

Hamowanie ekspresji wybranych genów za pomocą antysensowych oligonukleotydów może stanowić jedną z grup postępowania terapeutycznego, m.in. w schorzeniach nowotworowych. Celem niniejszej pracy jest zarysowanie ogólnej strategii terapeutycznej oraz mechanizmu działania antysensowych oligonukleotydów, zilustrowanej wyborem genu *bcl-2* jako celu ich działania. Produkt ekspresji tego genu, białko *Bcl-2*, hamuje apoptozę komórki i tym samym ma wpływ na niekontrolowany rozwój komórek. W pracy przedstawiono aktualny stan zaawansowania badań klinicznych w wybranych schorzeniach nowotworowych, w których poziom białka *Bcl-2* uznawany jest jako niezależny wskaźnik zaawansowania procesu nowotworowego.

Słowa kluczowe: antysensowe oligonukleotydy, białko *Bcl-2*, nowotwory, kliniczna terapia antysensowa.

Modulation of translation process and regulation of protein biosynthesis by means of antisense oligonucleotides lay the foundation for new therapeutic strategies, among others against neoplastic diseases. The aim of this account was the presentation of molecular basis of antisense strategy, targeted against Bcl-2 protein. This protein, being expressed by bcl-2 gene, regulates the cell apoptosis and influences the uncontrolled cell proliferation. Below there is presented the state of art in clinical studies of application of antisense oligonucleotide phosphorothioates in combating those neoplastic diseases where the level of Bcl-2 is recognised as the independent key-marker of cancer progression.

Key words: antisense oligonucleotides, *Bcl-2* protein, cancer, clinical antisense therapy.

Strategia antysensowych oligonukleotydów

– aktualny stan zaawansowania badań klinicznych w wybranych schorzeniach nowotworowych

Strategy of antisense oligonucleotides – actual state of art in advanced clinical studies on therapy of selected neoplastic diseases

Krystyna Stec-Michalska

Zakład Medycyny Rodzinnej Instytutu Medycyny Wewnętrznej i Fizjoterapii
Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi

WSTĘP

W wyniku olbrzymiego postępu biologii molekularnej i komórkowej, jaki dokonał się w 2. połowie mijającego stulecia, w zakresie nauk medycznych pojawiły się nowe, do niedawna niewyobrażalne możliwości diagnostyczne i terapeutyczne. Odnoszą się one w szczególności do badań w zakresie patogenezy chorób o podłożu genetycznym. Wiadomo, że patogeneza schorzeń nowotworowych i wielu chorób nabytych tkwi w zmutowanych genach. Techniki sekwencjonowania genomów oraz skomputeryzowana analiza porównawcza otwierają drogę do usuwania zmutowanych pod względem genetycznym komórek (*przeciwciała monoklonalne*), zwiększania puli zdrowych komórek o właściwym *garniturze* genetycznym (*terapia genowa*) bądź blokowania ekspresji zmutowanego genu (*strategia antygenowa i antysensowa*). Szczególnie zaawansowane są prace badawcze dotyczące blokowania ekspresji wybranego genu za pomocą antysensowych oligonukleotydów.

Wprawdzie z zakresu tej ostatniej strategii terapeutycznej w piśmiennictwie polskojęzycznym ukazało się w połowie lat 90. kilka prac o charakterze monograficznym, prezentujących podstawy teoretyczne oraz metodologiczne [1, 2], jednak ostatnie 5 lat zaowocowało szeregiem doniesień w literaturze światowej, weryfikujących słuszność poczynionych założeń [3, 4]. Liczne są także opracowania monograficzne, w głównej mierze sumujące wyniki metodologii i skuteczności strategii antysensowej modulacji ekspresji genów [5]. Oczywiście, tematyka badań w tej dziedzinie jest bardzo szeroka, niemożliwe jest dokonanie przeglądu tak szerokiej dziedziny badawczej w jednej pracy.

W niniejszym artykule podjęto próbę zaprezentowania najbardziej zaawansowanych

badań klinicznych z zastosowaniem antysensowych oligonukleotydów.

PODSTAWY TEORETYCZNE I METODOLOGICZNE

Powszechnie wiadomo, że informacja genetyczna zakodowana jest w genach ulokowanych w chromosomalnym DNA. W momencie, gdy gen ulega ekspresji, informacja zawarta w sekwencji nukleotydów chromosomalnego DNA zostaje przepisana na komplementarną pod względem sekwencji nukleotydów nić *pre*-mRNA. Po procesie zwanym składaniem (zostają wówczas usunięte niekodowane odcinki nukleotydów, zwane eksonami i ligowane są odcinki kodujące, tzw. introny) dojrzałe czynnościowo mRNA opuszcza jądro komórkowe i w cytoplazmie sekwencja cząsteczki mRNA zostaje *tłumaczona* z udziałem rybosomów i szeregu innych biomolekuł, jak tRNA, ATP i czynniki elongacyjne (*translacja*) na odpowiednią sekwencję aminokwasów łączonych w łańcuch polipeptydowy białka.

Strategia antysensowych oligonukleotydów zakłada wybiórcze hamowanie biosyntezy *niechcianych* białek (np. białek kodowanych w materiale genetycznym wirusa w komórkach organizmu ludzkiego) na drodze asocjacji antysensowego konstruktów do wybranych i ściśle określonych sekwencji *pre*-RNA, zaburzając jego składanie. Następuje również hybrydyzacja z wyselekcjonowanym fragmentem cytoplazmatycznego dojrzałego mRNA (blokując fizyczny dostęp do rybosomu bądź tworząc heterodupleks rozpoznawany i degradowany przez RNA-zę H – enzymem degradującym mRNA skompleksowany z DNA). Antysensowe konstrukty oligonukleotydowe stanowią 12–30-merowe fragmenty DNA bądź ich analogi. Z obliczeń statystycznych wynika, że wybrana kombinacja 12 nu-

kleotydów może wystąpić tylko raz w mRNA. Komplementarna (antyrownoległa, oddziaływania poprzez wiązania wodorowe *typu Watsona i Cricka*) sonda oligonukleotydydowa zawierająca minimum 12 nukleozasad powinna, na podstawie obliczeń teoretycznych, rozpoznawać wybrany segment RNA ze 100-procentowym prawdopodobieństwem.

