

Penghambatan Ekspresi Gen dengan Antisense Oligonukleotida sebagai Upaya Pengobatan Penyakit

DIAN R. LAKSMITAWATI^{1*}, ANI RETNO PRIJANTI²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila
Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta, 12640

²Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Salemba, Jakarta

Diterima 4 April 2005, Disetujui 13 Juli 2005

Abstract: Due to the development of biomolecular science eg. overexpression genes, genes that cause diseases can be identified. Based on this fact, researchers developed a therapeutic strategy by inhibiting the gene expression using oligonucleotide antisense. Therapy using oligonucleotide antisense was based on a natural process of gene expression. Specific artificial antisense will match complementary with DNA and mRNA. By this process the transcription will stop. The effort of therapy is relatively new but a few have been carried out in the clinical trial phase. Obstacles are encountered in reaching the target cell by the oligonucleotide antisense.

Key words: oligonucleotide, antisense, gene expression, therapy

PENDAHULUAN

Melalui penelitian di bidang biologi molekuler diketahui bahwa kehidupan organisme diatur oleh gen dan ekspresinya. Pengaturan ekspresi gen merupakan suatu proses yang amat kompleks melibatkan berbagai macam faktor. Ketidaknormalan dalam susunan basa pada gen dan ekspresinya dapat menyebabkan suatu penyakit.

Dengan kemajuan teknologi telah dapat diidentifikasi beberapa gen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya suatu penyakit. Dengan informasi ini maka dapat dirancang suatu strategi pengobatan dengan cara memanipulasi gen-gen tersebut. Bila terdapat defek suatu gen normal dapat diupayakan penggantian gen dengan metode transfer gen sedangkan bila terjadi overekspresi dalam ekspresi gen maka dilakukan terapi dengan antisense untuk menghambat terjadinya ekspresi yang abnormal tersebut^(1, 2).

Strategi pengobatan dengan antisense didasarkan pada peristiwa alamiah proses ekspresi gen. Selama proses transkripsi informasi DNA ke mRNA, untai ganda DNA yang saling berkomplementer akan terbuka. Untai sense akan terpisah dari untai antisense.

Untai DNA antisense dengan arah 3'-5' selanjutnya berperan menjadi cetakan untuk membentuk mRNA dengan arah 5'-3', suatu proses yang dikenal dengan transkripsi. Kemudian mRNA bermigrasi ke sitoplasma dimana kompleks ribosom dapat menterjemahkan informasi yang dibawa oleh mRNA menjadi suatu bentuk polipeptida atau protein tertentu. Proses ini dikenal dengan translasi^(3, 4). Pengobatan dengan antisense buatan dimaksudkan agar sekuen spesifik dari mRNA yang membawa pesan genetik dapat diikat secara komplementer oleh antisense buatan tersebut sehingga kompleks ribosom tidak lagi dapat membaca pesan dan akhirnya produk gen yang bersangkutan tidak terbentuk^(1, 2, 5, 6, 7). Selain pada tahap translasi penghambatan ekspresi gen juga dapat dilakukan pada tahap transkripsi dengan cara pembentukan untai tiga terpilin^(1, 5, 6, 8, 9).

Terapi dengan antisense relatif baru dan masih berada dalam uji klinik awal. Paling kurangnya ada 12 jenis antisense oligonukleotida yang diizinkan untuk diuji secara klinik. Dalam perkembangannya tidak mudah untuk mencapai keberhasilan terapi. Hal itu disebabkan antara lain karena kestabilan oligonukleotidanya sendiri terhadap aktifitas enzim-enzim ekstraseluler dan intraseluler dan metode penyampaian yang juga mempengaruhi amplitudo seluler.

Dalam makalah ini akan dibahas mengenai mekanisme antisense dalam menghambat ekspresi

* Penulis untuk korespondensi, Hp. 08161315384,
e-mail: guti@centrin.net.id

Antisense oligonukleotida dapat menghambat ekspresi gen pada tahap transkripsi melalui pembentukan untai tiga terpilin ataupun pada tahap translasi melalui hibridasi mRNA dengan antisense⁽¹⁾ (Gambar 1).

