

Antysensowne oligonukleotydy – budowa, mechanizmy działania i zastosowanie terapeutyczne

Antisense oligonucleotides – structure, mechanisms of action and therapeutic application

Dawid Dorna, Jarosław Paluszczak

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

Streszczenie

Antysensowne oligonukleotydy są nową grupą leków, których działanie jest oparte na oddziaływaniu z docelowymi cząsteczkami RNA na zasadzie tworzenia komplementarnych wiązań typu Watsona-Cricka. Skutkuje to albo degradacją cząsteczki RNA, względem której skierowany jest oligonukleotyd, albo modyfikacją wzorca składania pre-mRNA. W pierwszym przypadku lek obniża produkcję białka kodowanego przez mRNA. W drugim przypadku lek prowadzi do translacji białka o nieco innej budowie – dłuższego, gdy lek spowodował zachowanie eksonu w dojrzałym mRNA, lub krótszego, jeśli lek spowodował pominięcie eksonu w trakcie składania pre-mRNA. Artykuł przedstawia wiedzę na temat budowy i mechanizmów działania antysensownych oligonukleotydów, a także prezentuje aktualnie zarejestrowane leki z tej grupy. (*Farm Współ 2021; 14: 118-129*) doi: 10.53139/FW.20211415

Słowa kluczowe: antysensowne oligonukleotydy, gapmery, RNaza H1, modulacja składania mRNA

Abstract

Antisense oligonucleotides constitute a new class of drugs, whose action depends on Watson-Crick base pairing with complementary target RNA. This leads to target RNA degradation or the modification of the pattern of pre-mRNA splicing. In the former case, the oligonucleotide decreases the synthesis of the protein encoded by target mRNA. In the latter case, the drug leads to the production of a modified protein. A longer protein is synthesized when the drug stimulates exon retention, while a shorter protein is produced if the drug stimulates exon skipping during pre-mRNA splicing. The article presents the current knowledge on the structure and mechanism of action of antisense oligonucleotides and describes currently approved drugs of this type. (*Farm Współ 2021; 14: 118-129*) doi: 10.53139/FW.20211415

Keywords: antisense oligonucleotides, gapmers, RNase H1, splice switching

Wprowadzenie

Medycyna znalazła się w erze post-genomicznej. Znana jest sekwencja zasad azotowych w ludzkim DNA, a także sekwencje cząsteczek RNA kodowanych przez DNA. Coraz dokładniej rozumiemy też molekularne mechanizmy regulujące złożony proces ekspresji genów. Stwarza to między innymi możliwość projektowania leków o strukturze oligonukleotydów, które mogą wpływać na przebieg procesu ekspresji genów na różnych jego etapach. Z punktu widzenia farmakologii, daje to szansę na stworzenie leków oddziałujących na funkcję tych białek, które nie stanowią dobrego celu molekularnego oddziaływania leków drobnocząsteczkowych (ang. *undruggable targets*), np. ze względu

na brak odpowiedniego zagłębienia w strukturze przestrzennej białka, w którym mogłyby wiązać się cząsteczka leku [1–3]. Stwarza to także unikatowe możliwości ingerencji w procesy regulacji funkcji RNA. Do najważniejszych terapeutycznych kwasów nukleinowych (TKN) należą antysensowne oligonukleotydy (ASO), cząsteczki siRNA oraz aptamery [4]. Możliwe jest także wprowadzanie do organizmu syntetycznych cząsteczek mRNA, które po wnikięciu do komórek ulegają przejściowej ekspresji, a zsyntetyzowane białko może pełnić np. rolę antygeny i stymulować wykształcenie odporności na patogen [3], jak to ma miejsce np. w przypadku szczepionek RNA przeciw COVID-19.

Te terapeutyczne oligonukleotydy (ASO, siRNA), które oddziałują z wewnątrzkomórkowymi cząsteczkami RNA (najczęściej mRNA) na zasadzie tworzenia komplementarnych wiązań typu Watsona-Cricka, mogą być stosowane w celu zapobiegania syntezie białka (hamowanie translacji) lub w celu modulacji procesów dojrzewania i stabilizacji docelowych cząsteczek RNA [5]. Takie molekularne interwencje mogą

być wykorzystane do przyczynowego leczenia wielu różnych chorób. Celem artykułu jest przybliżenie budowy, właściwości i mechanizmów działania ASO, a także przedstawienie aktualnie zarejestrowanych leków z tej grupy (tabela I).

Tabela I. Zestawienie stosowanych klinicznie antysensownych oligonukleotydów
Table I. The characteristics of clinically approved antisense oligonucleotides

Nazwa związku	Jednostka chorobowa	Cel molekularny / mechanizm	Rodzaj modyfikacji	Droga podania / dawkowanie	Rok dopuszczenia do obrotu
Fomiwirsen [1,4,6]	Infekcja oka wywołana CMV u chorych na AIDS	CMV IE-2 / RNaza H1	PS	Iniekcja do gałki ocznej / 300 µg co 4 tygodnie	FDA 1998 EMA 1999 (obecnie wycofany)
Mipomersen [1,4,6,23]	Rodzinna hipercholesterolemia	ApoB-100 / RNaza H1	PS, 2'-O-MOE, gapmer	Iniekcja podskórna / 200 mg raz w tygodniu	FDA 2013 (obecnie wycofany)
Wolanesorsen [2,24]	Zespół rodzinnej chylomikronemii	ApoCIII / RNaza H1	PS, 2'-O-MOE, gapmer	Iniekcja podskórna / 285 mg raz w tygodniu przez pierwsze 3 miesiące, po tym czasie redukcja dawki do 285 mg raz na 2 tygodnie	EMA 2019
Inotersen [1,25,26,27]	Dziedziczna amyloidoza transtyretynowa	Transtyretyna / RNaza H1	PS, 2'-O-MOE, gapmer	Iniekcja podskórna / 300 mg raz w tygodniu	FDA 2018 EMA 2018
Nusinersen [1,13,28-31]	Rdzeniowy zanik mięśni	SMN2 / włączenie eksonu 7	PS, 2'-O-MOE	Podanie dooponowe poprzez nakłucie lędźwiowe / 12 mg co 4 miesiące	FDA 2016 EMA 2017
Eteplirsen [1,28,34]	Dystrofia mięśniowa Duchenne'a	Dystrofina / pominięcie eksonu 51	PMO	Infuzja dożylna / 30 mg/kg raz w tygodniu	FDA 2016
Golodirsen [32,33]	Dystrofia mięśniowa Duchenne'a	Dystrofina / pominięcie eksonu 53	PMO	Infuzja dożylna / 30 mg/kg m.c. raz w tygodniu	FDA 2019
Wiltolarsen [35]	Dystrofia mięśniowa Duchenne'a	Dystrofina / pominięcie eksonu 53	PMO	Infuzja dożylna / 80 mg/kg m.c. raz w tygodniu	FDA 2020 EMA 2020
Kasimersen [33]	Dystrofia mięśniowa Duchenne'a	Dystrofina / pominięcie eksonu 45	PMO	Infuzja dożylna / 30 mg/kg m.c. raz w tygodniu	FDA 2021