Idealny antysensowy oligonukleotyd powinien:

- ▶ przenikać przez błonę komórkową tak, aby dotrzeć do wyselekcjonowanej sekwencji,
- ▶ selektywnie hybrydyzować do sekwencji RNA, by zminimalizować ewentualne niespecyficzne działanie toksyczne,
- ▶ być opornym na działanie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych enzymów nukleolitycznych,
- ▶ nie oddziaływać z białkami komórkowymi.

Istotne jest także, aby potencjalne produkty degradacji antysensowych oligonukleotydów nie mogły być wykorzystywane do *de novo syntezy* DNA, co mogłoby powodować niepożądane mutacje.

Trwałość antysensowego oligonukleotydu determinowana jest głównie odpornością na działanie *endo-* i *egzonukleaz*, które powodują szybką degradację obcego DNA poprzez rozszczepianie wiązań fosfodiesterowych. Cel ten jest realizowany poprzez modyfikacje chemiczne tego wiązania, polegające np. na zastąpieniu atomu tlenu w internukleotydydowym wiązaniu fosforanowym atomem siarki (oligonukleotydotiofosforany, dla uproszczenia – PS-oligonukleotydy) lub grupą metylową (oligonukleozydometanofosfoniany). PS-oligonukleotydy stanowią I generację antysensowych struktur będących izosterycznymi i izoelektronowymi analogami naturalnych oligonukleotydów.

PS-oligonukleotydy wykazują zadowalającą trwałość w roztworach fizjologicznych, hybrydują do specyficznie wybranego fragmentu mRNA, są transportowane do komórki i uaktywniają RNA-zę H. Spełniają zatem wszystkie założone funkcje konstruktyw antysensowych. Dzięki wczesnemu opracowaniu metody syntezy na fazie stałej, ich dostępność umożliwiła podjęcie prób zastosowania ich początkowo *in vitro*, a następnie *in vivo* na modelach zwierzęcych [6, 7, 8], a w ciągu ostatnich lat, także na etapie prób klinicznych.

Jakkolwiek pierwsze wyniki badań były bardzo zachęcające, opublikowane w ostatnich 5 latach prace doświadczalne dotyczące zastosowań PS-oligonukleotydów w warunkach *in vivo* pokazały, że efekt ich działania nie jest w pełni zgodny z idealistycznymi założeniami [9, 10]. Obok problemów często sygnalizowanej niepowtarzalności wyników wykazano efekty ich niespecyficznego działania, które mogą zależeć od różnej sekwencji antysensowego oligonukle-

otydu bądź jego 2-rzędowej struktury, oddziaływania z białkami (*efekt aptameryczny*), jak i ich polianionowej natury.

Przykładowo oligonukleotydy bogate w sekwencje.. CpG.. lub zawierające motyw.. GGGG... wywołują odpowiedź immunologiczną bądź proliferację komórek. Oligonukleotydy *bogate* w reszty G charakteryzują się odmiennym przenikaniem do komórki, tkankową dystrybucją i farmakokinetyką, natomiast zawierające powtarzający się motyw CpG wywołują efekt immunostymulujący poprzez indukcję cytokin Il-12, Il-6, IFN γ , TNF α [11]. Jakkolwiek ten, z założenia niepożądany efekt działania, może być wykorzystany w niektórych przypadkach jako immunomodulator przeciwwirusowy bądź antibakteryjny, np. w terapii przeciwzapalnej [9], jest on niekorzystny w odniesieniu do zaplanowanego działania jako konstruktu antysensowego. Ugrupowanie tiofosforanowe w wiązaniach internukleotydydowych, odpowiedzialne za polianionową naturę PS-oligonukleotydu, jak i odporność na działanie nukleaz, wywołuje niekorzystne objawy uboczne w warunkach *in vivo*, np. wydłużenie czasu APTT. Dowiedziano, że występuje on zależnie od długości i dawki podanego antysensu, a nie od jego sekwencji [10]. PS-oligonukleotydy wiążą się także z wieloma białkami surowicy krwi. Powinowactwo to jest najsilniejsze w szeregu: fibrynogen > γ -globuliny > albuminy [9]. W znacznie wyższych dawkach aniżeli wymagane dla aktywności antysensowych oligonukleotydów w warunkach *in vivo*, PS-oligonukleotydy mogą hamować wiele enzymów [12, 13]:

- ▶ γ -polimerazę,
- ▶ czynnik wzrostu,
- ▶ białko kinazy C,
- ▶ odwrotną transkryptazę,
- ▶ RNA-zę H,
- ▶ RNA-zę L,
- ▶ receptor CD $_4$.

Przyczyny interakcji PS-oligonukleotydów z białkami nie zostały dostatecznie wyjaśnione. Jeśli oligonukleotydy antysensowe posiadają wewnętrzną komplementarność albo sekwencje palindromowe, mogą formować 2-rzędowe stabilne struktury, takie jak krótka podwójna nić, *szpilka* czy *decoy*, co może z jednej strony wpływać na dostępność konstruktu antysensowego do nici mRNA, z drugiej strony może wykazywać działanie niespecyficzne, objawiające się w postaci niepożądanych efektów ubocznych [14]. Dostęp antysensowych oligonukleotydów do docelowego mRNA zależy w dużej mierze od 2-rzędowej struktury RNA. Ostatnio wykazano np., że miejsca na mRNA o motywie sekwencji... GGGA... są łatwiej blokowane przez antysensowy oligonukleotyd [15].