PENGHAMBATAN EKSPRESI GEN PADA TINGKAT TRANSKRIPSI

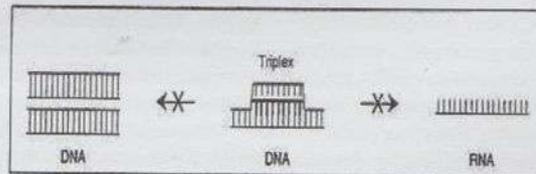
Transkripsi adalah suatu proses dimana RNA terbentuk dari hasil pencetakan DNA. Beberapa faktor turut berperan dalam proses transkripsi ini seperti RNA polimerase, promotor dan *enhancer*, faktor transkripsi^(3,4).

Penghambatan ekspresi gen pada tingkat transkripsi dapat dicapai dengan menggunakan oligodeoksinukleotida (ODN) sintetik yang dapat berhibridisasi dengan DNA untai ganda sehingga terbentuk DNA untai tiga terpilin (Gambar 2)^(10, 11, 12). DNA dalam bentuk ini menyebabkan gagalnya pengikatan faktor transkripsi pada gen promotor

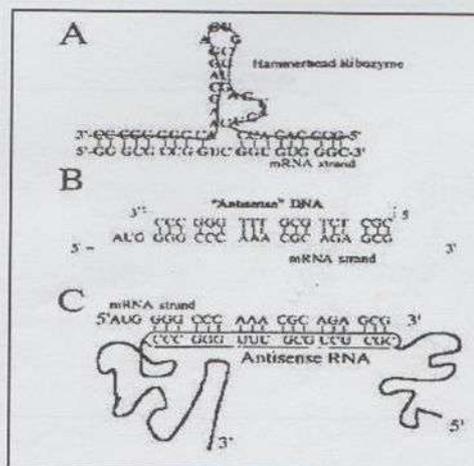
sehingga transkripsi dapat dihambat. Selain itu ODN yang membentuk untai tiga tersebut dapat mengakibatkan tidak terbukanya untai ganda DNA. Selain transkripsi, pembentukan untai tiga terpilin ini juga mengakibatkan terhambatnya replikasi DNA (Gambar 3).

Pada untai tiga terpilin masing-masing basa pada sekuen ODN membentuk 2 (dua) ikatan hidrogen dengan basa penyusun untai ganda yang berkomplementer. Hibridasi dengan purin membentuk polipurin-polipirimidin dimana A (adenin) atau T (timin) pada ODN berikatan pada pasangan A-T DNA untai ganda, sedangkan G berikatan dengan pasangan G-C dan C dapat juga terikat dengan G dari pasangan G-C jika dalam keadaan terprotonisasi (C⁺).

Stabilitas untai tiga terpilin tergantung dari sejumlah faktor diantaranya panjang ODN, terdapatnya basa yang tidak berpasangan dan aktivitas helikase. Berdasarkan percobaan maka panjang ODN sebanyak 13 nukleotida dianggap



Gambar 3. Mekanisme penghambatan pada tingkat transkripsi (dan replikasi)⁽⁶⁾.



Gambar 4. Penghambatan ekspresi gen pada tingkat translasi dengan ribozim *hammerhead* (A), antisense oligodeoksinukleotida (B), antisense RNA (C) ⁽¹⁾.

merupakan jumlah minimum untuk ODN jenis fosforotioat⁽¹⁷⁾. Terdapatnya basa yang tidak berpasangan dapat menimbulkan masalah terutama bila terletak di bagian tengah untai karena dapat menyebabkan terjadinya nukleasi yang memperlambat proses asosiasi pasangan basa antara ODN dengan untai sasaran (DNA untai ganda) serta menurunkan afinitas pengikatannya⁽⁷⁾. Helikase yaitu suatu enzim yang berperan dalam membuka untai ganda DNA agar dapat ditranskripsi menjadi RNA, dapat memecah DNA untai tiga sehingga terjadi kegagalan penghambatan proses transkripsi⁽¹⁴⁾.

Beberapa penelitian sedang dilakukan untuk mengatasi masalah ini. Salah satunya adalah dengan meningkatkan afinitas pengikatan ODN dengan cara mengikat gugus interkalasi seperti akrudin dan psoralen pada DNA untai ganda^(10, 12, 13).