Projektowanie antysensownych oligonukleotydów

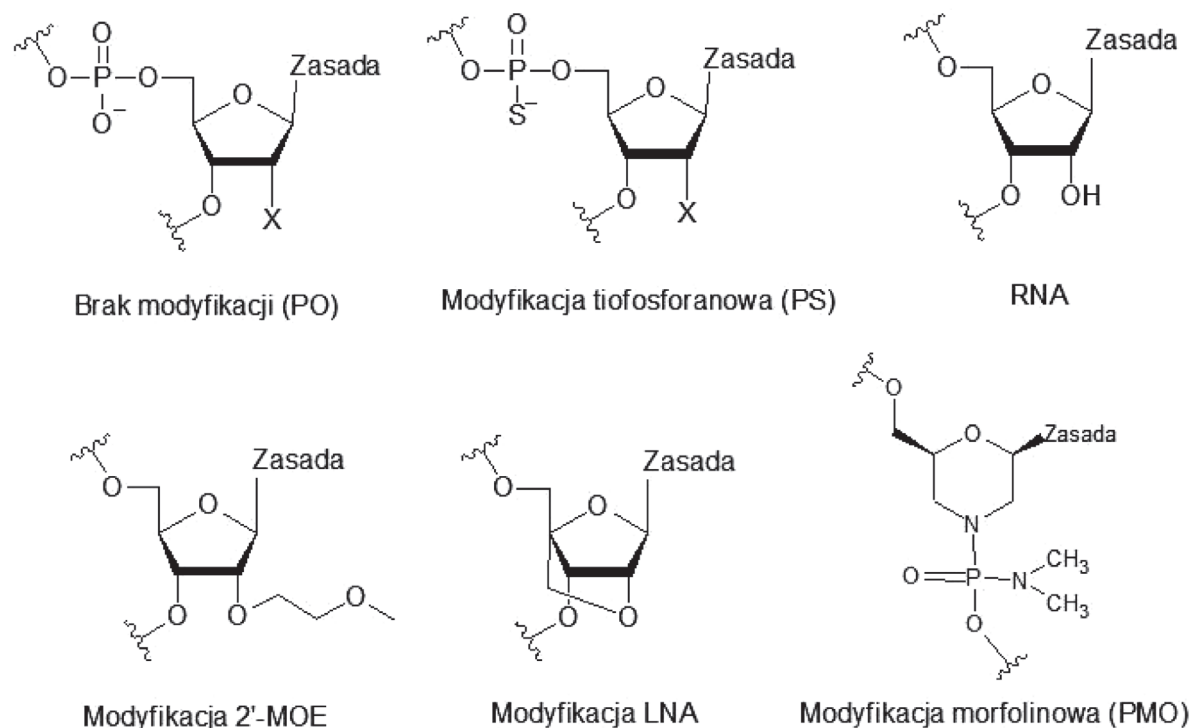
ASO znane są od końca lat 70. XX wieku, jednak ich wdrożenie do leczenia zostało przyspieszone dopiero w następstwie poznania sekwencji genomu człowieka oraz opracowania modyfikacji chemicznych, które poprawiły ich stabilność *in vivo* i farmakokinetykę [6]. Po wniesieniu do komórki ASO wiążą się na zasadzie komplementarności do docelowej cząsteczki RNA i wpływają na jej funkcje. Istnieje kilka empirycznych zasad projektowania ASO [8]. O selektywności oligonukleotydów ASO wobec celu farmakologicznego decyduje ich sekwencja nukleotydów, która pełni rolę farmakoforową [9]. Sekwencja ta powinna być komplementarna do takiego fragmentu docelowej cząsteczki mRNA, który jako całość cechuje się niepowtarzalnością na tle wszystkich pozostałych cząsteczek mRNA, które ulegają syntezie w danej komórce. W praktyce zadowalającą wybiórczość uzyskuje się już dla oligonukleotydów o długości powyżej 13 nt [10]. Im większe podobieństwo sekwencji TKN do innych niż docelowa, cząsteczek RNA, tym większe ryzyko działań niepożądanych wynikających z niespecyficznego wpływu na ekspresję nie w pełni komplementarnych RNA (ang. *off target effects*) [11]. Ryzyko toksyczności zależnej od sekwencji ASO, związanej z wpływem na ekspresję nie w pełni komplementarnych mRNA, maleje wraz ze wzrostem długości cząsteczki ASO oraz zwiększeniem energii wiązania ASO do docelowego mRNA [11,12]. Nie wszystkie potencjalnie unikatowe miejsca w docelowym RNA są równocześnie pod kątem wiązania się ASO, ze względu na skomplikowane struktury przestrzenne, które mogą przyjmować cząsteczki RNA w komórkach. Wybór sekwencji docelowej przy projektowaniu ASO powinien być więc podyktowany także tym, że nie uczestniczy ona w tworzeniu zwiniętych struktur, co utrudniałoby ASO dostęp do niej. Sekwencja ASO nie powinna być również sama wewnętrznie komplementarna, ani sprzyjać tworzeniu dimerów między poszczególnymi kopiami cząsteczek ASO [8]. Ponadto, zawartość G/C powinna być wyższa niż 50%. W celu uniknięcia niespecyficznego aktywacji odpowiedzi immunologicznej, reszty cytozyny w dinukleotydach CG obecnych w sekwencji ASO powinny być zmetylowane [8].

Modyfikacje chemiczne ASO

Klasyczne ASO o budowie DNA wywołują degradację docelowej cząsteczki mRNA dzięki aktywacji

rybonukleazy H1 (RNazy H1) [3]. RNaza H1 jest wewnątrzkomórkowym enzymem, który rozpoznaje heterodupleksy DNA:RNA i hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe (PO) w cząsteczce RNA. Dochodzi do endonukleolitycznego przecięcia RNA mniej więcej pośrodku sekwencji związanej przez ASO. Przecięta cząsteczka RNA ulega następnie rozkładowi przez komórkowe nukleazy [13]. Obecność ASO prowadzi zatem do zmniejszenia syntezy białka kodowanego przez docelowe mRNA, poprzez stymulowanie rozkładu tego mRNA. Niemodyfikowane ASO o budowie DNA wykazywały jednak niewielką skuteczność *in vivo*, m.in. z powodu niskiej trwałości w płynach biologicznych i zbyt niskiej siły wiązania z docelowymi cząsteczkami RNA. Metabolizm większości ASO, podobnie jak innych TKN, polega na ich rozkładzie przez endo- i egzo-nukleazy, które są wszechobecne w ustroju [1]. W celu znaczącego wydłużenia okresu półtrwania w płynach ustrojowych wprowadzono do cząsteczek ASO modyfikacje chemiczne, które zmniejszają lub całkowicie hamują podatność na trawienie przez nukleazy, co poprawia ich farmakokinetykę. Wiele nowszych modyfikacji zwiększa także siłę wiązania ASO w duplesie z docelowym RNA. Wysiłki badaczy doprowadziły do powstania kilku klas chemicznych o udowodnionej efektywności klinicznej cechujących się stopniowo coraz większą siłą działania i lepszą tolerancją [10]. Modyfikacje te obejmują zmiany w obrębie grup fosforanowych, jak i reszt cukrowych nukleotydów w łańcuchu oligonukleotydowym (rycina 1) [14].