Terapeutyczna przydatność I generacji antysensowych oligonukleotydów, tj. PS-oligonukleotydów, została udowodniona w leczeniu CMV (*cytomegalovirus*), indukującego zapalenie siatkówki [16]. Mimo szeregu

niepowodzeń innych terapeutycznych zastosowań PS-oligonukleotydów, sukces ten nadal stwarza nadzieję na możliwości szerszego zastosowania tej nowej metody leczenia. Ze względu na powszechność i ciągle niezadawalający sposób hamowania skutków chorób nowotworowych, najwyższą intensywność badań nad skutecznością strategii antysensowej obserwuje się zwłaszcza w tej dziedzinie badań promedycznych.

W celu zachowania integralności konstruktyw antysensowych wprowadzono ich dalsze modyfikacje, np. za pomocą 2'-O-alkilorybonukleozydów wprowadzonych na 3'- i 5'-końcach oligonukleotydów, uzyskując zwiększoną ich lipofilowość oraz odporność na działanie egzonukleaz. Podobnie poprzez inkorporację internukleotydydowych wiązań metanofosfonianowych uzyskano:

- ▶ efekt zmniejszenia ładunku ujemnego (obniżenie polianionowości),
- ▶ zwiększoną lipofilowość (lepszy transport dokomórkowy),
- ▶ pełną odporność na działanie fosfodiesteraz [17].

Efekt immunostymulujący oligonukleotydów antysensowych zmniejszono poprzez unikanie motywów... CpG... zastępując je odpowiednio C $_2$ -OMe i 7-deazaguanozyną. Oligonukleotydy zsyntetyzowane z więcej niż 1 z ww. modyfikacją wiązań chemicznych, zwane MBOs (ang. *mixed-backbone oligonucleotides*) stanowią II generację oligonukleotydów antysensowych [18]. Ponadto, MBOs zawierające w środkowej sekwencji PS-oligonukleotydy (minimum 5 nukleozasad) wykazują większe powinowactwo do docelowego RNA, zwiększając przy tym aktywność RNA-zy H.

Sugeruje się, że końcowo zmodyfikowane MBOs osiągną taki poziom stabilności, że będzie można stosować je w formie doustnej lub dojelitowo.

Podsumowując, MBOs wykazują poprawę specyficzności, biologicznej aktywności, stabilności *in vivo*, farmakokinetyki i profilu bezpieczeństwa [19].

Jak wspomniano powyżej, ważne jest wnikanie antysensowych oligonukleotydów do komórki. *In vivo* transport oligonukleotydów zależy od czynników, takich jak:

- ▶ typ komórki,
- ▶ kinetyka transportu,
- ▶ warunki hodowli kultury tkankowej,
- ▶ natura chemiczna antysensowego oligonukleotydu

i odbywa się najczęściej na zasadzie endocytozy, zależnej od jego długości i sekwencji. Każdy z tych czynników może wpłynąć na biologiczną aktywność antysensowego oligonukleotydu. Jedną z metod ułatwiających ich transport dokomórkowy jest zamknięcie oligonukleotydu w liposomach, uzyskując tym samym większe ich stężenie wewnątrzkomórkowe i ochronne działanie przed nukleazami [20]. Jakkolwiek ten sposób ułatwiania transportu dokomórkowego jest z powodzeniem

Tab. 1. Wybrane przykłady klinicznych prób wprowadzenia terapii antysensowej, które uzyskały akceptację FDA

Gen docelowy	Sekwencja oligonukleotydu	Choroba	Sposób podania	Stan badań
bcl-2	5'-TCTCCCAGCGTGCCCAT-3'	rak stercza, nieziarniczny chłoniak złośliwy	podskórnice dożylnie	faza II/III
bcr-abl	5'-CGCTGAAGGGCTTCTTCCTATTGAT-3' 5'-CGCTGAAGGGCTTTTGAAGTGTGCT-3'	CML* stadium zaawansowane CML* przełom blastyczny	ex vivo dożylnie	badania przedkliniczne
c-myb	5'-TATGCTGTGCCGGGTCTTCGGGC-3'	CML* przełom blastyczny CML* chroniczna/zaostzona faza	dożylnie albo ex vivo	faza I wstępne
c-raf	5'-TCCCGCCTGTGACATGCATT-3'	rak stercza, piersi, jajnika, jelita grubego, płuc	dożylnie	faza II
metylo-transferaza DNA	Sekwencja nieznaną	guz lity	dożylnie	faza I
Ha-ras	5'-GGGACTCCTCGCTACTGCCT-3'	guz lity	dożylnie	faza I
P53	5'-CCCTGCTCCCCCTGGCTCC-3'	ostra białaczka szpikowa	dożylnie	faza I
Podjednostka α kinazy białkowej (PKA-R1 α)	5'-GCGUGCCTCCTCACUGGC-3'	guz lity	dożylnie	faza III
kinaza białkowa	5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTCA-3'	rak jajnika, stercza, piersi, mózgu, płuc, jelita grubego, czerniak	dożylnie	faza II
Choroby wirusowe				
wirus cytomegalii (CMV)	5'-GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCG-3'	ślepotą wywołaną przez CMV	miejscowo do gałki ocznej	zatwierdzony
wirus cytomegalii (CMV)	5'-UGGGGCTTACCTTGCGAACA-3' #	ślepotą wywołaną przez CMV	dożylnie	faza II

* CML (ang. *chronic myeloid leucemia*) – przewlekła białaczka szpikowa
2'-O-metyloribonukleozydy bez funkcji tiiofosforanowych

stosowany w doświadczeniach na liniach komórkowych, jak i w ludzkiej terapii genowej, to w realizacji strategii antysensowej musi być przyjmowany z wielką ostrożnością, gdyż częste podawanie antysensowych oligonukleotydów łącznie z liposomami może prowadzić do akumulacji liposomów w wątrobie.

PRZYKŁADY PRÓB ZASTOSWAŃ KLINICZNYCH ANTYSSENSOWYCH OLIGONUKLEOTYDÓW

Obecnie sprawdzane możliwości zastosowania terapii antysensowej dotyczą głównie:

- ▶ onkologii klinicznej,
- ▶ angioplastyki naczyń wieńcowych,
- ▶ chorób neurologicznych,
- ▶ leczenia niektórych chorób wirusowych i pasożytniczych.

