub>3</sub> s  $R-NH_2$
- navázání DTPA probíhá reakcí anhydridu DTPA s  $R-NH_2$  za otevření anhydridového kruhu a tvorby amidové vazby, možnost nežádoucího síťování modifikované molekuly

# Směrování a doručení DNA/RNA produktů značených $^{99m}\text{Tc}$

- Většina léčiv musí projít buněčnými membránami než může projevit svůj biochemický/molekulární účinek a to se týká i radioaktivních indikátorů pro molekulární zobrazování
- Přejít oligonukleotidu přes membrány pro nalezení a vazbu ke komplementárnímu terči není potřebný při zobrazování atherosklerotických lézí pomocí  $^{99m}\text{Tc}$ -*c-myc* protismyslných oligonukleotidů
- Ve většině případů je průchod vysoce nabitého oligonukleotidu

- blokován a i v případech s omezeným nábojem je průchod velkých molekul do buněk omezený
- Pro směrování a doručení produktů značených techneciem-99m na cílová místa v organismu a pro zlepšení doručení lze využít různých přístupů
  - formulace léčivého přípravku
  - farmakochemie
  - molekulární derivatizace

# Přístup formulace léčivého přípravku

- Jako prostředky pro zavedení radioaktivně značených i neznačených oligonukleotidů do buněk byly použity nosiče
- Ve výzkumu je použití farmaceutických nosičů, jako jsou cyklodextriny a lipozómy
- Dále se využívá elektrostatické komplexace s transmembránovými transfaktorovými nosiči (kationtový - pozitivně nabitý kardiolipin) a kationtovými peptidy jako TAT a jinými

Pozn.

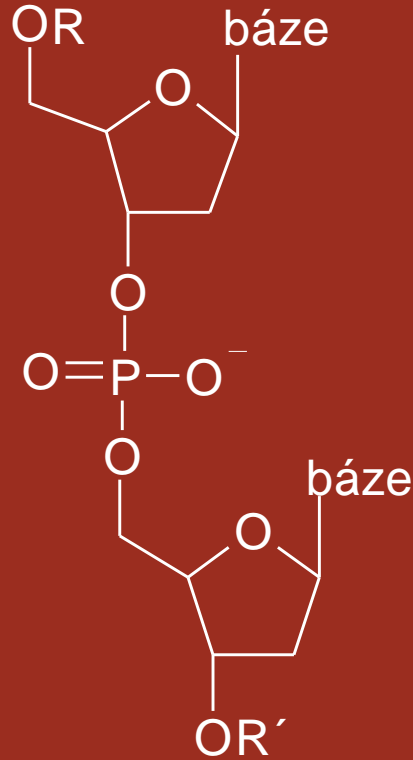
- transfekce = přenos cizorodé DNA do kultivovaných živočišných nebo lidských buněk, čili přímý přenos genů
- peptid TAT = je odvozen z transaktivátoru transkripce lidského viru imunodeficiency (HIV) a patří k peptidům pronikajícím do buňky (cell-penetrating peptides, CPPs) používaným k doručování různých molekul, ale i lipozómů do buňky

# Farmakochemický přístup

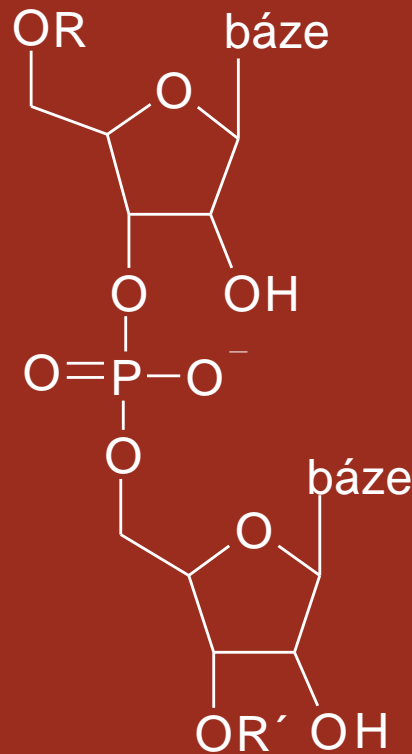
- Při výzkumu směřování a doručení se provádějí chemické modifikace základního oligonukleotidu
- V první řadě to znamená syntetizovat molekuly rezistentní k nukleázám, čehož se dosáhne změnami ve fosfodiesterové páteři nahrazením fosfátu fosfordiamidátem, fosforothioátem, aminokyselinovými nebo morfolinovými zbytky, tvorbou uzamčených nukleových kyselin a změnou stereochemie (spiegelmery = molekuly jako RNA vystavené z L-ribosových jednotek)
- Zmíněné budou:
  - fosforothioátové nukleové kyseliny
  - peptidové nukleové kyseliny
  - uzamčené nukleové kyseliny
  - fosfordiamidátové morfolino nukleové kyseliny