PENGHAMBATAN EKSPRESI GEN PADA TINGKAT TRANSLASI

Translasi adalah pembacaan kode triplet pada untai mRNA oleh kompleks ribosom yang pada akhirnya menghasilkan suatu polipeptida^(3, 4). Penghambatan ekspresi gen pada tingkat translasi ini ditujukan secara langsung kepada mRNA menggunakan antisense (Gambar 4). Antisense dapat berupa antisense DNA maupun RNA dan ribozim.

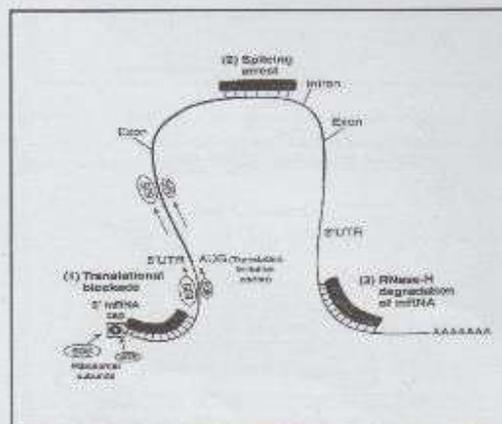
Antisense akan berkomplementer dengan mRNA ujung 5' (*5' cap site*) pada sel target membentuk untai ganda sehingga menyebabkan kompleks

ribosom tidak dapat membaca pesan serta tRNA tidak dapat bergabung untuk melakukan proses translasi. Dengan demikian maka polipeptida tidak dapat terbentuk⁽¹⁾. Selain itu pengikatan antisense pada mRNA dapat terjadi pada 5' dan 3' daerah yang tidak ditranslasi (5' dan 3' UTR), situs inisiasi translasi serta ujung poli-A. Pengikatan antisense pada ujung intron dan ujung ekson yang berdekatan mengakibatkan penghambatan proses *splicing* yang secara tidak langsung juga menghambat ekspresi gen⁽⁷⁾ (Gambar 5).

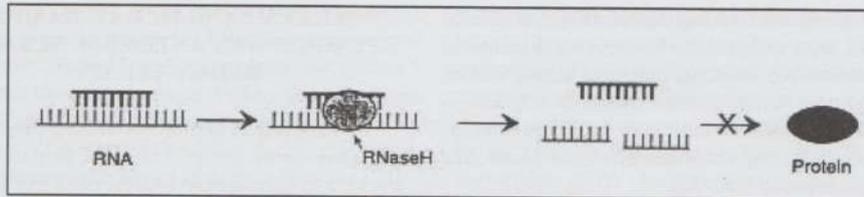
Penghambatan tersebut dapat menjadi gagal karena helikase dan RNA *unwindase* yang akan membuka untai ganda DNA-RNA maupun RNA-RNA⁽¹⁶⁾. Kompleks ribosom sendiri sebenarnya memiliki aktivitas *unwindase* sehingga pada akhirnya dapat melakukan pembacaan pada untai mRNA yang terpilin⁽¹⁾.

Beberapa antisense oligodeosinukleotida (ODN) berperan selain melakukan hibridisasi dengan mRNA juga menginduksi pemecahan mRNA oleh enzim RNase H. RNase H adalah enzim endonuklease yang dapat mengenal dan memecah RNA dalam untai ganda. Sekali molekul RNA terpecah, antisense oligonukleotida akan terdisosiasi dari untai ganda dan mempunyai kemampuan untuk mengikat target mRNA yang lain^(7, 17) (Gambar 6).

Antisense RNA yang digunakan untuk menghambat proses translasi berperan membentuk untai ganda RNA-RNA. Selain itu untai ganda RNA yang terbentuk dapat berperan sebagai substrat bagi enzim



Gambar 5. Mekanisme antisense oligonukleotida menghambat sintesis protein : (1) penghambatan pengikatan kompleks ribosom dengan mRNA pada ujung 5' (*5' cap site*), (2) menghambat proses *splicing*, (3) penghancuran hybrid mRNA oleh enzim RNase. Proses yang ketiga ini dapat terjadi di semua bagian pada mRNA (termasuk 5' dan 3' UTR, daerah inisiasi translasi, ekson atau intron) dengan syarat molekul antisensenyapun mempunyai afinitas yang cukup terhadap RNA⁽⁷⁾.