Wybrane przykłady klinicznych prób wprowadzenia terapii antysensowej, które uzyskały akceptację FDA, przedstawiono w tab. 1.

Ze względu na restrykcje objętościowe, w tej prezentacji prób klinicznych terapii

z użyciem antysensowych oligonukleotydów ograniczono się do zaprezentowania 1 przykładu, budzącego wiele nadziei w leczeniu chorób nowotworowych. Wg szeregu doniesień literaturowych, prezentacji konferencyjnych i internetowych wydaje się, że wkrótce należy oczekiwać rejestracji kolejnego antysensowego leku przeciwnowotworowego [21]. Jako cel ataku grupa specjalistów z firmy biotechnologicznej Genta Incorporation, New Jersey, wybrała oncogen bcl-2.

Dlaczego oncogen bcl-2?

Warunkiem zdrowia każdego organizmu jest zachowanie równowagi pomiędzy replikacją komórek a ich apoptozą. Zaburzenie tej równowagi ma różne następstwa. Upośledzona zdolność organizmu do apoptozy może powodować rozwój raka, chorób autoimmunologicznych, zaś jej nadmiar występuje w udarze mózgu, zawale mięśnia sercowego, chorobie Alzheimerera, chorobie Parkinsona.

Najwcześniej opisanym białkiem apoptocynym był produkt genu bcl-2 [22, 23]. Rolę tego genu najwcześniej opisano w patofizjologii limfocytów B, a jego nazwa pochodzi od B-cell leukemia/lymphoma – Bcl-2 [24].

Obecnie uważa się, że białkami regulującymi przepuszczalność błon mitochondrialnych są białka z rodziny Bcl-2 oraz ich homologi. Wiele kluczowych elementów w trakcie apoptozy ma miejsce w mitochondriach:

- ▶ zaburzenia transportu elektronów,
- ▶ produkcja ATP i fosforylacji oksydacyjnej,
- ▶ uwalnianie protein aktywujących kaspazy,
- ▶ zmiany potencjału oksydacyjno-redukującego.

Ważnym ogniwem łączącym apoptozę i mitochondria jest obecność protein z rodziny Bcl-2 w błonie komórkowej mitochondriów. Należą do nich zarówno białka stymulujące proces apoptozy (Bax, Bad, Bcl-Xs, Bak, Bid, Bik, Hrk), jak i ten proces hamujące (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-1,

Tab. 2. Stan zaawansowania prób klinicznych z użyciem oligonukleotydu antysensowego G 3139 redukującego poziom białka Bcl-2 w wybranych chorobach nowotworowych

Miejsce i okres trwania prób klinicznych	Wskazanie	Faza prób klinicznych, opis terapii	Wyniki i obserwacje	GLP/GCP
<i>Royal Marsden Hospital</i> (Londyn), protokół G 101; październik 1995–styczeń 1999	nieziarniczy chłoniak złośliwy	I faza w dawkach narastających drogą podania – wlew podskórny przez 14 dni	grupa 21 pacjentów; dawki maks. do 5,3 mg/kg/dobę, limitowane objawami toksycznymi; nie zanotowano powikłań kończących się zgonem; objawy uboczne: gorączka, obniżona liczba płytek, osłabienie – objawy często towarzyszące chorobie podstawowej	badania prowadzone pod nadzorem GCP i ICH z niezależnym monitorowaniem sponsorowanym przez Genta Inc.
<i>Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i> (Nowy Jork); protokół G 102; marzec 1998 – w toku	rak prostaty, nerki, inne lite guzy	I faza w dawkach narastających podawanych drogą dożylną przez 14 dni; wyniki badań przeprowadzonych w 1999 r. pozwoliły na przejście do następnego etapu prób skojarzonej terapii G3139 – <i>paclitaxel</i>	grupa 35 pacjentów; dawki maks. do 6,9 mg/kg/dobę, limitowane objawami toksycznymi; nie zanotowano powikłań kończących się zgonem	badania prowadzone pod nadzorem GCP i ICH z niezależnym monitorowaniem sponsorowanym przez Genta Inc.
<i>British Columbia Cancer Center</i> , Vancouver General Hospital; protokół GP 104	rak prostaty	I faza w dawkach narastających podawanych drogą dożylną przez 14 dni; terapia skojarzona z wzrastającymi dawkami <i>mitoxantronu</i>	grupa 20 pacjentów; do tej pory nie odnotowano objawów toksycznych przy dawkach wyższych niż G3139 3,1 mg/kg/dobę i <i>mitoxantronu</i> 12 mg/m ² p.c. co 3–4 tyg.	badania prowadzone pod nadzorem GCP i ICH, z niezależnym monitorowaniem sponsorowanym przez Genta Inc.
<i>Univ. Vienna Cancer Center</i> , (Wiedeń); protokół GM 103	czerniak z przerzutami	I faza w dawkach zwiększających podawanych drogą dożylną przez 14 dni; kombinowana ze standartowymi dawkami dacarbazine	grupa 14 pacjentów; do tej pory niewielkie i odwracalne objawy toksyczne występowały w próbach terapii skojarzonej przy dawkach G 3139 wyższych niż 7,7 mg/kg/dobę i dacarbazine 500 mg/m ² p.c. co 2 tyg. w 2 cyklach	badania prowadzone pod nadzorem GCP i ICH z niezależnym monitorowaniem sponsorowanym przez Genta Inc.
<i>Georgetown Univ. Lombardi Cancer Center</i> , (Waszyngton, DC); protokół GM 105	raki gruczołu piersiowego i inne guzy lite	I-II faza w dawkach narastających podawanych drogą dożylną przez 21 dni; terapia skojarzona z niskimi tygodniowymi dawkami docetaxelu	grupa 10 pacjentów; do tej pory nie stwierdzono objawów toksycznych przy dawkach G 3139 nie wyższych niż 3,1 mg/kg/dzień i docetaxelu 35 mg/m ² podawanych każdego tygodnia	badania prowadzone pod nadzorem GCP i ICH z niezależnym monitorowaniem sponsorowanym przez Genta Inc.

