



Rybozomy w medycynie

Sławomir Antoszczyk, Barbara Nawrot

Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych, Polska Akademia Nauk, Łódź

Ribozymes in medicine

Summary

Catalytic nucleic acids, ribozymes and deoxyribozymes can act as efficient ribonucleases and degrade target RNA molecules by complementary Watson-Crick base pairing and catalytic cleavage of their phosphodiester internucleotide bonds. This ability makes ribozymes and deoxyribozymes potent molecular tools for therapeutic applications. Recent achievements in ribozymes design and technology enable the preparation of ribozymes which can be efficiently expressed in cellular systems, co-localize with the target mRNA and exhibit high intracellular activity. Several examples of preclinical and clinical trials of ribozymes directed toward viral genes (HBV, HCV, HIV-1) and oncogenes are discussed in this review.

Key words:

ribozyme, catalytic nucleic acid, RNA degradation.

Adres do korespondencji

Sławomir Antoszczyk,
Zakład Chemii
Bioorganicznej,
Centrum Badań
Molekularnych
i Makromolekularnych,
Polska Akademia Nauk,
ul. Sienkiewicza 112,
90-363 Łódź;
e-mail:
antoslaw@bio.cbmm.lodz.
pl

1. Wprowadzenie

Jeszcze 20 lat temu panował pogląd, że rola kwasów nukleinowych DNA i RNA ograniczona jest wyłącznie do przekazywania informacji genetycznej, natomiast enzymy białkowe są odpowiedzialne za chemię procesów komórkowych. Dopiero lata osiemdziesiąte ubiegłego wieku przyniosły odkrycie katalitycznych cząsteczek RNA tzw. rybozymów – zdolnych do degradacji/ligacji własnego szkieletu fosfodiesterowego (1,2). Podstawą dla kolejnych odkryć i innowacji w obszarze badań biologiczno-medycznych było opracowanie na początku lat osiemdziesiątych szybkiej, zautomatyzowanej metody chemicznej syntezy oligonukleotydów DNA i RNA (3,4). Fakt ten miał znamieny

wpływ na rozwój nowoczesnych metod biologii molekularnej m.in. odkrycia metody amplifikacji DNA (PCR) (5) oraz syntezy rekombinowanych białek (6). Łatwy dostęp do syntetycznych oligonukleotydów zachęcał do ich wykorzystania jako potencjalnych terapeutyków, inhibitorów procesu biosyntezy niepożądanych białek, zarówno endogennych jak i kodowanych przez geny wirusowe. Pionierami rewolucyjnej idei hamowania ekspresji niepożądanych genów za pomocą syntetycznych oligodeoksyrybonukleotydów komplementarnych do nici kodującej na poziomie informacyjnego RNA byli Zamecnik i Stephenson (strategia antysensowa) (7). Pierwszy tiofosforanowy oligonukleotyd antysensowy (*Vitravene*) został zaaprobowany w połowie roku 1998 w USA do zastosowań leczniczych w przypadkach infekcji wirusem cytomegalii u pacjentów z chorobą AIDS.

Odkrycie na początku lat osiemdziesiątych katalitycznych właściwości cząsteczek RNA zainicjowało kolejny etap w badaniach nad poszukiwaniem efektywnych inhibitorów biosyntezy niepożądanych białek na etapie translacji. Lata dziewięćdziesiąte przyniosły także opracowanie metodologii przyspieszonej ewolucji kwasów nukleinowych w warunkach *in vitro* (8-10), która umożliwiała m.in. wyselekcjonowanie katalitycznych cząsteczek DNA (deoksyrybozymów) zdolnych do degradacji wiązania fosfodiesterowego w komplementarnej cząsteczce RNA (11).

Znaczny postęp prac w metodach sekwencjonowania genów doprowadził (na przełomie wieków) do epokowego osiągnięcia biologii molekularnej. W roku 2000 ogłoszono fakt zsekwencjonowania ludzkiego genomu. Znajomość sekwencji ludzkiego genomu otwiera nowe możliwości identyfikacji genów białek chorobotwórczych, genów białek odpowiedzialnych za procesy nowotworzenia oraz innych genów zaangażowanych w rozwój jednostek chorobowych, których geneza jest wciąż nieznaną. Pozwala także dokonać wyboru skutecznych strategii terapeutycznych dla hamowania ekspresji niepożądanych genów, oraz wyboru odpowiednich sekwencji docelowych. Jest to istotne, gdy efekt inhibicji genu odbywa się poprzez antysensowe rozpoznanie sekwencji mRNA i jego ukierunkowaną degradację na etapie translacji, jak to ma miejsce w przypadku użycia strategii antysensowej i rybozymowej.