Najszerzej dziś wykorzystywaną pojedynczą modyfikacją, opracowaną już w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku, jest modyfikacja tiofosforanowa (PS), w której jeden z niewiążących atomów tlenu grupy fosfodiesterowej jest zastąpiony atomem siarki. Taka modyfikacja szkieletu powoduje zmniejszenie hydrofilowości, wzrost odporności na degradację przez nukleazy, a także zwiększenie stopnia wiązania z białkami, włączając białka osocza, z którymi ASO wiążą się w ponad 85% [5,7]. Konsekwencją jest wzrost stabilności oraz obniżenie wydalania z moczem. Powinowactwo PS ASO do białek osoczowych jest jednocześnie na tyle niskie, że nie blokuje to ich dystrybucji do tkanek. Wydłużeniu ulega systemowa ekspozycja na lek, co prowadzi do zwiększenia wychwytu substancji przez komórki [1,10]. ASO zawierające modyfikacje tiofosforanowe nie są zwykle jednorodne pod względem stereochemicznym.



Rycina 1. Modyfikacje chemiczne wykorzystywane w oligonukleotydach antysensownych
 Figure 1. Chemical modifications of antisense oligonucleotides

Zamiana tlenu na siarkę wprowadza nowe centrum chiralne w ugrupowaniu PS. Daje to, przykładowo, 2¹⁹ możliwych stereoform dla oligonukleotydu złożonego z 20 zasad, posiadającego 19 wiązań tego typu [13]. Zmodyfikowane w ten sposób antysensowne oligonukleotydy, otrzymywane standardowymi metodami, będą więc mieszaniną diastereoizomerów, z których część może wykazywać większą aktywność od reszty. Jak sugerują ostatnie doniesienia, stereochemia PS ma wpływ na skuteczność i właściwości farmakologiczne ASO oraz możliwa jest identyfikacja czystych, bardziej aktywnych stereoizomerów ASO [15,16]. Przykładem czystego stereochemicznie ASO jest suwodirsen, który jest aktualnie testowany klinicznie pod kątem zastosowania w leczeniu dystrofii mięśniowej Duchenne'a.

Szeroko wykorzystywane są także modyfikacje chemiczne w obrębie grupy cukrowej. Zamiast deoksyrybozy, w modyfikowanych nukleotydach występuje często podstawiona reszta rybozy. Grupa 2'-hydroksylowa w cząsteczce rybozy może być zastąpiona przez wiele różnych podstawników, jednak najczęściej jest wymieniana na grupę 2'-O-metylową (2'-O-Me),

2'-O-metoksyetylową (2'-MOE) lub atom fluoru (2'-F). Modyfikacje te zwiększają odporność na trawienie przez nukleazy. Ponadto, zapewniają one silniejsze wiązanie komplementarnych zasad poprzez zwiększenie termicznej stabilności dupleksu ASO z RNA (wzrost temperatury topnienia o około 1-2 °C), czego konsekwencją jest większa siła działania, a także możliwość użycia krótszych oligonukleotydów dla uzyskania specyficznych efektów [15]. Modyfikacja 2'-MOE cechuje się mniejszą toksycznością od 2'-O-Me, a ponadto zapewnia na tyle wystarczającą odporność na nukleazy, że niektóre nukleotydy 2'-MOE mogą posiadać zwyczajne połączenie PO zamiast zmodyfikowanego PS. Modulowanie proporcją tych połączeń może zostać wykorzystane do optymalnego dostrojenia właściwości farmakokinetycznych ASO. Dystrybucja do tkanek może zachodzić szybciej przy jednoczesnym utrzymaniu wolnej eliminacji [13,17]. Nukleotydy zmodyfikowane w pozycji 2' rybozy przypominają budowę RNA, dlatego ich kompleksy z mRNA nie są substratami dla RNazy H1.

Kolejną możliwą modyfikacją jest połączenie poprzez mostek węglowy tlenu w pozycji 2' z węglem w pozycji 4' rybozy w celu otrzymania zmostkowanych kwasów nukleinowych. Do najpowszechniejszych modyfikacji tego typu należą zablokowane kwasy nukleinowe LNA (ang. *locked nucleic acid*) posiadające połączenie 2',4'-metylenowe oraz kwasy nukleinowe ograniczone mostkiem etylenowym cEt (ang. *constrained ethyl*) [15]. Wymusza to specyficzną konformację pierścienia furanozowego (konformacja 3' endo), która zapewnia stabilizację i wzrost siły wiązania w duplekcie ASO-RNA [5]. Do zalet zablokowanych kwasów nukleinowych należą nie tylko zwiększenie specyficzności względem docelowych sekwencji nukleotydowych, lecz również zmniejszenie rozpoznawania przez nukleazy. ASO zawierające LNA cechują się także większą siłą działania od ich odpowiedników posiadających modyfikacje 2'-MOE, ponieważ znacząco mocniej podwyższają temperaturę topnienia dupleksów ASO-RNA (wzrost o około 3–4 °C) [5,13,18].

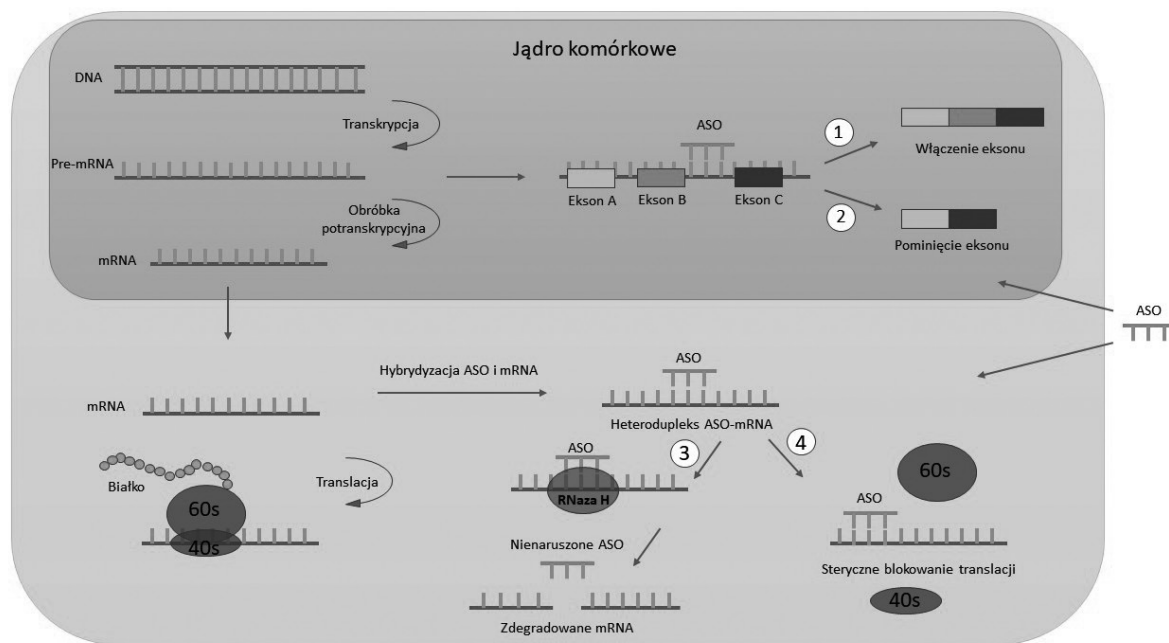
Odrębną grupę stanowią oligonukleotydy, w których szkielet cukrowo-fosforanowy został całkowicie zmieniony. Do takich modyfikacji należą fosforodiamidowe oligomery morfolinowe (PMOs), cechujące się zwiększoną odpornością na nukleazy oraz zwiększonym powinowactwem do docelowego RNA [13].