Gambar 6. Mekanisme penghancuran mRNA yang diperantarai oleh aktivitas enzim RNase. Untai ganda mRNA dengan oligonukleotida jenis tertentu dapat berperan sebagai substrat⁽⁶⁾.

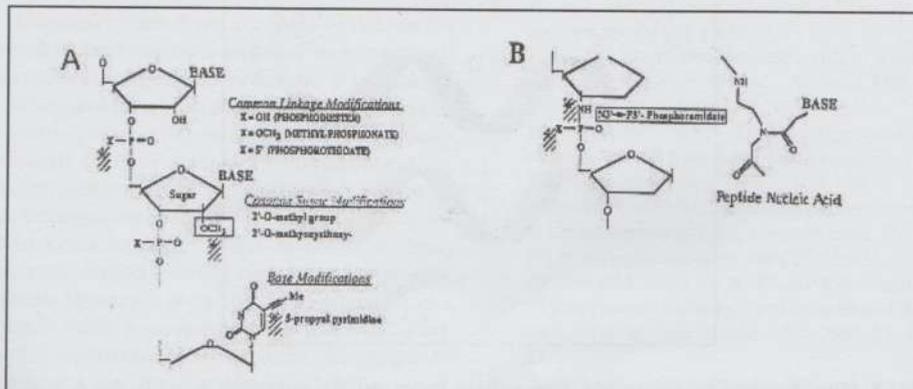
peng-edit seperti *double stranded adenosine deaminase (DRADA)*⁽¹⁸⁾. Pada waktu DRADA mendeaminasi adenosin, inosin akan terbentuk. Kehadiran inosin selanjutnya dapat melabel molekul mRNA untuk dihancurkan sehingga pesan yang dibawa mRNA tidak dapat terbaca.

Metode lain yang digunakan untuk menggagalkan transkripsi adalah dengan ribozim (Gambar 4). Ribozim adalah molekul RNA yang mempunyai kemampuan mengkatalisa pemecahan molekul RNA itu sendiri⁽¹⁹⁾. Ribozim dapat mengenal sekuens nukleotida yang spesifik umumnya GUX, dimana X = C, U atau A atau pada beberapa kasus dapat mengenal NUX, dimana N = nukleotida sembarang^(19, 20). Bila ribozim diinkorporasi ke dalam RNA untai tunggal dimana molekul pada pemecahan ujung 3' dan 5' dirancang untuk dapat berhibridisasi dengan mRNA maka molekul ini dapat melakukan terhadap mRNA setelah lebih dahulu melakukan hibridisasi. Aktivitas ribozim sangat efisien karena setelah molekul tersebut memecah mRNA maka ribozim tergantung pada ikatannya dengan kation divalent, panjang antisense dan lokasi target⁽²¹⁾.

STABILITAS OLIGONUKLEOTIDA

Oligonukleotida adalah suatu oligomer yang terdiri dari beberapa nukleosida yang masing – masing dihubungkan dengan ikatan fosfodiester (Gambar 7). Stabilitas oligonukleotida merupakan salah satu syarat berhasilnya terapi antisense. Untuk dapat berhibridisasi dengan target maka oligonukleotida harus mampu menembus membran dan stabil baik didalam lingkungan ekstraseluler maupun intraseluler. Terdapatnya enzim endonuklease dan eksonuklease dapat menyebabkan putusnya jembatan fosfodiester pada molekul DNA maupun RNA alamiah sehingga terpecah menjadi mononukleotida⁽²¹⁾.

Ada beberapa macam modifikasi oligonukleotida yang dilakukan untuk meningkatkan stabilitas yaitu metilfosfonat, fosforotioat, ditioat, *mixed-backbone oligonucleotide* (MBO) dan fosforamidat. Analog oligonukleotida ini berbeda dalam hal afinitasnya terhadap RNA, stabilitasnya terhadap nuklease dan kemampuannya mengaktivasi RNase⁽²²⁾.



Gambar 7. Modifikasi kimia oligonukleotida, (A) Modifikasi pada ikatan fosfodiester, gugus gula dan basa nukleosida, (B) Modifikasi N 3'-5' P fosforamidat dan asam peptida nukleat⁽¹⁾.