W artykule przedstawiono obecny stan wiedzy na temat wykorzystania rybozymów i deoksyrybozymów jako potencjalnych terapeutyków, metod ich projektowania i wprowadzania do organizmu oraz zastosowania w zaawansowanych badaniach klinicznych.

2. Podział i charakterystyka rybozymów

Dotychczas zidentyfikowano dziewięć typów naturalnych rybozymów, które można podzielić na trzy zasadnicze grupy (12): rybozomy niskocząsteczkowe typu *hammerhead*, *hairpin*, *delta* oraz *VS*, rybozomy wielocząsteczkowe (introny grupy I, introny grupy II, RNaza P i snRNA U2 oraz U6) oraz rybosom. Charakterystyka naturalnie występujących rybozymów przedstawiona jest w tabeli 1.

Tabela 1

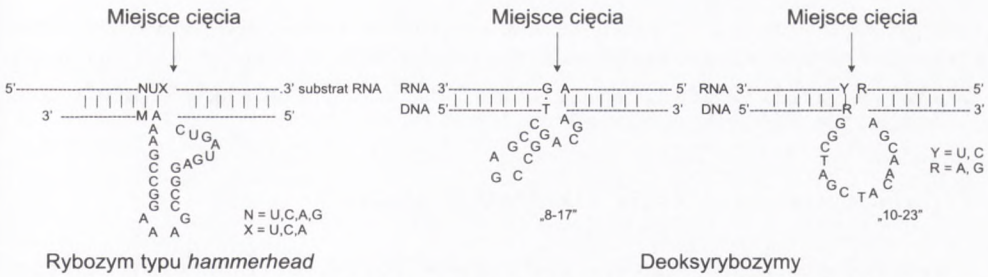
Charakterystyka naturalnie występujących rybozymów

Typ rybozymu	Liczba genów zawierających dany rybozym	Wielkość cząsteczki (nt)	Aktywność (produkt reakcji)	Zastosowanie terapeutyczne
<i>Hammerhead</i>	11	40	rybozomy samowycinające się w reakcji transestryfikacji (2',3'-cykliczny fosforan)	tak
<i>Hepatitis delta virus</i>	2	90		tak
<i>Hairpin</i>	1	70		tak
<i>Yarkud satellite</i>	1	160		nie
introny grupy I	>1500	210	rybozomy samowycinające się w reakcji transestryfikacji (5'-fosforan)	tak
introny grupy II	>700	500		nie
RNaza P	>500	300	dojrzewanie transkryptu tRNA w reakcji hydrolizy (5'-fosforan)	tak
snRNA (U2,U6)	70, 50	180,100	dojrzewanie RNA w reakcji transestryfikacji (5'-fosforan)	nie
rybosom 23S rRNA	>900	2,600	aktywność transferazy peptydylowej (wiązanie peptydowe)	nie