W miejsce występującego w naturalnych kwasach nukleinowych pierścienia furanozowego zawierają one pierścień morfolinowy, natomiast zamiast ujemnie naładowanego szkieletu fosfodiesterowego, posiadają neutralne ugrupowania fosfordiamidowe. Brak ładunku skutkuje zmniejszonym stopniem wiązania z białkami, zwiększonym wydalaniem przez nerki oraz mniejszą kumulacją w tkankach docelowych, w porównaniu do posiadających ładunek ujemny oligonukleotydów PS. Skutkiem tego, do uzyskania efektu farmakologicznego może być wymagane stosowanie wyższych dawek leku [14].

Powyższy opis nie wyczerpuje spektrum modyfikacji chemicznych, które badano pod kątem poprawy właściwości farmakodynamicznych i farmakokinetycznych ASO. Scharakteryzowano jednak te modyfikacje, które zostały zastosowane w przypadku zarejestrowanych preparatów ASO.

Mechanizmy działania ASO

Łańcuchy oligonukleotydowe są stosunkowo dużymi cząsteczkami posiadającymi ujemny ładunek (z wyjątkiem PMO), których właściwości różnią się od typowych leków opartych na małych cząsteczkach chemicznych. W celu regulacji ekspresji genów, ASO muszą przeniknąć przez błonę komórkową, aby osią-



Rycina 2. Mechanizmy działania antysensownych oligonukleotydów
Figure 2. Mechanisms of action of antisense oligonucleotides

gnąć swoje miejsce oddziaływania [15]. Ich dobrej dystrybucji do tkanek sprzyja wiązanie z białkami osocza. ASO są wychwytywane przede wszystkim przez komórki wątroby, nerek, węzłów chłonnych, śledziony i układu siateczkowo-śródbłonkowego. ASO przenikają więc szczególnie łatwo do tych tkanek, w których śródbłonek naczyńowy nie wykazuje całkowicie zwartej struktury. Nie przenikają natomiast przez śródbłonek naczyńowy tworzący barierę krew-mózg [5]. Po wnikięciu do tkanki nieopłaszczone cząsteczki ASO dostają się do wnętrza komórek przede wszystkim na drodze endocytozy (gymnozy) [7]. Uważa się, że istotną rolę w inicjowaniu ich endocytozy pełnią między innymi błonowe receptory zmiataczowe (SR) [19]. Z uwagi na ujemny ładunek cząsteczki, pochodne PS wykazują zwiększoną zdolność wiązania się do białek na powierzchni komórki, co nasila wychwyt dokomórkowy [5]. Aby wywołać efekt wewnątrzkomórkowy, cząsteczki ASO muszą opuścić pęcherzyk endosomalny i przedostać się do cytoplazmy lub jądra komórkowego, gdzie rozpoznają i wiążą docelowe RNA. Cząsteczki ASO wchłonięte w wyniku endocytozy tylko w niewielkim stopniu podlegają ucieczce endosomalnej, co jednak wystarcza do wywołania efektu biologicznego. Dla zwiększenia ucieczki endosomalnej można stosować ASO w połączeniu ze związkami, które destabilizują endosomy i wspomagają przenikanie ASO do cytoplazmy (np. Retro-1) [5]. Modyfikowane chemicznie ASO, po przeniknięciu do komórek, charakteryzują się bardzo wolną eliminacją z tkanek [7].

W zależności od budowy chemicznej ASO, różne mechanizmy mogą zostać wykorzystane w celu uniczywnienia, degradacji lub modyfikacji docelowego RNA (rycina 2) i uzyskania zamierzonego efektu farmakologicznego [20].

Hamowanie translacji z wykorzystaniem RNazy H1

Jednym z celów stosowania ASO jest blokowanie translacji poprzez stymulację rozkładu mRNA kodującego niepożądane białko. Wymaga to aktywacji endonukleazy rozkładającej RNA, które zostało rozpoznane i związane przez ASO. W komórkach ssaków występują dwa rodzaje rybonukleaz H, RNaza H1 oraz RNaza H2, których funkcją jest przecinanie nici RNA w heteroduplexach DNA-RNA. Fizjologiczną rolą tych enzymów jest udział w usuwaniu starterów RNA niezbędnych do inicjacji replikacji helisy DNA. Chociaż RNaza H2 występuje w komórkach w znacznie większych

ilościach, to dla aktywności ASO znaczenie ma jedynie RNaza H1 [20,21]. Po związaniu heteroduplexu RNA-DNA przez RNazę H1, selektywnemu przecięciu ulega nić docelowego RNA, lecz nienaruszona pozostaje syntetyczna nić ASO, która może wiązać kolejne cząsteczki mRNA. Degradacja docelowego mRNA prowadzi ostatecznie do obniżenia produkcji białka istotnego dla przebiegu choroby [1,22].

Jak wspomniano wcześniej, konsekwencją wprowadzenia niektórych zmian chemicznych jest utrata zdolności rozpoznawania przez RNazę H1 dupleksu tworzonego przez ASO z docelowym RNA. Dzieje się tak, gdy struktura ASO, chemicznie zmodyfikowanego na całej długości, zbyt mocno odbiega od struktury jednoniciowego DNA. Do takich modyfikacji należą m.in. modyfikacje reszt rybozy: 2'-O-Me, 2'-O-MOE, których zaletą jest jednak zwiększenie trwałości cząsteczki oraz wzrost siły wiązania z docelowym RNA. Dla indukcji aktywności RNazy H1 wystarczająca jest obecność przynajmniej sześciu nukleotydów o budowie DNA lub pochodnych PS w centralnej części cząsteczki ASO [19]. Z tego powodu oligonukleotydy, których celem ma być zahamowanie translacji poprzez stymulację degradacji mRNA pod wpływem RNazy H1, są często projektowane jako tzw. gapmery, w których środkowa część, złożona z nukleotydów tolerowanych przez RNazę H1 (klasyczne deoksyrybonukleotydy lub pochodne tiofosforanowe), jest oskrzydłona na końcach 5' i 3' cząsteczki kilkunukleotydowymi odcinkami złożonymi ze zmodyfikowanych nukleotydów, takich jak 2'-O-Me lub 2'-O-MOE, które zwiększają stabilność i siłę wiązania cząsteczki [13].

Całkowicie zmodyfikowane chemicznie ASO, których dupleksy nie są rozpoznawane przez RNazę H1, również mogą być wykorzystane do inhibicji translacji docelowego mRNA. Hamowanie syntezy białka zachodzi wtedy na drodze sterycznego blokowania możliwości odczytywania przez rybosom kodonów na związanym przez ASO mRNA. Dochodzi do rozpadu kompleksu rybosomu i przedwczesnego przerwania translacji, przez co nie powstaje pełne białko [19]. Do skutecznego działania wymagana byłaby jednak wysoka siła wiązania tak działającego ASO z docelowym mRNA. Zapewnić ją może np. obecność LNA w cząsteczce ASO. W praktyce klinicznej jednak do hamowania translacji wykorzystuje się gapmery, które dzięki obniżeniu ilości mRNA prowadzą do bardziej stabilnych efektów.