Metilfosfonat tidak lagi digunakan karena molekul ini tidak dapat menginduksi RNase H untuk memecah molekul mRNA sehingga dianggap kurang efisien dalam menghambat translasi. Selain itu molekulnya bersifat hidrofobik sehingga sulit bercampur. Strukturnya yang kiral menyebabkan penurunan afinitas terhadap mRNA.

Fosfortioat lebih disukai bahkan sedang memasuki tahap uji klinik. Pada molekul ini satu atom oksigennya diganti dengan atom sulfur sehingga dapat menginduksi aktivitas RNase. Selain itu molekul ini lebih resisten terhadap nuklease. Muatan negatifnya menjadikan molekul ini bersifat hidrofil dan sering menimbulkan kesulitan karena menyebabkan penurunan ambilan dari sel target. Selain itu adanya pusat kiral juga dapat menurunkan afinitas terhadap mRNA. Untuk mengatasi masalah tersebut maka dilakukan sintesis ditioat dimana atom oksigen bebas sebagai antisense adalah dengan menghambat elongasi RNA^(1, 23).

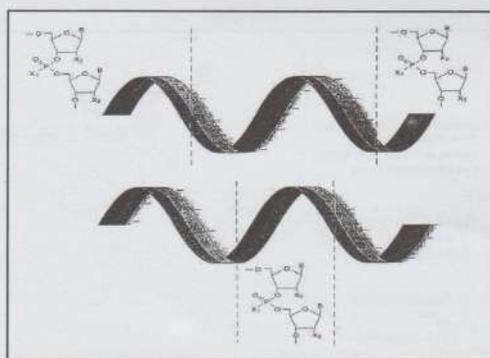
Usaha untuk memperoleh oligonukleotida yang stabil terhadap nuklease dan afinitas tinggi terhadap RNA serta dapat mengaktifasi RNase terus diupayakan. Salah satunya adalah dengan melakukan modifikasi campuran terhadap oligonukleotida atau *mixed-backbone oligonucleotide* (MBO) (Gambar 8).

Sekuen oligonukleotida dapat dirancang sedemikian rupa apabila gen target atau gen yang menimbulkan overekspresi sudah diketahui identitasnya. Panjang oligonukleotida yang biasanya digunakan sebagai antisense adalah 17 – 25 basa⁽⁶⁾. Hal ini tidak mutlak karena ada pustaka lain yang menyebutkan 15 – 20 basa⁽⁷⁾ dan 13 – 30 basa⁽¹⁾.

PERKEMBANGAN DAN HAMBATAN PENGGUNAAN ANTISENSE SEBAGAI BAHAN TERAPI

Perkembangan pemikiran tentang penggunaan antisense untuk terapi beberapa penyakit yang disebabkan karena overekspresi suatu gen didasari oleh penelitian Zamecnik dan Stephenson pada tahun 1978 yang membuktikan bahwa Rous Sarcoma virus (RSV) dapat dihambat oleh 13 oligomer nukleotida sintetik yang berkomplemen dengan mRNA spesifik dari RSV. Konsep ini kemudian berkembang terus sejalan dengan kemajuan identifikasi gen-gen penyebab beberapa jenis penyakit. Usaha pengobatan penyakit dengan antisense lebih disebabkan karena ingin mengobati penyakit tersebut langsung ke sasaran bukan hanya menghilangkan gejalanya saja seperti pada obat – obat sebelumnya^(1, 6, 22).

Lebih dari 2 sampai 3 tahun terakhir, banyak laporan yang menunjukkan penggunaan teknologi antisense secara *in vivo*, diantaranya⁽²²⁾: (1) Pemberian intravena oligonukleotida fosfortioat selama 10 hari pada bebek yang diinfeksi oleh virus hepatitis B, hamper seluruhnya mengeliminasi DNA virus dari hati hewan tersebut. (2) Injeksi subkutan tunggal dari antisense oligonukleotid fosfortioat subunit RI a dari protein kinase A (PKA) pada tikus dapat menghambat pertumbuhan tumor. (3) Pemberian antisense oligonukleotida kepada angiotensinogen dihati melalui pemberian vena portal atau injeksi langsung pada tikus yang menderita hipertensi bawaan menunjukkan penurunan tekanan darah. (4) Pemberian melalui intravena antisense oligonukleotida fosfortioat *c-myc* mengurangi per-