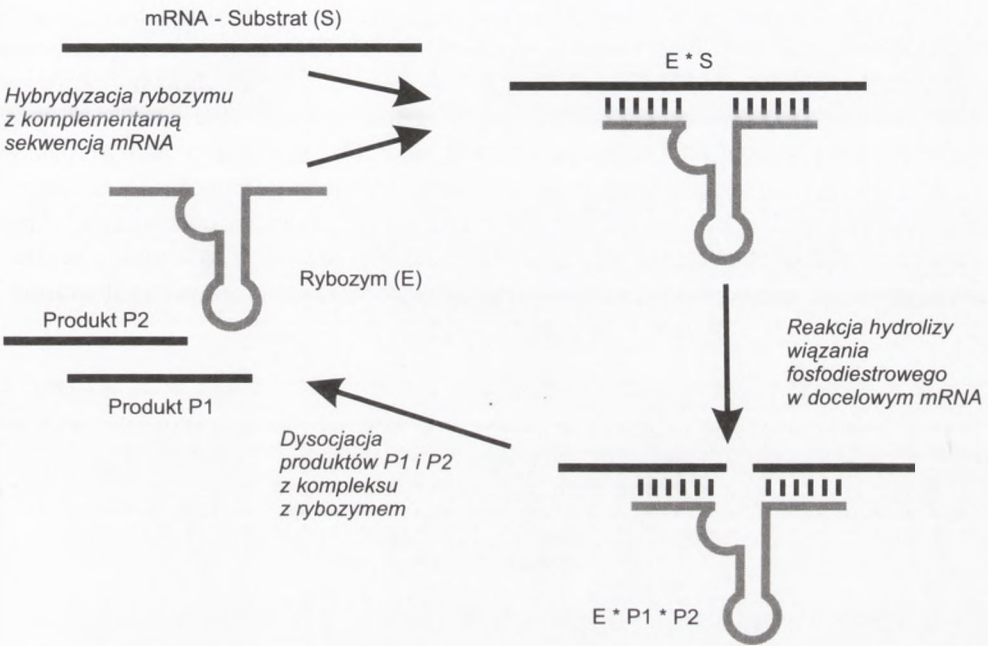
Rybozomy typu *hammerhead*, *hairpin*, *delta*, introny grupy I oraz RNaza P były testowane w systemach komórkowych jako sekwencyjno-specyficzne inhibitory ekspresji genów (13). Spośród wymienionych rybozymów, motyw katalityczny typu *hammerhead* znalazł najszersze zastosowanie jako potencjalna rybonukleaza. Większość zaawansowanych badań klinicznych prowadzona jest z udziałem tego rybozymu.

Dotychczas w systemach naturalnych nie zidentyfikowano cząsteczek DNA o właściwościach katalitycznych. Wyselekcjonowano je metodą selekcji kwasów nukleinowych *in vitro* (11). Zarówno rybozomy typu *hammerhead* jak i deoksyrybozomy „10-23” i „8-17” (rys. 1) degradują wiązanie fosfodiesterowe w docelowej cząsteczce RNA ze sprawnością porównywalną do sprawności enzymów białkowych. Cykl katalityczny takich enzymów jest zbliżony do cyklu katalitycznego enzymów białkowych (rys. 2). Efekt degradacji kodującej matrycy RNA oparty jest na strategii antysensowego rozpoznania substratu według reguł parowania typu Watsona-Cricka. Degradacja następuje po utworzeniu aktywnego kompleksu enzym-substrat (E-S). Utworzony kompleks E-P1-P2 ulega rozdysocjowaniu, a uwolniony enzym ponownie uczestniczy w kolejnym cyklu katalizy.

Mechanizm działania katalitycznych kwasów nukleinowych jest wciąż przedmiotem licznych dyskusji (14-17). Istnieją sugestie, że hydroliza/transestryfikacja wiązania fosfodiesterowego w RNA zachodzi według ogólnego mechanizmu katalizy kwasowo-zasadowej (18), a funkcję zasady spełniają pary elektronów zasad heterocyklicznych kwasów nukleinowych albo cząsteczki wody skoordynowane z jonem metalu znajdującym się w katalitycznym centrum rybozymu (19-21).



Rys. 1. Struktury drugorzędowe rybozomu typu *hammerhead* i deoksyrybozymów „10-23” i „8-17”.



Rys. 2. Cykl katalityczny rybozymów. Rybozym (E) rozpoznaje komplementarną sekwencję docelowego mRNA (S) poprzez hybrydyzację typu Watsona-Cricka. Po przyjęciu aktywnej konformacji w kompleksie E*S dochodzi do degradacji wiązania fosfodiesterowego w nici substratu. Tworzy się kompleks rybozomu z produktami degradacji E*P1*P2. Kompleks ten ulega rozdysonowaniu, dając produkty reakcji P1 i P2, oraz uwolniony rybozym, gotowy do następnego cyklu katalizy.

3. Rybozomy jako biofarmaceutyki

Rybozomy jako biofarmaceutyki muszą spełniać szereg wymagań takich jak: chemiczna trwałość w warunkach fizjologicznych, odporność na działanie enzymów nukleolitycznych, zdolność do przenikania przez błony komórkowe, zdolność osiągania odpowiednich stężeń w cytoplazmie, specyficzne oddziaływanie z docelowym fragmentem mRNA, niską toksyczność i wysoką aktywność katalityczną. Naturalne oligorybonukleotydy nie

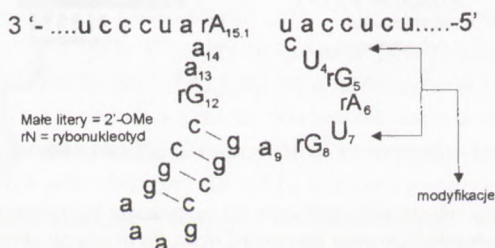
spełniają większości tych wymagań, dlatego też w wielu laboratoriach na świecie prowadzone są intensywne badania nad syntezą odpowiednich pochodnych RNA charakteryzujących się przede wszystkim zwiększoną odpornością na degradację nukleolityczną.