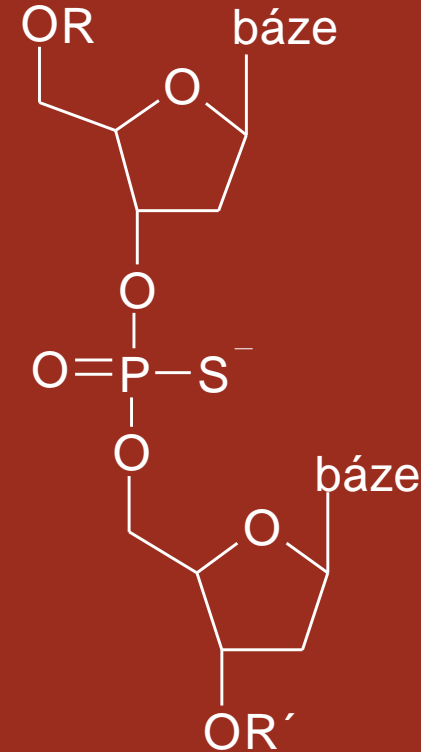
# Fosforothioátové oligonukleotidy



fosfodiesterová DNA



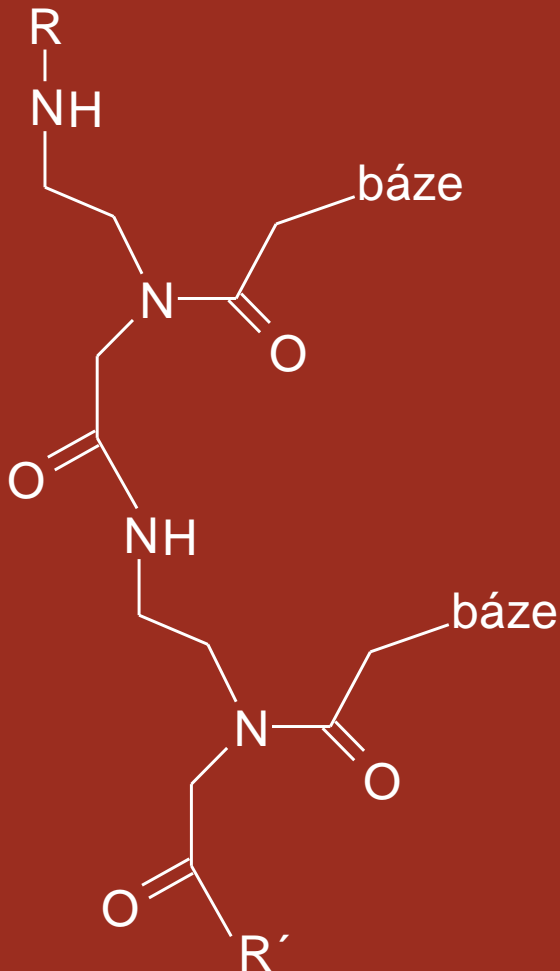
fosfodiesterová RNA



fosforothioátová DNA

- $^{99m}\text{Tc}$ -hynic-značené fosfodiesterové oligonukleotidy jsou v těle po aplikaci odbourány na nízkomolekulární metabolity během 15 min, zatímco fosforothioátové analogy jsou hlavně na proteinech
- fosforothioátové nukleotidy vykazují vysoké přetrvávající jaterní vychytávání
- vysoký obsah guaninu je rozhodující faktor nespecifické buněčné akumulace

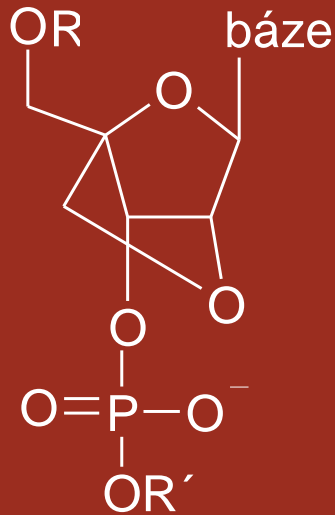
# Peptidové oligonukleotidy



peptidová nukleová  
kyselina (PNA)