Terapeutyczne ASO blokujące proces translacji

Pierwszym ASO, zarejestrowanym w 1998 roku w USA, a później w Europie, do leczenia infekcji oka wywołanych cytomegalowirusem (CMV) u chorych na AIDS, był fomiwirsen. Składał się on z 21 nt (5'-GCG TTT GCT CTT CTT CTT GCG-3') komplementarnych do sekwencji genu kodującego białko IE2, które jest niezbędne w cyklu życiowym wirusa [6]. Fomiwirsen należał do ASO pierwszej generacji, tzn. jedyną modyfikacją w cząsteczce była zamiana wiązań fosfodiesterowych na tiofosforanowe. Lek był podawany w postaci iniekcji do oka. Jego wycofanie z rynku związane było z wprowadzeniem do leczenia nosicieli HIV skutecznych leków antyretrowirusowych, dzięki którym infekcje CMV przestały stanowić problem medyczny [4].

Drugim wprowadzonym do lecznictwa ASO był mipomersen. Należał on do drugiej generacji ASO [4]. Był 20-merowym gapmerem posiadającym szkielet PS oraz podstawniki 2'-O-MOE w nukleotydach na obu końcach cząsteczki [6]. Posiadał także zmetylowane reszty cytozyny. Jego sekwencja była komplementarna do mRNA dla apolipoproteiny B100. Hamując produkcję tego białka w hepatocytach, mipomersen obniżał stężenie lipidów (cholesterolu i triglicerydów) i lipoprotein (VLDL, LDL) osocza. Był stosowany w postaci iniekcji podskórnych w leczeniu chorych z rodzinną hipercholesterolemią. Ze względu na hamowanie syntezy cząstek VLDL, mipomersen prowadził do kumulacji triglicerydów w hepatocytach, wywołując stłuszczenie wątroby. Z uwagi na wysokie ryzyko hepatotoksyczności nigdy nie uzyskał rejestracji w Europie [23]. Mipomersen został ostatecznie wycofany z użycia z uwagi na silne działania niepożądane, a także pojawienie się na rynku innych leków. Jak widać, profil bezpieczeństwa ASO bywa niekorzystny. Częstym działaniem niepożądanym ASO, poza lokalnymi zmianami w miejscu podania, jest małopłytkowość [15]. W toku wielu badań klinicznych udało się jednak opracować ASO, które są dobrze tolerowane przez pacjentów.

Wolanesorsen

Zespół rodzinnej chylomikronemii (FCS) to rzadkie zaburzenie metaboliczne cechujące się upośledzeniem funkcji lipazy lipoproteinowej (LPL), czego konsekwencją jest chylomikronemia oraz ostra hipertriglicerydemia. Choroba ta może prowadzić do

potencjalnie śmiertelnego powikłania, jakim jest zapalenie trzustki. Jako kluczowy czynnik w chylomikronemii i hipertriglicerydemii zidentyfikowana została apolipoproteina CIII (apoCIII). Przyczynia się ona do podniesienia poziomu triglicerydów w osoczu poprzez hamowanie lipazy lipoproteinowej, zmniejszenie wychwytu wątrobowego lipoprotein bogatych w triglicerydy oraz zwiększenie wątrobowego wydzielania triglicerydów [24]. Wolanesorsen jest antysensownym oligonukleotydem, który poprzez selektywne wiązanie się do mRNA apoCIII w regionie nieulegającym translacji po stronie 3' cząsteczki (3'UTR), zapobiega syntezie białka apoCIII na drodze wykorzystania zależnego od RNazy H1 mechanizmu degradacji mRNA. Obniżenie produkcji apoCIII sprzyja redukcji poziomu triglicerydów poprzez wykorzystanie szlaków niezależnych od LPL. W pierwszej fazie badań klinicznych zaobserwowano zależną od dawki redukcję stężenia apoCIII w osoczu oraz jednoczesne obniżenie poziomu triglicerydów. W trzeciej fazie badań klinicznych, u pacjentów z FCS i hipertriglicerydemią, dołączenie wolanesorsenu do istniejących podstawowych terapii hipolipemizujących zmniejszyło poziom triglicerydów na czczo (o 72%), cholesterolu całkowitego (o 39%), apoCIII (o 84%), apoB48 (o 75%) i triglicerydów zawartych w chylomikronach (o 77%) po trzech miesiącach stosowania [24]. Wolanesorsen jest gapmerem zawierającym po pięć nukleotydów 2'MOE po obu stronach cząsteczki. Posiada także zmetylowane reszty pirymidyn – cytozyny i uracylu, co może zwiększać siłę wiązania z docelowym mRNA [2]. Lek podawany jest w postaci iniekcji podskórnej i szybko wchłania się z miejsca podania. Wiąże się w ponad 95% z białkami osocza, a jego okres półtrwania we krwi wynosi 12-31 dni. Podawany jest raz w tygodniu, a w późniejszej fazie leczenia – raz na dwa tygodnie. Metabolity wydalane są z moczem [24].

Inotersen

Dziedziczna amyloidozą transtyretynową jest chorobą autosomalną dominującą, którą charakteryzuje odkładanie się amyloidu transtyretyny (TTR) w sercu, nerkach, obwodowym układzie nerwowym oraz przewodzie pokarmowym [25]. Transtyretyna jest białkiem transportowym krwi, które jest odpowiedzialne za transport tyroksyny (jako jedno z trzech różnych białek) oraz białka wiążącego retinol, które transportuje w krwi retinol. TTR występuje jako homotetramer. U osób chorych, zmutowany wariant białka

wywołuje destabilizację homotetrameru, a następnie oligomeryzację monomerów białka, i odkładanie się włókien w tkankach [25–27]. Różne mutacje *TTR* mogą skutkować różnym nasileniem poszczególnych objawów klinicznych. Najczęstszą mutacją prowadzącą do nasilonej polineuropatii jest zamiana waliny na metioninę w pozycji 30. łańcucha polipeptydowego [27]. Poprzednie terapie wykorzystujące przeszczep wątroby czy małowcząsteczkowe stabilizatory (np. tafamidis, który stabilizuje tetrametr, wiążąc się w miejscu wiązania tyroksyny) nie wykazywały wystarczającej skuteczności w zatrzymywaniu progresji choroby [25]. Inotersen jest gapmerem z 5 nukleotydami 2'-MOE na obu końcach łańcucha oligonukleotydowego oraz 10 nukleotydami DNA umiejscowionymi centralnie [25]. Wiąże się on do regionu 3'UTR mRNA transtyretyny i stymuluje jego degradację poprzez wykorzystanie ścieżki zależnej od RNazy H1, uniemożliwiając tym samym powstanie białka [26]. Inotersen podawany jest podskórnie raz w tygodniu. Wskazaniem do stosowania jest amyloidoza transtyretynowa z klinicznymi objawami polineuropatii. Po 18-miesięcznym okresie stosowania leku odpowiedź terapeutyczną uzyskano u 60% chorych [25]. Inotersen prowadzi do znaczącego obniżenia stężenia białka TTR w krwi (o 75-80%), co skutkuje złagodzeniem przebiegu choroby i podniesieniem jakości życia pacjentów [26,27]. Dowiedziano jednakże, iż lek ten może powodować nagłą i nieprzewidywalną małopłytkowość, a także kłębuszkowe zapalenie nerek, mogące wymagać terapii immunosupresyjnej, z możliwą niewydolnością nerek i koniecznością dializy. W trakcie leczenia konieczna jest suplementacja witaminy A [26].