3.1. Chemiczne modyfikacje oligorybonukleotydów

W celu zwiększenia trwałości rybozymów w środowisku komórkowym do cząsteczki RNA wprowadzane są różnego rodzaju modyfikacje, głównie w obrębie wiązania fosfodiesterowego, np. poprzez zamianę niemostrkowego atomu tlenu na atom siarki. Modyfikowana jest także część cukrowa nukleotydów poprzez zamianę grupy 2'-OH na grupę 2'-OMe, grupę NH₂, czy atom fluoru (22). Często, dla zapewnienia odporności na działanie 3'-egzonukleaz, 3'-końcowy nukleotyd rybozomu wprowadzony jest przez tzw. wiązanie odwrócone typu 3'-3'. Tak zabezpieczane rybozomy syntetyzowane są zautomatyzowaną metodą amidofosforynową, a modyfikowane jednostki wprowadzane są kolejno do rosnącego łańcucha polimeru. Metodą tą realizowane są wielkoskalowe syntezy materiału do badań klinicznych (23,24). Chemicznie modyfikowane rybozomy często są mniej aktywne niż ich naturalne prekursorzy, jednakże dzięki podwyższonej trwałości wewnątrzkomórkowej są dostatecznie skuteczne, aby stanowić potencjalne terapeutyki (tab. 2).

Tabela 2

Wewnątrzkomórkowa stabilność i aktywność katalityczna chemicznie modyfikowanych rybozymów typu *hammerhead*



U ₄ /U ₇ (2'/2')	Aktywność-t _{1/2} ^a (t _{1/2} /min)	Stabilność-t _{1/2} ^b (t _{1/2} /min)	βt _{1/2} /t _{1/2} × 10
OH/OH	1	0,1	1
O-Me/O-Me	4	260	650
ara-F/O-Me	5	> 500	> 1000
O-Me/NH ₂	5	500	1000
NH ₂ /NH ₂	2	300	1500
C-allil/O-Me	3	> 500	> 1700
C-allil/O-Me + iT	3	4320	14400
NH ₂ /NH ₂ + iT ^c	2	4320	21600

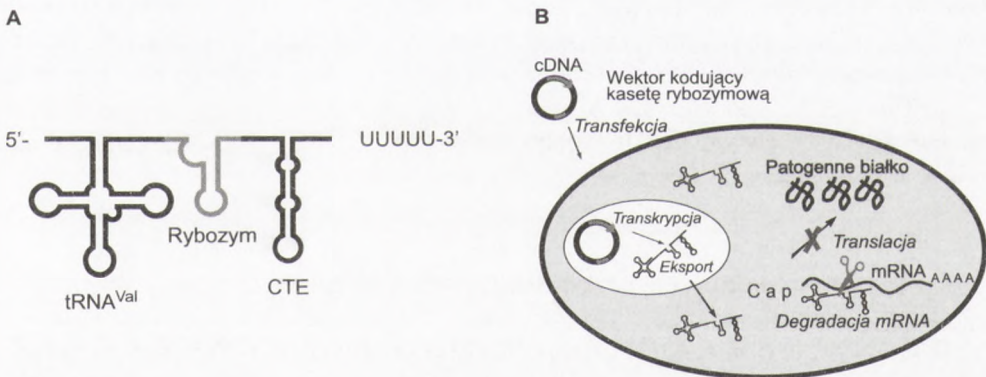
^a – czas wymagany do degradacji połowy cząsteczek substratu w roztworze w warunkach standardowych (50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 nM substrat, 8, 40 lub 100 nM stężenie rybozomu);

^b – czas degradacji połowy cząsteczek rybozomu w ludzkim osoczu w 37°C;

^c iT – *inverted* T-wiązanie N-T-3' jest „odwrócone”, tj. typu 3'-3'.