GLP – ang. *good laboratory practice*; GCP – ang. *good clinical practice*

Mcl-1, BHRF1, E1B 9 kDa) [25]. Białka te występują jako integralne składniki błon, także w siateczce śródplazmatycznej i okołojądrowej. Tworzą homo- i heterodimery, np. Bcl-2/Bcl-2, Bax/Bcl-2, Bax/Bax [26]. Stwierdzono, że przewaga homodimerów Bcl-2 decyduje o przeżyciu, podczas gdy przewaga Bax – o śmierci komórki. Ich wzajemne oddziaływanie nie wynikają z bezwzględnej ich zawartości w komórce, lecz z wzajemnych relacji. Strukturalne podobieństwo białek rodziny Bcl-2 z tworzącą pory domeną błonową toksyny błoniczej sugeruje, że białka te tworzą kanały błonowe regulowane przez sygnały zależne od napięcia i pH [27]. Badania Grossa i wsp. [28] wykazały, że zarówno Bcl-2, jak i Bax tworzy kanały jonowe w błonach komórko-

wych o odmiennej przepuszczalności dla poszczególnych jonów; Bcl-2 jest specyficzny dla K⁺, natomiast Bax dla Cl⁻.

Nie wiadomo jednak, w jaki sposób zmiany przewodzenia dla tych jonów mogą zmieniać $\Delta\psi$ (mitochondrialny potencjał błonowy) oraz uwalnianie AIF (*apoptosis inducing factor*), Apaf-2 (cytochrom c). Prawdopodobnie antyapoptyczny mechanizm działania Bcl-2 wynika z hamowania uwalniania AIF i cytochromu c (Apaf-2) z mitochondriów oraz z bezpośredniej integracji z Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor*) blokując aktywację kaspazy 9 [29, 30].

Kaspazy (*caspases: cysteine-dependent-aspartate-directed protease*) są rodziną

proteolitycznych enzymów cysteinowych, uczestniczących w kaskadzie wzbudzenia śmierci komórki [31]. Znanych jest ponad 10 białek rodziny kaspaz. Kaspazy występują w komórce w stanie latentnym, gdyż w niskich stężeniach występują jako monomery, a do ich aktywacji wymagana jest polimeryzacja. Kofaktory służą do przybliżenia do siebie 2 lub więcej prekursorów, pozwalając na autoproteolityczną aktywację. Wykazano, że kluczowa prokaspaza 9, BCL-xL i Apaf-1 tworzy 3-składnikowy kompleks z możliwością inaktywacji tej kaspazy [32]. Kaspaza 9 uważana jest za proteazę o roli inicjującej w rodzinie kaspaz, spełniającej funkcję nadrzędną w stosunku do tzw. kaspaz wykonawczych. Ponadto sądzi się, że Bcl-2 należy również do

silnych przeciwutleniaczy, funkcjonujących jako zmiatacze wolnych rodników, zabezpieczając błony lipidowe przed utlenianiem, a także pełni rolę białka regulującego aktywność enzymów zapobiegających procesom utleniania. Wykazano, że spośród wszystkich znanych dotychczas białek komórkowych, Bcl-2 jest najsilniejszym inhibitorem apoptozy wywołanej przez różne czynniki stresogenne, np. promieniowanie jonizujące, hipertermię, chemioterapeutyki, defekt czynników wzrostowych, glikoproteidy. Potwierdza to fakt, że nadekspresja bcl-2 chroni komórkę przed apoptozą wywołaną przez ROS (*reactive oxygen species*) [33, 34]. Białko Bcl-2 blokuje jeden z krytycznych stopni w przekazywaniu sygnału apoptozy (wyływ Ca^{2+} z mobilnej puli zlokalizowanej w świetle siateczki śródplazmatycznej [35]). Współzależność między stężeniem ROS a uwalnianiem Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej i mitochondriów mogłaby tłumaczyć ten mechanizm.

Warto podkreślić, iż interakcje pomiędzy Bcl-2 i białkami prionowymi (PrP) mogą mieć znaczenie w patogenezie neurodegeneracyjnych chorób prionowych, takich jak zespół Gerstmana-Stausslera czy choroba Creutzfeldta-Jacoba. Białko Bcl-2 jest rozpatrywane m.in. jako bliżej nieznanne *białko X*, które uczestniczy w przekształceniu PrP w jego patogenną izoformę PrP^{Sc} [36].

Duża liczba leków stosowanych obecnie w chemioterapii oraz kojarzonych z radioterapią ma na celu apoptozę komórek nowotworowych. Przez uszkodzenie DNA w tych komórkach dochodzi do aktywacji genu p53 nazywanego *strażnikiem genomu*, którego produkt blokuje komórki w fazie G₁ cyklu komórkowego do czasu naprawy DNA. W przypadku, gdy komórka nie zdoła naprawić DNA, p53 włącza program śmierci za pośrednictwem białek z rodziny Bcl-2, z którymi pozostaje we wzajemnych zwrótnych zależnościach [37]. Brak białka p53 lub utrata jego apoptycznych właściwości, a także wysoki poziom Bcl-2 w komórkach nowotworowych, decydują często o jego niewrażliwości na stosowaną terapię.

Ostatnio zastosowano oligonukleotyd antysensowy do modyfikowania ekspresji genu bcl-x poprzez zahamowanie produkcji białka Bcl-xL, uzyskując tym samym wyższe poziomy białka Bcl-xS mającego przeciwnie, proapoptyczne działanie [38].