- Cukr-fosfátová páteř je nahrazena polymerem *N*-(2-aminoethyl)glycinu (AEG)
- Báze jsou připojeny pomocí karboxylové skupiny zbytku octové kyseliny
- $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub>-značené amin-derivatizované peptidové oligonukleotidy mohou poskytnout stabilitu a farmakokinetické vlastnosti vhodné pro použití jako radiofarmaka (rychlá celotělová clearance s vychytáváním tkání s komplementární DNA a vylučováním ledvinami)

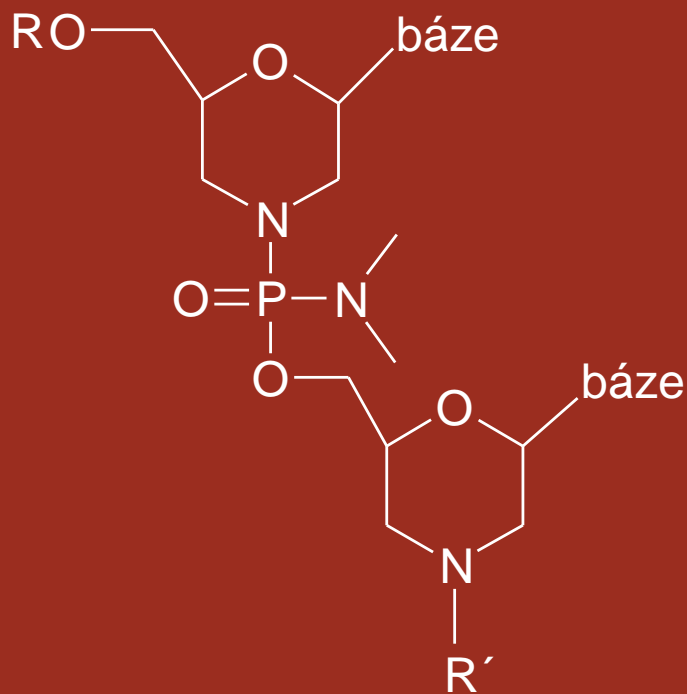
# Uzamčené oligonukleotidy



monomer uzamčené  
nukleové kyseliny  
oxy-LNA

- Uzamčená nukleová kyselina (locked nucleic acid, LNA) je modifikovaný RNA-nukleotid s uzamčenou konformací, ribosa je fixována v 3'-*endo* konformaci, což zvyšuje termodynamickou a biologickou stabilitu dvoušroubovic obsahujících LNA
- Začleněním jediného LNA nukleotidu do sekvence oligomeru lze po hybridizaci s komplementárním řetězcem zvýšit teplotu tání výsledné dvoušroubovice o 1–3 °C
- Může být oxy-LNA, thio-LNA, amino-LNA
- Lze použít značené nahé oligonukleotidy nebo uzavřené v kationtových lipozómech, v obou případech dochází k internalizaci
-

# Fosfordiamidátové morfolino oligonukleotidy



fosfordiamidátová  
morfolino nukleová  
kyselina

- Fosfordiamidátová páteř je rezistentní k nukleázám, neiontová a rozpustná ve vodě
- Primární aminoskupina se připojuje pomocí  $\beta$ -alaninového spojovníku na konec ekvivalentní 3' konci DNA a tato aminoskupina se pak konjuguje s *S*-acetyl-NHS-MAG<sub>3</sub> pro radioaktivní značení <sup>99m</sup>Tc
- Hybridizace s komplementárními řetězci je téměř kvantitativní, značený oligonukleotid je *in vitro* stabilní s minimální vazbou na proteiny, po i.v. aplikaci normálním myším je rychle vylučován

# Přístup molekulární derivatizace

## Strukturně pozměněné sondy

- Používají se komplexní molekulární sondy
- Délka řetězce a sekvence bází, zvláště přítomnost cytosinu jsou určující faktory pro vychytávání a hybridizaci komplementárních DNA/RNA sond
- Dvouvláknové (duplex) sondy mohou poskytnout lepší zobrazení ve srovnání s jednovláknovými protismyslnými oligonukleotidy

- Zahrnuje to tvorbu a použití dvoušroubovic mezi protismyslnou fosfothioátovou DNA proti *mdr1* mRNA a stejnou fosfothioátovou nebo fosfodiesterovou kódující DNA (*mdr1* = gen mnohočetné lékové rezistence, multidrug resistance, kódující glykoprotein-P – transmembránovou efluxní pumpu léčiv)

# Přístup molekulární derivatizace

## Oligomerní chiméry

- Využívají se chiméry peptid-PNA
- Příkladem je použití protismyslné PNA specifické pro onkogen *c-myc* nadměrně exprimovaný u lidské rakoviny prsu
- PNA je spojena s chelatačním činidlem umožňujícím značení  $^{99m}\text{Tc}$
- Distribuční studie ukázaly mírnou akumulaci protismyslné chiméry v játrech a znatelné hladiny v tumorech