3.2. Wewnątrzkomórkowa ekspresja rybozymów

Efektywność rybozymów związana jest w istotny sposób ze sposobem ich dostarczenia do komórki. Rybozymy mogą być dostarczane do komórki w postaci chemicznie syntetyzowanych oligorybonukleotydów lub w postaci kodujących je DNA (cDNA), wklonowanych w odpowiedni wektor ekspresyjny, bakteryjny lub wirusowy. W tym przypadku katalizatory wytwarzane są endogennie, w wyniku aktywacji komórkowego aparatu transkrypcji. W początkach badań nad technologią rybozymową dla aktywacji aparatu transkrypcji stosowano promotory wirusów CMV (*Cytomegalovirus*) lub SV40 (*Simian virus*), właściwe dla transkrypcji długich RNA (mRNA) za pomocą polimerazy RNA II (25). Takie rybozymy, wytwarzane zazwyczaj w niewielkiej liczbie kopii, okazywały się mało aktywne. Zastosowanie promotora U6 lub sekwencji transferowego kwasu rybonukleinowego (tRNA) dla aktywacji polimerazy RNA III, syntetyzującej krótsze cząsteczki RNA, zapewniało dużą liczbę kopii transkryptu; jednakże rybozymy te również nie wykazywały oczekiwanej aktywności (26) ze względu na lokalizację transkryptów w jądrze komórkowym. Dopiero ostatnio wykazano, że rybozymy transkrybowane pod kontrolą promotora tRNA ($tRNA^{Val}$) i spełniające określone wymogi strukturalne, charakteryzują się wysoką aktywnością w środowisku komórkowym (27). Rybozymy połączone z cząsteczką tRNA (rys. 3a), zachowujące II-rzędową strukturę niedojrzałego tRNA, mają zdolność do gromadzenia się w cytoplazmie (28,29). Tutaj następuje „kolokalizacja” obu reagujących ze sobą cząsteczek: rybozymu i docelowej cząsteczki RNA (rys. 3b). Na podstawie badań transportu tRNA w oocytach żabich sądzono, że jedynie dojrzałe i aminoacylowane tRNA w komórkach rozrodczych mogą efektywnie lokalizować się



Rys. 3. (a) Struktura kasety rybozymowej aktywnego rybozymu zawiera sekwencję rybozymu, $tRNA^{Val}$ i sekwencję CTE (*constitutive transport element*); (b) Ekspresja rybozymów w komórce. Rybozym skoniugowany z tRNA i CTE lokalizuje się w cytoplazmie, gdzie z udziałem helikaz komórkowych rozpoznaje i efektywnie degraduje docelową sekwencję mRNA, prowadząc do zahamowania ekspresji atakowanego genu.

w cytoplazmie (30). Taira i wsp. (31,32) wykazali, że zdolność ta właściwa jest również dla komórek somatycznych. W komórkach tych zdolność przenikania błony jądrowej wykazują również cząsteczki niedojrzałego tRNA. W transporcie uczestniczy białko wiążące tRNA – eksportyna-t (*exportin-t*, Xpo-t). Wykazano, że to samo białko uczestniczy w efektywnym transporcie transkryptów rybozymowych. Odkrycie to tłumaczy zapewne wcześniejsze niepowodzenia technologii rybozymowej, w której rybozomy, zawierające promotor dla polimerazy RNA III, ale nie zachowujące drugorzędowej struktury cząsteczki tRNA, gromadziły się w jądrze i nie wykazywały pożądanej aktywności w środowisku komórkowym (26,27).

3.3. Rybozomy typu *hammerhead* zasocjowane z helikazami komórkowymi

Aktywność rybozymów zależy także od ich możliwości rozpoznania jednoniciowej, komplementarnej sekwencji substratu i utworzenia dwuniciowego kompleksu substrat-rybozym. Skomplikowana struktura drugorzędowa długiego łańcucha informacyjnego RNA zawiera głównie domeny dwuniciowe i tylko nieliczne fragmenty jednoniciowe (pętle, wyrzuszenia), wymagane do tworzenia wiązań typu Watsona-Cricka z komplementarnymi oligonukleotydami. Aktywność rybozymów, a także oligonukleotydów antysensowych i deoksyrybozymów, w znacznej mierze zależy od wyboru właściwego miejsca degradacji w łańcuchu docelowej cząsteczki RNA. Ponadto, drugorzędowa struktura mRNA może być inna w warunkach natywnych niż wymodelowana z wykorzystaniem programu komputerowego MFOLD (33). Modyfikacja rybozomu, polegająca na przyłączeniu do jego końca 3' motywu CTE (*constitutive transport element*) (rys. 3) pomaga rozwiązać problem dostępności miejsca docelowego w skomplikowanej strukturze mRNA. Sekwencja CTE jest motywem aptamerycznym dla helikaz komórkowych, zdolnych do rozplatania dwuniciowych struktur RNA (34). Wykazano, że rybozomy skoniugowane z sekwencją CTE cechują się znacznie zwiększoną aktywnością w systemach komórkowych w stosunku do uprzednio niedostępnych substratów (35). Kasety zawierające sekwencję rybozomu, tRNA^{Val} i sekwencję CTE, jak się wydaje, spełniają wszystkie wymagania, zapewniające aktywność kodowanym rybozomom.