Powyższe wyniki badań stały się podstawą włączenia do terapii antysensowych oligonukleotydów blokujących ekspresję onkogenów mających znaczenie w procesach niekontrolowanego rozrostu komórek nowotworowych. Na obecnym etapie prób klinicznych (I, II st.) oligonukleotydy antysensowe zastosowano do zablokowania ekspresji onkogenów: bcl-2, NF-KB (p65), c-myc, c-myc, erbB-2, jun, fos, Ha-ras, Ki-ras, DNA-metylotransferazy, PKA, c-raf kinazy, mdm 2, and PKC- α [39, 40, 41, 42, 43, 44]. Wykazano, że białko Bcl-2 występuje obficie w komór-

kach nowotworowych gruczołaków płuc, trzustki, jelita grubego, sutka, gruczołu krokowego i złośliwych chłoniaków, a nie zaobserwowano jego występowania w dojrzałych komórkach, z wyjątkiem grasicy i łożyska. Podwyższony poziom białka Bcl-2 blokującego zaprogramowaną śmierć komórki wiąże się ze złą prognozą procesu nowotworowego. Szczegółowa analiza dotychczasowych badań potwierdziła ważne znaczenie białka Bcl-2 jako niezależnego markera nowotworowego [45, 46].

Najwcześniejsze i obecnie najbardziej zaawansowane kliniczne badania zastosowania terapii oligonukleotydem antysensowym dotyczą niezziarniczego chłoniaka złośliwego, gdzie obserwuje się wysoką ekspresję genu bcl-2 we wszystkich komórkach nowotworu.

W początkowej fazie prób przedklinicznych zsyntetyzowano szereg oligonucleotydów komplementarnych do różnych regionów tego genu i drogą selekcji wytypowano 2 antysensowe PS-oligonukleotydy: G 3139 (18-nukleotydowy) i G 3854 (20-nukleotydowy). W kolejnej fazie badań wybrano oligonukleotyd G 3139 o sekwencji 5'-TCTCCCCAGCGTGCGCCAT-3', gdzie wszystkie internukleotydowe wiązania są tiofosforanami. Stwierdzono, że po podaniu (dożylnym lub podskórnym) związek G 3139 kumuluje się głównie w szpiku kostnym, wątrobie, śledzionie, nerkach, układzie limfatycznym, w mniejszych ilościach w innych tkankach, śladowo w OUN [47], gdyż nie przenika przez barierę krew-mózg człowieka. Podskórne powolne podanie G 3139 wydłużało okres jego bioaktywności, stabilność wysycenia [47], ale wiązało się z występowaniem odczynu zapalnego w miejscu wkłucia. Terapia stosowana we wlewach dożylnych była najmniej toksyczna, z wyłączeniem bolusa, który powodował gwałtowne obkurczenie naczyń obwodowych i przyspieszał efekt antykoagulacyjny [47]. Pacjenci chorujący na niezziarniczy chłoniak złośliwy zakwalifikowani do terapii za pomocą G 3139 prezentowali różne etapy zaawansowania choroby, ale u wszystkich wykonano badanie immunohistochemiczne na obecność białka Bcl-2 w oparciu o biopsję z węzła chłonnego.

Obecny stan zaawansowania prac klinicznych z użyciem G 3139 przedstawiono w tab. 2. (w oparciu o udostępnione prywatne informacje dr. B. Klema, Genta Incorporation). Odnosząc się do wyników tych badań, należy podkreślić, iż u wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do tych programów badań, niezależnie od stopnia zaawansowania zmian, kierując się względami etycznymi zastosowano początkowo powszechnie stosowaną chemioterapię, a następnie, przy braku poprawy klinicznej, podawano G 3139. Badania w serii GL 101 dotyczące pacjentów z niezziarniczym chłoniakiem złośliwym wykazały dobrą tolerancję tego PS-oligonukleotydu. Limitowane podawanie preparatu było częściowo związane z występowaniem takich objawów, jak:

- ▶ gorączka,
- ▶ osłabienie,
- ▶ spadek płytek krwi,

jakkolwiek towarzyszą one również chorobie podstawowej. Przemijająca hiperglikemia maks. do 12 mmol/l nie była zależna od stosowanej dawki, nie wymagała dodatkowego podawania leków i normalizowała się po zakończeniu podawania preparatu. Niektórzy pacjenci byli poddani dalszej obserwacji, trwającej ponad 3 lata po zakończeniu terapii i nie zaobserwowano u nich późniejszych objawów ubocznych ani innych procesów rozrostowych.

Podobne obserwacje dotyczyły pacjentów objętych programem badań G 102, w których stosowano wyższe dawki G 3139. Rutynowe monitorowanie czynności serca nie wykazało objawów kardiotoksycznych, które wcześniej obserwowano u małych dawek w badaniach doświadczalnych (podawano wyższe dawki). Wydłużony okres obserwacji, do ponad 15 mies. od zakończonej terapii, nie ujawnił u tych pacjentów wystąpienia niekorzystnych objawów ubocznych. W obydwu programach badań G 101 i G 102 farmakokinetyka podanego preparatu była podobna i wykazała, że osiągnięty poziom terapeutyczny przy stężeniu G 3139 w surowicy w granicach 1–8 $\mu\text{mol/ml}$ wykazywał dobrą korelację między podaną dawką a stężeniem w surowicy krwi. Różnorodność podawanych dawek preparatu była podyktowana różnym stopniem zaawansowania procesu chorobowego. Stałe wysycenie leku w surowicy krwi osiągnięto po 24-godzinym podawaniu preparatu we wlewie dożylnym. Półokres eliminacji leku był krótki i wynosił 2 godz. po zakończeniu wlewu dożylnego, dlatego też efekty działań ubocznych preparatu były krótkotrwałe. Obydwa badania potwierdziły oczekiwaną aktywność G 3139 objawiającą się obniżeniem poziomu białka Bcl-2 w pobranych biopsjach z węzłów chłonnych, przy nikłych objawach ubocznych.