ASO wpływające na proces składania pre-mRNA

Proces zachodzący w cytoplazmie translacji jest poprzedzony składaniem pre-mRNA (splicing) do dojrzałego mRNA w jądrze komórkowym. W wycinaniu intronów i łączeniu eksonów biorą udział kompleksy rybonukleinowo-białkowe (spliceosom), których działanie podlega regulacji między innymi dzięki obecności wewnątrz sekwencji pre-mRNA odcinków stymulujących (wzmacniacze składania) lub hamujących (wyciszacze składania) wycinanie intronów [28]. Na skutek alternatywnego splicingu powstawać mogą różne warianty białka. Poprzez wpływ na powszechność występowania danego wariantu składania można uzyskać efekt terapeutyczny [14,15]. Antysensowne

oligonukleotydy modulujące splicing (SSO) są projektowane w taki sposób, aby wiążąc się z pre-mRNA, tworzyły steryczną blokadę dla czynników biorących udział w regulacji procesu składania pre-mRNA. Tym sposobem SSO wpływają na proces rozpoznawania miejsc składania przez spliceosom, czego skutkiem jest modyfikacja splicingu docelowego transkryptu. Wszystkie nukleotydy takich SSO są chemicznie zmodyfikowane tak, aby uniemożliwić rozpoznanie i przecięcie kompleksu pre-mRNA-SSO przez RNazę H1 [13,14].

Ze względu na efekt modulacji składania pre-mRNA, wyróżnia się dwie grupy SSO – mogą one stymulować zachowanie lub pominięcie eksonu w ostatecznym transkrypcie.

Nusinersen w leczeniu SMA

Rdzeniowy zanik mięśni (SMA) to choroba neurologiczna występująca w kilku, różniących się przebiegiem, wariantach klinicznych, która wynika z dysfunkcji neuronów ruchowych, spowodowanej niemal zawsze mutacjami w obrębie genu *SMN1* (ang. *survival motor neuron*). Jest to najczęstsza genetyczna przyczyna śmierci dzieci, dla której poszukiwanie skutecznej terapii stanowi priorytet wśród badań [15]. Przebieg choroby zależy między innymi od liczby kopii paralogicznego genu *SMN2*. Choć różnice w sekwencjach obu genów dotyczą jedynie kilku nukleotydów, to odpowiadają one za odmienny przebieg składania RNA. Uważa się, iż zamiana reszty C na T w pozycji 6 eksonu 7 genu *SMN2* sprawia, że obszar ten nie jest dłużej rozpoznawany jako eksonowy wzmacniacz składania, co skutkuje zaburzeniem wykrywania granicy eksonu 7. Do wykluczenia eksonu 7 z dojrzałego transkryptu przyczynia się także obecność intronowego wyciszacza składania w intronie 7. Powstające, na bazie transkryptu *SMN2*, białko SMN jest zatem pozbawione fragmentu kodowanego przez ekson 7 i ulega szybkiej degradacji [28,29]. Fizjologicznie tylko niewielki odsetek dojrzałych transkryptów *SMN2* zawiera ekson 7. Taki wariant składania jest jednak możliwy. Z tego względu, terapeutycznie korzystne jest zastosowanie strategii zwiększającej szansę na włączenie eksonu 7 w trakcie składania mRNA *SMN2* do ostatecznego transkryptu, co umożliwi syntezę białka pełniącego takie same funkcje, jak w przypadku białka kodowanego przez *SMN1*.

Nusinersen jest komplementarny do sekwencji intronowego wyciszacza składania w intronie 7.

Zablokowanie funkcji wyciszacza poprzez związanie nusinersenu umożliwia włączenie eksonu 7 do dojrzałego transkryptu SMN2 przez spliceosom. Skutkuje to powstaniem funkcjonalnego białka SMN pełnej długości w wyniku ekspresji genu *SMN2* [13]. Nusinersen jest 18-merowym oligonukleotydydem, w którym grupy fosforanowe zastąpiono grupami tiofosforanowymi, a w pozycji 2' pierścienia rybozy wprowadzono grupy 2-metoksyetylowe [29]. Nusinersen w badaniach *in vivo* znacząco podnosi poziom białka SMN, przez co prowadzi do zmniejszenia degeneracji neuronów ruchowych w rdzeniu kręgowym, powodując tym samym spowolnienie, a nawet zahamowanie progresji choroby. Część pacjentów staje się zdolna do samodzielnego siedzenia, a nawet chodzenia, co byłoby niemożliwe w przypadku braku leczenia [30,31]. Podane systemowo ASO praktycznie nie przenikają przez barierę krew-mózg. Z tego względu nusinersen jest podawany dooponowo poprzez nakłucie łądźwiowe. Czas półtrwania w płynie mózgowo-rdzeniowym jest bardzo długi i wynosi około 150 dni. Pierwsze dawki wysycające podaje się co kilkanaście dni, następnie dawki podtrzymujące podaje się co cztery miesiące. Lek może powodować zwiększone ryzyko uszkodzenia nerek oraz małopłytkowość [28,31].

ASO stosowane w leczeniu dystrofii mięśniowej Duchenne'a

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) to choroba sprzężona z chromosomem X, występująca z częstotliwością około 1:3500-5000 urodzeń chłopców, która jest spowodowana mutacjami w genie *DMD* kodującym białko dystrofinę [32]. Dystrofina pełni w komórkach mięśniowych ważną funkcję, zakotwicząc białka cytoszkieletu wewnątrzkomórkowego do białek znajdujących się w błonie komórkowej miocyty i w macierzy pozakomórkowej. Dzięki temu dystrofina stabilizuje włókna mięśniowe w trakcie skurczu. W przybliżeniu 70% mutacji *DMD* stanowią delecje eksonów (przede wszystkim eksonów 43-55) prowadzące do przesunięcia ramki odczytu, czego skutkiem jest przedwczesna terminacja translacji lub powstanie niefunkcjonalnego białka. Brak funkcjonalnej dystrofiny skutkuje postępującym osłabieniem mięśniowym, rozpoczynającym się zazwyczaj przed 6. rokiem życia, w wyniku którego następuje utrata zdolności chodzenia do 12. roku życia. Śmierć następuje zazwyczaj w drugiej dekadzie życia w wyniku niewydolności mięśni oddechowych lub rozwijającej

się kardiomiopatii, będącej główną przyczyną zgonu u około 30% chorych [14]. Celem stosowania ASO w leczeniu DMD jest przywrócenie prawidłowej ramki odczytu poprzez pominięcie eksonu w trakcie składania pre-mRNA, co skutkuje syntezą krótszej, ale funkcjonalnej dystrofiny [33]. Dzięki temu może dojść do złagodzenia objawów choroby. Spektrum mutacji, które wykrywa się u pacjentów z DMD, jest szerokie, dlatego nie ma uniwersalnej strategii terapeutycznej. Mutacje występujące w różnych odcinkach genu *DMD* wymagają innych ASO dla przywrócenia zaburzonej przez mutację ramki odczytu. Przed wyborem odpowiedniego ASO konieczne jest zatem określenie rodzaju mutacji występującej u konkretnego pacjenta