4. Rybozomy w badaniach przedklinicznych i klinicznych

O intensywności badań nad wykorzystaniem katalitycznych RNA jako potencjalnych terapeutyków świadczy liczba kilkuset przyznanych patentów z zakresu technologii rybozymowej. Strategia degradacji RNA ukierunkowana jest głównie na geny kodujące białka onkogenne, czynniki wzrostu, ich receptory powierzchniowe oraz na cząsteczki przekazujące sygnały komórkowe. Także wirusowe, genomowe RNA stanowią potencjalne sekwencje docelowe.

Do chwili obecnej kilkanaście rybozymów skierowanych głównie na hamowanie ekspresji genów wirusowych (HBV, HCV, HIV-1) oraz białek potencjalnie chorobotwórczych, takich jak kinaza tyrozynowa, kinaza białkowa PKC α czy białek istotnych w restenozie, znajduje się w badaniach przedklinicznych lub w I/II fazie badań klinicznych. Obszerne omówienie zastosowania rybozymów w terapii przeciwwirusowej w systemach komórkowych można znaleźć w pracach przeglądowych Dutkiewicz i Ciesiołki (36) oraz Roli i Kuźmaka (37).

W tabeli 3 przedstawione są wybrane przykłady zastosowania rybozymów do ukierunkowanej degradacji mRNA niektórych genów i leczenia związanych z tymi genami schorzeń, znajdujące się w fazie badań przedklinicznych/klinicznych, prowadzonych przez firmy farmaceutyczne i ośrodki akademickie.

Firma Ribozyme Pharmaceuticals Inc. (RPI) z Boulder w stanie Kolorado prowadzi zaawansowane badania nad wykorzystaniem trzech syntetycznych rybozymów typu *hammerhead*, zawierających modyfikacje zapewniające ich zwiększoną trwałość wewnątrzkomórkową (24,38).

Rybozym o nazwie angiozym (ANGIOZYME[®]), badany wspólnie przez RPI i Chiron Corporation, skierowany jest na degradację mRNA genu receptora kinazy tyrozynowej (Flt-1), zasocjowanego z białkiem VEGFR-1 (receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyń krwionośnych). Białko VEGFR-1 odgrywa zasadniczą rolę w angiogenezie komórek nowotworowych. Angiozym znajduje się w II fazie badań klinicznych i testowany był na pacjentach z nowotworem sutka lub okrężnicy. U 25% testowanych osób z późnymi formami nowotworów, po 6-miesięcznym podawaniu rybozemu podskórnym w warunkach domowych, zaobserwowano zahamowanie wzrostu nowotworu. Obecnie trwają badania nad skojarzonym leczeniem nowotworów sutka w połączeniu z innymi lekami (*paclitacel* i *carboplatin*).