Dwie kolejne serie badań (GM 103, GM 105) potwierdziły, że podana dawka i osiągnięty poziom stężenia G 3139 w surowicy krwi zredukował poziom białka Bcl-2, co wiązało się z kliniczną poprawą stanu pacjentów z czerniakiem i rakiem piersi. Terapia G 3139 zastosowana u pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem wydłużyła ich życie poprzez stabilizację procesu chorobowego. Warto przy tym zaznaczyć, że ze względu na stopień zaawansowania zmian chorobowych, u pacjentów tych zastosowano nawet 10 cykli dożylnego wlewu preparatu w ciągu roku, bez nasilenia objawów toksycznych. Nie miało to wpływu na farmakokinetykę leku, a dawki te były nawet dobrze tolerowane przez pacjentów poniżej 90. roku życia.

W 1. fazie prób klinicznych zastosowano wydłużony dożylny wlew kroplowy przez pompę infuzyjną G 3139 w cyklu 14–21-dniowym, uzyskując, jak wcześniej wspomniano, dobrą tolerancję i farmakokinetykę preparatu. W 2. i 3. fazie prób klinicznych planuje się zastosowanie krótkich wlewów

dożylnych, które powinny wykazać lepszą tolerancję stosowanego preparatu i byłyby wygodniejsze dla pacjentów. Możliwe jest podawanie podskórne G 3139 w 2 dawkach podzielonych dziennie.

Obok rezultatów badań klinicznych zaprezentowanych w tab. 2., w innych badaniach próbuje się zastosować, np. u chorych z rakiem prostaty, terapię skojarzoną (G3139 + chemioterapia, choć są to jeszcze zbyt małe grupy pacjentów (poniżej 6 w każdej grupie), aby uzyskiwane wyniki mogłyby być uznane jako statystycznie znamienne. Rozpoczynające się 3 inne badania pod nadzorem Narodowego Instytutu Raka USA dotyczą 1. i 2. fazy klinicznej z zastosowaniem antysensu G 3139 w terapii skojarzonej z chemioterapeutykami w leczeniu raka jelita grubego, płuc, ostrych białaczek, czerniaka.

Doniesienia naukowe badaczy z USA, Kanady i Wielkiej Brytanii dotyczące wyników badań z zastosowaniem G 3139 zarówno w monoterapii, jak w terapii kombinowanej z chemioterapeutykami [48] sugerują, że preparat ten jest skuteczny i może być bezpiecznie stosowany. Na ostateczne wyniki badań, aby uznać G 3139 za lek mogący wejść do powszechnie stosowanej terapii, poza ośrodkami prowadzącymi badania doświadczalne, należy poczekać. Jakkolwiek przesłedzenie historii rozwoju strategii antysensowej odnotowuje finalne niepowodzenie antysensowej terapii w przypadkach AIDS oraz choroby Crohna [49], próby terapeutyczne wyłączające ekspresję genów odpowiedzialnych za etiopatogenezę i przebieg różnych chorób za pomocą antysensowych oligonukleotydów nadal stwarzają nadzieję, iż wkrótce klinicyści będą dysponować nową generacją leków *informatycznych*, tj. konstruowanych na podstawie informacji o zmianach genetycznych.