Gambar 8. Mixed-backbone oligonukleotida. Menempatkan ikatan metilfosfonat (gugus $X_1 = CH_3$ dan $X_2 = H$) pada kedua ujung oligonukleotida fosfortioat dapat mengurangi efek samping yang disebabkan karena sifat polianion oligonukleotida, meningkatkan stabilitas *in vivo* dengan melindungi kedua ujung fosfortioat dari aktivitas eksonuklease (atas). Sedangkan menempatkan 2'-metil ribonukleotida ($X_1 = S$, $X_2 = OCH_3$) meningkatkan afinitas oligonukleotida terhadap RNA dan juga stabilitas *in vivo*⁽²³⁾.

tumbuhan tumor pada mencit yang membawa sel melanoma manusia. (5) Pemberian *end-capped* antisense oligonukleotida pada oksitoksin selama 3 hari pada tikus dapat mengakibatkan penghambatan laktasi. (6) Penyampaian antisense oligonukleotida reseptor VI vasopresin ke dalam daerah septal otak dapat mengurangi kecemasan pada tikus.

Untuk dapat menimbulkan efek penghambatan terhadap ekspresi gen maka antisense oligonukleotida harus berpenetrasi melalui membran sel masuk ke dalam sel sasaran. Ambilan seluler dan cara penyampaian antisense ke sel sasaran masih merupakan masalah yang sulit diatasi⁽⁸⁾. Oligonukleotida yang belum dimodifikasi (fosfodiester) dan oligonukleotida fosforotioat yang mengandung atom sulfur bersifat sebagai polianion. Oleh sebab itu kedua jenis oligonukleotida tersebut hanya mempunyai kemampuan yang kecil atau bahkan sama sekali tidak dapat menembus membran sel. Hanya dengan mekanisme yang melibatkan energi kedua jenis oligonukleotida tersebut dapat menembus membran. Hal tersebut dapat tercapai dengan mekanisme endositosis yang digerakkan oleh pengikatan dengan sejenis protein reseptor pada permukaan sel⁽⁸⁾.

Beberapa usaha lain juga dilakukan demi meningkatkan ambilan sel antara lain dengan mikroinjeksi, modifikasi sel target agar dapat permeabel terhadap oligonukleotida, elektoporasi, membungkus oligonukleotida dengan vektor buatan atau mengkonjugasikan oligonukleotida dengan ligan spesifik terhadap reseptor di sel target⁽¹⁾. Diantara usaha-usaha tersebut yang paling disenangi dan menjadi fokus utama adalah membungkus oligonukleotida dengan vektor buatan dalam hal ini liposome^(1, 5, 6, 8). Liposom yang mengandung antibodi spesifik terhadap sel permukaan berpotensi untuk penyampaian oligonukleotida ke sel sasaran⁽⁶⁾.

Oligonukleotida dapat berinteraksi dengan sel spesifik melalui konjugasi antisense dengan antibodi atau protein yang reseptornya terdapat di permukaan sel. Konjugasi yang telah dilakukan adalah konjugasi asialoosomuroid dengan antisense HBV terhadap hepatosit melalui reseptor asialoglikoprotein. Transferin dikonjugasikan dengan oligonukleotida untuk menginduksi ambilan oligonukleotida ke dalam sel leukemia manusia melalui reseptor transferin. Konjugasi dengan folat digunakan untuk mengirim antisense kepada gen pertumbuhan epidermal melalui reseptor folat. Konjugasi dengan zat-zat yang lipofilik seperti kolesterol juga dapat mempengaruhi ambilan sel, stabilitas dan sifat-sifat lain⁽⁶⁾.

Dalam perkembangannya, terapi dengan oligonukleotida menghadapi tantangan besar dibanding dengan obat-obat lain mengingat ukuran

yang besar dan muatan yang dikandungnya. Diperlukan serangkaian modifikasi baik dari struktur oligonukleotidanya sendiri maupun dari segi penyampaian ke sel sasaran. Agar oligonukleotida menunjukkan efeknya secara *in vivo* maka oligonukleotida harus stabil didalam plasma dan dalam sel serta mengikat RNA target untuk menghambat ekspresinya dan menstimulasi penghancurannya. Selain itu seperti obat lain oligonukleotida harus memenuhi persyaratan yaitu memiliki indeks terapi yang memuaskan dan dapat diproduksi secara ekonomis serta praktis.