Eteplirsen

Eteplirsen to 30-merowy oligonukleotyd typu PMO. W przypadku około 14% chorych na DMD eteplirsen pozwala na przywrócenie prawidłowej ramki odczytu w genie kodującym dystrofinę, poprzez pominięcie eksonu 51. W wyniku stosowania leku u pacjentów dochodziło do wzrostu poziomu dystrofiny w mięśniach szkieletowych, spowolnienia utraty zdolności chodzenia oraz spadku tempa pogarszania się funkcji oddechowych. Jednakże niejednoznaczne korzyści kliniczne spowodowały, że lek nie został zarejestrowany w Europie, choć został warunkowo dopuszczony do obrotu w USA. Eteplirsen jest podawany raz w tygodniu na drodze iniekcji dożylniej w dawce 30 mg/kg. Lek cechuje się słabym wiązaniem z białkami osocza oraz szybkim wydalaniem z moczem, dlatego możliwe, że zwiększenie dawki jednorazowej i częstotliwości dawkowania wpłynęłoby korzystnie na skuteczność terapeutyczną [1,28,34].

Golodirsen

Golodirsen to należący do podklasy PMO antysensowny oligonukleotyd prowadzący do pominięcia eksonu 53 w trakcie składania pre-mRNA dystrofiny i powstawania krótszej, ale funkcjonalnej dystrofiny u pacjentów z DMD podatną na pominięcie eksonu 53 (około 8% wszystkich pacjentów z DMD). W drugiej fazie badań klinicznych pacjenci otrzymywali golodirsen w dawce 30 mg/kg raz w tygodniu. W 48 tygodniu pacjenci wykazywali 100% odpowiedź związaną z pominięciem eksonu 53. Średni poziom dystrofiny oceniany metodą Western blot wzrósł szesnastokrotnie w porównaniu do wartości początkowej [32]. Do działań niepożądanych występujących częściej niż

w grupie placebo należały: ból głowy, gorączka, upadek, ból brzucha, zapalenie błony śluzowej nosa i gardła, wymioty i nudności. Odnotowano także reakcje nadwrażliwości, do których należały wysypka, gorączka, świąd, pokrzywka, zapalenie i złuszczenie skóry. Nie zaobserwowano toksyczności nerkowej w badaniach klinicznych [33].

Kolejnym ASO opracowanym do leczenia DMD jest kasimersen. Lek ten stymuluje z kolei pominięcie eksonu 45, co daje możliwość leczenia około 8% chorych [33].

Wiltolarsen

Wiltolarsen to 21-merowy PMO zmodyfikowany oligonukleotyd antysensowny, który wiąże się z mRNA dla dystrofiny, prowadząc do pominięcia eksonu 53 i przywrócenia ramki odczytu. Efektem jest powstanie skróconego białka zawierającego jednak kluczowe części funkcjonalne. Lek może więc być użyty u pacjentów wykazujących delecję eksonu 52 lub delecje kilku sąsiadujących eksonów: 43-52, 45-52, 47-52, 48-52 lub 50-52 [35]. Analiza Western blot biopsjatów mięśni pobranych po 12 i 24 tygodniach podawania wiltolarsenu w dawce 80 mg/kg wykazała obecność dystrofiny w ilościach wynoszących odpowiednio 0,76% i 4,81% normalnego poziomu. Co więcej, badane w tygodniu 25. parametry takie jak czas wstawania z pozycji leżącej, czas i prędkość biegu/chodu na 10m oraz przebyty dystans w teście 6-minutowego chodu, uległy istotnej poprawie u pacjentów otrzymujących wiltolarsen, w porównaniu z dopasowaną grupą kontrolną. Wiltolarsen jest podawany dożylnie w dawce 80 mg/kg raz w tygodniu. Lek jest wydalany z moczem w postaci niezmiennionej. Lek był dobrze tolerowany w drugiej fazie badań klinicznych, a jedynym odnotowanym działaniem niepożądanym związanym z podawaniem leku było wynaczynienie w miejscu infuzji [35].

Perspektywy terapeutycznego zastosowania ASO

Elastyczność strategii ASO, związana z łatwością zaprojektowania sekwencji nukleotydów specyficznej wobec dowolnego celu molekularnego, włączając niekodujące RNA [1], sprawia, że stanowi ona atrakcyjną platformę terapeutyczną w przypadku różnych chorób, dla których brakuje skutecznych form leczenia, a których mechanizmy molekularne są na tyle dobrze poznane, że pozwala to wytypować cel molekularny, względem którego dobierana jest

selektywna sekwencja ASO. Aktualnie prowadzonych jest wiele badań klinicznych, które testują aktywność ASO w terapii różnych chorób, w tym rzadkich [4]. Ciekawym przykładem jest mirawirsen o działaniu przeciwwirusowym. Ten 15-merowy zmodyfikowany LNA i PS oligonukleotyd specyficznie wiąże cząsteczkę mikroRNA (miR-122), która pełni ważną rolę w cyklu życiowym wirusa HCV, chroniąc jego RNA przed atakiem nukleaz [2]. Dzięki obecności LNA w ośmiu wybranych pozycjach w sekwencji mirawirsenu jego wiązanie z miR-122 jest silne, a powstały heterodupleks stabilny [6]. Uniemożliwia to związanie miR-122 z wirusowym RNA i jego stabilizację, dzięki czemu spada miano wirusa HCV.

Podjęte są też próby zastosowania ASO w leczeniu schorzeń neurologicznych. W zaawansowanych badaniach klinicznych znajduje się tominersen, który stosowany jest w leczeniu płasawicy Huntingtona, choroby wywołanej mutacją w genie *HTT* kodującym huntingtynę. Tominersen jest gapmerem stymulującym rozkład mRNA dla *HTT*, dzięki czemu obniża się poziom huntingtyny w ośrodkowym układzie nerwowym, czego miarą jest spadek zawartości tego białka w płynie mózgowo-rdzeniowym. Dawki leku podawane są dooponowo co dwa miesiące [36]. Preparat ma aktualnie status leku sierocego w Europie i USA.

Kilka ASO o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym znajduje się we wczesnych fazach badań klinicznych. Danwatirsen (AZD9150) jest ASO trzeciej generacji, który zawiera w cząsteczce reszty cEt. Zmniejsza on syntezę białka STAT3, które jako czynnik transkrypcyjny pełni istotną rolę w promowaniu wzrostu i namnażania się komórek w różnych typach nowotworów. Danwatirsen wykazywał skuteczność w terapii pacjentów z chłoniakiem, u których wcześniej zawiodły inne formy leczenia [37]. Z kolei apatorsen (OGX-427) jest ASO drugiej generacji skierowanym wobec mRNA dla białka opiekuńczego Hsp27, którego poziom jest często podwyższony w nowotworach. Zmniejszenie ilości Hsp27 może uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie leków cytotoksycznych. Połączenie apatorsenu z docetakselem prowadziło do wydłużenia czasu przeżycia u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego [38].