- Jiná chiméra je pro zobrazení genu pro cyklin D, který se nazývá CCND<sub>1</sub> gen. Tento gen kóduje regulační protein buněčného cyklu cyklin D<sub>1</sub>
- Cyklin D<sub>1</sub> mRNA a ER mRNA pozitivně koreluje u primární rakoviny prsu (ER = estrogenový receptor)

# Přístup molekulární derivatizace

## Předsměrování oligomerů

- Vazbou peptidových nukleových kyselin na vhodné polymery se může zlepšit lokalizace
- Poly(methyl vinyl ether-*alt*-maleinová kyselina) (PA) se konjuguje s mnoha kopiemi protismyslné PNA a polyethylenglykolu
- Použití předsměrování za použití pegylovaných PA-polymerů peptidové nukleové kyseliny pro zesílení zlepšilo lokalizaci

- Protilátkové předsměrování morfolino nukleové kyseliny bylo ukázáno na použití jejího konjugátu s protilátkou proti karcinoembryonálnímu antigenu (CEA) navázanou přes ethylaminový spojovník na 3' konec
- Bylo prokázáno vysoké vychytávání v tumorech a nízké vychytávání v normálních tkáních myši, potvrzující správnost tohoto přístupu předsměrování oligomerů

# Použití aptamerů

- Aptamery byly objeveny na začátku 90. let minulého století
- Jsou to krátké DNA nebo RNA oligonukleotidy nebo peptidy, které zaujímají specifické stabilní konformace *in vivo*
- Mohou se specificky a pevně vázat na malé rigidní molekuly (léčiva), peptidy, proteiny a jiné oligonukleotidy
- V protikladu k protismyslným oligonukleotidům jsou jejich terče často extracelulární spíše než intracelulární a tak se vyhnou nezbytnosti přechodu přes buněčné membrány
- Nedávno byl připraven aptamer pro protein extracelulární matrix tenascin-C značený fluorescenčně a radioaktivně a pomocí planární scintigrafie a  $^{99m}\text{Tc}$ -značeného aptameru byly získány obrazy glioblastomu a nádoru prsu
- Vychytávání aptameru ve štěpech několika jiných lidských tumorů vyžadovalo přítomnost cílového proteinu – lidského tenascinu-C (tenasciny = glykoproteiny extracelulární matrix, hojně se vyskytující u vyvíjejících se embryí a znovu se objevující při hojení ran a ve stromatu některých tumorů)



# Literatura

- BERÁNEK, Martin, BUREŠ, Jan, ŠÁCHA, Martin, SÁKRA, Lukáš, RAJMAN, Miloš, JANDÍK, Pavel, RUDOLF, Emil a LANDT Olfert. Detekce bodových mutací v Kirsten *ras* 2 genu metodou locked nucleic acids clamped PCR. *Chemické Listy*. září 2007, roč. 101, č. 9, s. 738-741.
- COREY, David R., ABRAMS, John M. Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biology*. 26 April 2001, vol. 2, no. 5, reviews1015.1–1015.3.
- HERMANSON, Greg T. *Bioconjugate Techniques*. 2nd ed. Amsterdam; Boston; Heidelberg; London; New York; Oxford; Paris; San Diego; San Francisco; Singapore; Sydney; Tokyo : Elsevier, 2008. 1202 p. ISBN 978-0-12-370501-3.
- International Atomic Energy Agency. *Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Status and Trends*. Vienna : IAEA, 2009. 360 p. IAEA Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Series No. 1. ISBN 978–92–0–103509–7, ISSN 2077–6462.

# Literatura

•NIELSEN, Peter E., EGHOLM, Michael. An introduction to peptide nucleic acid. *Current Issues in Molecular Biology*. 1999, vol. 1, no. 2, p. 89-104.

•ROSYPAL, Stanislav, aj. *Terminologie molekulární biologie : České odborné termíny, jejich definice a anglické ekvivalenty*. 1. vyd. Brno : Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc., 2001. 281 s.

ISBN 80-902562-3-6

•SAHA, Gopal B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 6th ed. New York; Heidelberg; Dordrecht; London : Springer, 2010. 409 p. ISBN 978-1-4419-5859-4.

•SUMMERTON, James, STEIN, David, HUANG, Sung Ben, MATTHEWS, Paula, WELLER, Dwight, and PARTRIDGE, Michael. Morpholino and phosphorothioate antisense oligomers compared in cell-free and in-cell systems. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*. April 1997, vol. 7, no. 2, p. 63-70.