SIMPULAN

Upaya pengobatan penyakit pada tingkat gen merupakan salah satu usaha manusia untuk mencari metode pengobatan yang lebih baik karena langsung mengarah kepada penyebab penyakit. Pengobatan beberapa penyakit yang disebabkan karena overekspresi gen dengan antisense oligonukleotida sampai saat ini masih dalam penelitian beberapa diantaranya berada pada tahap uji klinik. Metode penyampaian antisense ke sel target oleh para peneliti dianggap merupakan kendala yang harus dipecahkan demi keberhasilan terapi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gewirtz AM, Sokol DL and Ratajczak MZ: Nucleic acid therapeutics: state of the art and future Prospects. *Blood*. 1998; 92(3): 712-36.
2. Trent RJ. *Molecular medicine : an introductory text for students*. London: Churchill Livingstone; 1993. p.165-67
3. Voet D and Voet JG. *Biochemistry*. 2nd Ed. USA: John Wiley and Sons Inc; 1995. p.915-1011.
4. Stryer L. *Biochemistry*. 4th Ed. New York: Freeman and Company; 1995. p.875-910
5. Tan TMC. Antisense nucleic acids – a rational approach for drug design. *AsPac J Mol Biol. Biotechnol*. 1994; 2 (3): 166 – 173.
6. Szymkowski DE: Developing antisense oligonucleotides from the laboratory to clinical trials. *Drug Discovery Today*. 1996; 1: 415 – 28.
7. Myers KJ, Dean NM: Sensible use of antisense: how to use oligonucleotides as research tools. *Trends in Pharmacological Science*. 2000; 21: 19 – 23.
8. Gewirtz AM, Stein Cy A, Glazer PM. Facilitating oligonucleotide delivery: helping antisense deliver on its promise. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93: 3161 – 63.
9. Putnam DA. Antisense strategies and therapeutic applications. *Am J Health Syst Pharm*. 1996; 53 (2): 151–160.

10. Raha M, Wang G, Seidman MM, Glazer PM. Mutagenesis by third-strand-directed psoralen adducts in repair-deficient human cells: high frequency and altered spectrum in a xeroderma pigmentosum variant. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93: 2941.
11. Maher LJ 3rd. Prospects for the therapeutic use of antisense oligonucleotides. *Cancer Invest.* 1996; 14:1, 66–82.
12. Baserga R, Denhardt DT. Antisense strategies. *Annals of the New York Academy of Science.* 1992; 660: 27–35.
13. Svinarchuk F, Bertrand JR, Malvy C. A short purine oligonucleotide forms a highly stable triple helix with the promoter of the murine c-pim-1 proto-oncogene. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 3742.
14. Maine IP, Kodadek T. Efficient unwinding of triplex DNA by a DNA helicase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 204: 1119.
15. Lacoste J, Francois JC, Helene C. Triple helix formation with purine-rich phosphorothioate containing oligonucleotides covalently linked to an acridine derivative. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 1991.
16. Nellen W, Lichtenstein C. What makes an mRNA antisense-itive? *Trends Biochem Sci.* 1993; 18: 419.
17. Woolf T, Melton D, Jennings C. Specificity of antisense oligonucleotides in vivo. *Proc Natl-Acad Sci.* 1992; 89: 7305.
18. Kim U, Wang Y, Sanford T, Zeng Y, Nishikura K. Molecular cloning of cDNA for double stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91: 11457.
19. Pyle AM. Ribozymes: a distinct class of metalloenzymes. *Science.* 1993; 26: 709.
20. James HA, Gibson I. The therapeutic potential of ribozymes. *Blood.* 1998; 91: 371.
21. Khan IM, Coulson JM. A novel method to stabilise antisense oligonucleotides against exonuclease degradation. *Nucleic Acids Res.* 1993; 2: 2957.
22. Agrawal, S. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials. *Trends in Biotechnology.* 1996; 14: 376–87.
23. Soomets U, Hallbrink M, Langel U. Antisense properties of peptide nucleic acids. *Front Biosci.* 1999; 4D: 782–86.