Podsumowanie

Badania ostatnich dziesięcioleci sprawiły, że zoptymalizowano strukturę chemiczną ASO pod kątem stabilności i siły wiązania cząsteczek. Choć nieopa-

kowane cząsteczki ASO są pobierane przez komórki na drodze gymnozy, to proces ten jest często mało wydajny [8,15]. Aktualnym wyzwaniem pozostaje opracowanie systemów celowanego dostarczenia ASO do tkanek, tym bardziej że nie wszystkie tkanki są penetrowane przez ASO z równą wydajnością. W tym celu przygotowuje się nanoprzenośniki lub dokonuje koniugacji ASO z cząsteczkami, które umożliwiają bardziej selektywny wychwyt przez docelowe tkanki. Przykładem jest koniugacja ASO z peptydem GLP-1, którego receptor znajduje się na powierzchni komórek β wysp Langerhansa trzustki. Spowodowało to 40-krotny wzrost siły działania ASO w tych komórkach [5]. Również koniugacja z dendrymerami może zwiększać penetrację ASO do komórek, podobnie jak koniugacja z peptydami penetrującymi CPP, takimi jak penetratyna. Ponadto, znaczące zwiększenie przenikania ASO do komórek uzyskać można dzięki tworzeniu nanocząsteczek na bazie lipidów kationowych (np. DOTMA, DOTAP), które dodatkowo zwiększają

ucieczkę endosomalną ASO do cytoplazmy, poprzez destabilizację błony endosomu po obniżeniu pH w jego wnętrzu [8]. Nowe odkrycia w zakresie celowanego dostarczenia, w połączeniu z bardziej dogłębnym rozumieniem procesu endocytozy ASO, umożliwią zapewne optymalizację działania ASO skierowanych wobec różnych tkanek, a być może także redukcję koniecznych dawek.

Konflikt interesów / Conflict of interest
Brak/None

Adres do korespondencji / Correspondence address
✉ Jarosław Paluszczak
Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego
ul. Świącickiego 4, 60-781 Poznań
☎ (+48 61) 854 66 24
✉ paluszcz@ump.edu.pl

Piśmiennictwo/References

1. Yin W, Rogge M. Targeting RNA : A Transformative Therapeutic Strategy. *Clin Transl Sci.* 2019;12(2):98–112.
2. Smith CIE, Zain R. Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. 2019;59:605-30.
3. Dammes N, Peer D. Paving the Road for RNA Therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* 2020;41(10):755–75.
4. Sridharan K, Gogtay NJ. Therapeutic nucleic acids: current clinical status. *Br J Clin Pharmacol.* 2016;82(3):659–72.
5. Seth PP, Tanowitz M, Bennett CF. Selective tissue targeting of synthetic nucleic acid drugs. *J Clin Invest.* 2019;129(3):915–25.
6. Oberemok VV, Laikova KV, Repetskaya AI, et al. A Half-Century History of Applications of Antisense Oligonucleotides in Medicine, Agriculture and Forestry: We Should Continue the Journey. 2018;23(6):1302.
7. Geary RS, Norris D, Yu R, et al. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;87:46–51.
8. Chan JH, Lim S, Wong WF. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(5-6):533–40.
9. Khvorova A, Watts JK. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat Biotechnol.* 2017;35(3):238–48.
10. Crooke ST, Witztum JL, Bennett CF, et al. RNA-Targeted Therapeutics. *Cell Metab.* 2018;27(4):714–39.
11. Yoshida T, Naito Y, Sasaki K, et al. Estimated number of off-target candidate sites for antisense oligonucleotides in human mRNA sequences. *Genes Cells.* 2018;23(6):448–55.
12. Watt AT, Swayze G, Swayze EE, et al. Likelihood of Nonspecific Activity of Gapmer Antisense Oligonucleotides Is Associated with Relative Hybridization Free Energy. *Nucleic Acid Ther.* 2020;30(4):215–28.
13. Scoles DR, Minikel EV, Pulst SM. Antisense oligonucleotides: A primer. *Neurol Genet.* 2019;5(2):e323.
14. Havens MA, Hastings ML. Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(14):6549–63.
15. Shen X, Corey DR. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(4):1584-1600.
16. Iwamoto N, Butler DCD, Svrzikapa N, et al. Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol.* 2017;35(9):845–51.
17. Geary RS, Watanabe TA, Truong L, et al. Pharmacokinetic properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified oligonucleotide analogs in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;296(3):890–7.
18. Swayze EE, Siwkowski AM, Wancewicz EV, et al. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(2):687–700.

19. Miller CM, Harris EN. Antisense Oligonucleotides: Treatment Strategies and Cellular Internalization. *RNA Dis* Houston Tex. 2016;3(4):e1393.
20. Crooke ST. Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2017;27(2):70–7.
21. Wu H, Lima WF, Zhang H, et al. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J Biol Chem.* 2004;279(17):17181–9.
22. Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:259–93.
23. Jakubiak GK, Moj M. Mipomersen - właściwości farmakologiczne i rola w praktyce klinicznej. *Lek w Polsce.* 2017;27:54-60.
24. Paik J. Volanesorsen: First Global Approval. *Drugs.* 2019;79(12):1349-1354.
25. Mathew V, Wang AK. Inotersen: new promise for the treatment of hereditary transthyretin amyloidosis. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:1515–25.
26. Gales L. Tegsedi (Inotersen): An Antisense Oligonucleotide Approved for the Treatment of Adult Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Pharmaceuticals (Basel).* 2019;12(2):78.
27. Gertz MA, Scheinberg M, Waddington-Cruz M, et al. Inotersen for the treatment of adults with polyneuropathy caused by hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2019;12(8):701–11.
28. Paluszczak J. Proces składania RNA jako cel oddziaływania terapeutycznego. *Farmacja Polska.* 2019;75(11):605–16.
29. Meijboom KE, Wood MJA, McClorey G. Splice-Switching Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *Genes.* 2017;8(6):161
30. Gidaro T, Servais L. Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: current knowledge and existing gaps. *Dev Med Child Neurol.* 2019;61(1):19–24.
31. Neil EE, Bisaccia EK. Nusinersen: A Novel Antisense Oligonucleotide for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *J Pediatr Pharmacol Ther JPPT Off J PPAG.* 2019;24(3):194–203.
32. Frank DE, Schnell FJ, Akana C, et al. Increased dystrophin production with golodirsen in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2020;94(21):e2270–82.
33. Heo Y-A. Golodirsen: First Approval. *Drugs.* 2020;80(3):329–33.
34. Pitout I, Flynn LL, Wilton SD, et al. Antisense-mediated splice intervention to treat human disease: the odyssey continues. *F1000Research.* 2019;8:710.
35. Dhillon S. Viltolarsen: First Approval. *Drugs.* 2020;80(10):1027–31.
36. Tabrizi SJ, Leavitt BR, Landwehrmeyer GB, et al. Targeting Huntingtin Expression in Patients with Huntington’s Disease. *N Engl J Med.* 2019;380(24):2307–16.
37. Hong D, Kurzrock R, Kim Y, et al. AZD9150, a next-generation antisense oligonucleotide inhibitor of STAT3 with early evidence of clinical activity in lymphoma and lung cancer. *Sci Transl Med.* 2015;7(314):314ra185-314ra185.
38. Rosenberg JE, Hahn NM, Regan MM, et al. Apatorsen plus docetaxel versus docetaxel alone in platinum-resistant metastatic urothelial carcinoma (Borealis-2). *Br J Cancer.* 2018;118(11):1434–41.