PIŚMIENNICTWO

- Ratajczak M, Skórski T. *Perspektywy wykorzystania strategii antysensów w medycynie doświadczalnej i klinicznej*. Postępy Biologii Komórki 1994; 21: 177-96.
- Stec WJ. *Strategia antysensowych oligonukleotydów*. Biotechnologia 1994; 4: 5-15.
- Barton CM, Lemoine NR. *Antisense oligonucleotides directed against p53 have antiproliferative effects unrelated to effects on p53 expression*. Brit J Cancer 1995; 71: 429-37.
- Smetsers TFCM, Linders EHP, van de Locht TF, de Witte TM, Mensink EJB. *An antisense Bcr-Abl phosphodiester-tailed methylphosphonate oligonucleotide reduces the growth of chronic myeloid leukaemia patient cells by a non-antisense mechanism*. Brit J Haematol 1997; 96: 377-81.
- Antisense Technology*. vol. 313 of Methods in Enzymology 1999; Ed MI Phillips Academic Press, Inc., NY.
- Agrawal S, Kandimalla ER. *Medicinal chemistry of antisense oligonucleotides*. In: Antisense Technology in the Central Nervous System. Leslie R, et al. (eds). Oxford University Press 1999; 108-36.
- Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, et al. *Single intraluminal delivery of antisense cdc 2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia*. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 8474-78.
- Ratajczak MZ, Kant JA, Luger SM, Huiya N, Zhang J, Gewirtz AM. *In vivo treatment of human leukemia in a scid mouse model with c-myc antisense oligodeoxynucleotides*. Proc Natl Acad Sci 1992; 89: 11823-27.
- Agrawal S, Kandimalla ER. *Antisense Therapeutics: is it as simple as complementary base recognition?* Current Trends in Molecular Medicine Today 2000; 6: 72-81.
- Shaw DR. *Effects of synthetic oligonucleotides on human complement and coagulation*. Biochem Pharmacol 1997; 53: 1123-32.
- Rando RF, Hogan ME. *Biological activity of guanosine quartet-forming oligonucleotides*. In: *Applied Antisense Oligonucleotide Technology*. Stein CA, Krieg AM (eds). Wiley-Liss, New York 1998; 335-52.
- Benimetskaya L, Tonkinson JL, Koziolkiewicz M, Karwowski B, Guga P, Zelser R, Stec WJ, Stein CA. *Binding of Phosphorothioate Oligonucleotides to Basic Fibroblast Growth Factor, Recombinant Soluble CD4, Laminin and Fibronectin is P-Chirality Independent*. Nucleic Acids Res 1995; 23: 4239-45.
- Gao WY, Han FS, Storm C, Egan W, Cheng YC. *Phosphorothioate oligonucleotides are inhibitors of human DNA polymerases and RNase H: implications for antisense technology*. Mol Pharmacol 1992; 41: 223-29.
- Hartman G, Krug A, Waller-Fontaine K, Endres S. *Oligodeoxynucleotides enhance lipopolysaccharide stimulated synthesis of tumor necrosis factor: dependence on phosphorothioate modification and reversal by heparin*. Mol Med 1996; 2: 429-38.
- Tu GC, Cao GN, Zhou F, Israel Y. *Tetranucleotide GGGA motif in primary RNA transcripts. Novel target site for antisense design*. J Biol Chem 1998; 273: 25125-131.
- Crooke ST. *Vitravene – another piece in the mosaic*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 1998; 8: vii-viii.
- Agrawal S, Zhao Q. *Mixed Backbone Oligonucleotides: Improvement in Oligonucleotide-Induced Toxicity in vivo*. Antisense & Nucleic Acid Drug Dev 1998; 8: 135-39.
- Dean NM, Griffey RH. *Identification and characterization of second-generation antisense oligonucleotides*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 1997; 7: 229-33.
- Kuss B, Cotter F. *Antisense: Time to shoot the messenger*. Ann Oncol 1999; 10: 495-503.
- Lasic DD, Templeton NS. *Liposome in gene therapy*. Adv Drug Delivery Rev 1996; 20: 221-28.
- Finbarr E, Cotter MD. *Antisense therapy for malignancy*. American Society of Clinical Oncology 2000; 338-348.
- Yang E, Korsmeyer SJ. *Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 Family and cell death*. Blood 1996; 88: 384-401.
- Reed JC. *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death*. J Cell Biol 1994; 124: 1-26.
- Kocki J, Różyńska D. *Gen Bcl-2 w patofizjologii limfocytów B*. Post Biol Kom 1991; 18: 169-82.
- Adams JA, Cory S. *The Bcl protein family: arbiters of cell survival*. Science 1998; 281: 1322-26.
- Conus S, Kaufmann T, Fellaly I, Otter I, Rosse T, Borne C. *Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints*. The EMBO Journal 2000; 19: 1534-44.
- Schendler SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC. *Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2*. Proc Natl Acad Sci 1997; 94: 5113-18.
- Gross A, Xiang J, Zha J, Yin XM, Schlesinger PHh, Korsmeyer SJ. *Regulation of apoptosis by the Bcl-2 family members*. In: *Oxidative stress and apoptosis*. 3rd Winter Researcher Conference, Les Arcs, Francia 1997.
- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. *Bcl-2 interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1 dependent caspase 9 activation*. Proc Natl Acad Sci 1998; 95: 4386-91.
- Rao L, White E. *Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators: making a connection*. Current Opinion in Genetics & Development 1997; &; 52-58.
- Ernshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. *Mammalian caspases: structure, Activation, substrates and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem 1999; 68: 383-424.
- Pan G, Orouke K, Dixit VM. *Caspase-9 BCL-xL and Apaf-1 form a tertiary complex*. J Biol Chem 1998; 273: 5841-45.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CI, Korsmeyer SJ. *Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis*. Cell 1993; 75: 241-51.
- Baker AM, Briehl MM, Dorr R, Powis G. *Decreased antioxidant defence and increased oxidant stress during dexamethasone-induced apoptosis: bcl-2 prevents the loss of antioxidant enzyme activity*. Cell Death & Differ 1996; 3: 207-13.
- Lam M, Dubayk G, Chen L, Nunez G, Miesfeld RL, Distelhorst CW. *Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes*. Med Sci 1994; 92: 6569-73.
- Kurschner K, Morgan JI. *Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein*. Molecular Brain Res 1996; 37: 249-58.
- Chiou SK, Rao L, White E. *Bcl-2 blocks p-53 dependent apoptosis*. Mol Cell Biol 1994; 14: 2556-63.
- Taylor JK, Zhang QQ, Wyatt JR, Dean NM. *Induction of endogenous Bcl-xS through the control of Bcl-x pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides*. Nature Biotechnology 1999; 17: 1097-1100.
- Cowsert LM. *In vitro and in vivo activity of antisense inhibitors of ras: Potential for clinical development*. Anticancer Drug Res 1997; 12: 359-71.
- Vaughan JP, Iglehart JD, Demirdji S, et al. *Antisense DNA down-regulation of the ERBB2 oncogene measured by a flow cytometric assay*. Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 8338-42.
- Citro G, Caputo R, Damiano V, et al. *Inhibition of leukemia cell proliferation by folic acid-polylysine-mediated introduction of c-myc antisense oligodeoxynucleotides into HL-60 cells*. Br J Cancer 1994; 69: 463-67.
- Tortora G, Caputo R, Damiano V, et al. *Cooperative antitumor effect of mixed backbone oligonucleotides targeting protein kinase A in combination with cytotoxic drugs or biologic agents*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 1998; 2: 141-45.
- Crooke ST, Bennet CF. *Progress in antisense oligonucleotide therapeutics*. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1996; 36: 107-29.
- Crooke ST. *Progress in antisense therapeutics*. Med Res Rev 1996; 16: 319-44.
- Hermine O, Haouin C, Lepage E, et al. *Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA)*. Blood 1996; 87: 265-72.
- Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, et al. *Prognostic significance of Bcl-2 expression and Bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin lymphoma. A British National Lymphoma Investigation study*. Blood 1996; 88: 1046-51.
- Cotter FE, Corbo M, Raynaud F, et al. *Bcl-2 antisense therapy in lymphoma: In vitro and in vivo mechanisms, efficacy, pharmacokinetics and toxicity studies*. Ann Oncol 1996; 9: 7, 32-36.
- Zamecnik P. *Background of the antisense oligonucleotide approach to chemotherapy*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 1997; 7: 199-202.
- Stein CA. *Keeping the biotechnology of antisense in context*. Nature Biotechnology 1999; 17: 209.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr n. med. **Krystyna Stec-Michalska**

Klinika Chorób Infekcyjnych i Gastroenterologii
Instytutu Medycyny Wewnętrznej
i Fizjoterapii
Wojskowej Akademii Medycznej
ul. Kniaziewiczza 1/5
91-347 Łódź