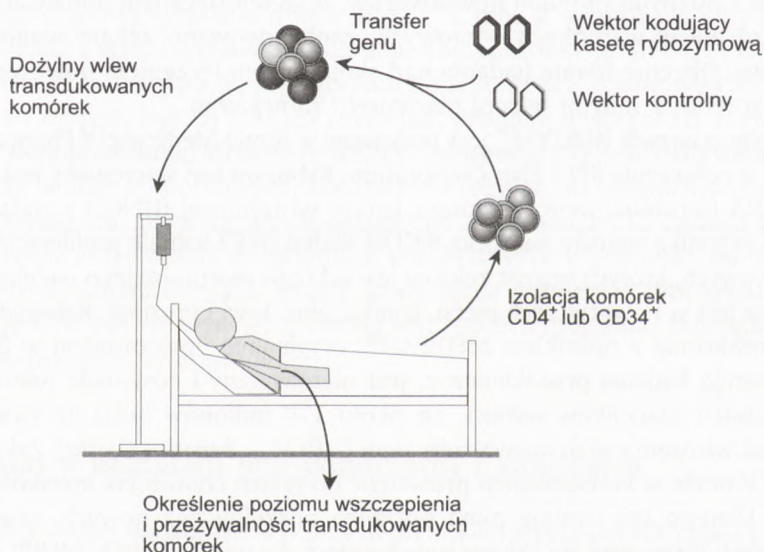
Rybozym o nazwie HERZYM[®] jest testowany w firmie Medizyne[™] Pharmaceuticals, powstałej z połączenia RPI i Elan Corporation. Rybozym ten skierowany jest na degradację mRNA transbłonowego receptora kinazy tyrozynowej (HER-2) z rodziny białek ludzkiego czynnika wzrostu naskórka (EGFR). Białko HER2 hamuje proliferację komórek nowotworowych, których wzrost zależny jest od tego receptora; jego nadekspresja obserwowana jest w nowotworach piersi, jajnika, płuc, krwi i prostaty. Rybozym podawany jest podskórnym z nośnikiem MEDIPAD[®], oryginalnie opracowanym w firmie Elan i, jak pokazują badania przedkliniczne, jest nietoksyczny i doskonale tolerowany.

Z ostatnich szacunków wynika, że około 170 milionów ludzi na świecie zakażonych jest wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV – *hepatitis C virus*). Zakażenie wirusem HCV może w konsekwencji prowadzić do takich chorób jak marskość i/lub rak wątroby. Dlatego też istnieje pilna potrzeba poszukiwania nowych, selektywnych i skutecznych terapeutyków skierowanych przeciwko wirusowi HCV. W RPI zakończono badania II fazy klinicznej nad zastosowaniem syntetycznego rybozemu o nazwie HEPTAZYM[®], skierowanego na 5'-końcowy region UTR RNA wirusa HCV. Jest to konserwatywna sekwencja wirusowego RNA zawierająca sygnał inicjacji translacji. U 10% testowanych pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C zaobserwowano

znaczne obniżenie poziomu wirusowego RNA w płynach ustrojowych. Przy skojarzonym podawaniu z interferonem 1 (o wydłużonym czasie działania) heptazym wykazywał lepsze właściwości przeciwwirusowe. Rozwinięciem tych badań są obecnie prowadzone intensywne poszukiwania nowej generacji rybozymów skierowanych na RNA wirusa HCV, o podwyższonej aktywności i stabilności. Nowe syntetyczne rybozymy są rozkładane znacznie wolniej przez wewnątrzkomórkowe rybonukleazy i ich poziom w wątrobie jest zdecydowanie wyższy od rybozymów pierwszej generacji (39).

Rybozymy dostarczane metodą terapii genowej, generowane wewnątrzkomórkowo poprzez ekspresję wektorów retrowirusowych, znalazły najszersze zastosowanie w badaniach skierowanych na zahamowanie ekspresji wirusa HIV-1 (*human immunodeficiency virus*). W firmie RPI testowany jest rybozym skierowany na sekwencje kodujące genów białek wirusowych HIV-1 (Tat i Rev). Rybozym ten znajduje się w II fazie badań klinicznych i jest testowany na pacjentach zakażonych wirusem HIV-1 z nowotworami układu chłonnego.

Trzy oddzielne grupy badawcze (40-42) użyły wektora retrowirusowego MMLV (*Moloney murine leukemia virus*) do wprowadzania kaset rybozymowych, skierowanych na hamowanie ekspresji wirusa HIV-1 w limfocytach CD4⁺ lub ich krwiotwórczego prekursora CD34⁺, uzyskanego *ex vivo* od zakażonych pacjentów lub ich bliźniaczego rodzeństwa (rys. 4) (43). Transdukowane komórki podawano zakażonym pacjentom i monitorowano efektywność wszczepiania i przeżywalność komórek z ekspresją ry-



Rys. 4. Badania kliniczne w terapii pacjentów zakażonych wirusem HIV-1. Uzyskane *ex vivo* limfocyty, zawierające receptor powierzchniowy CD4⁺ lub CD34⁺, transdukowane są wektorami wirusowymi kodującymi rybozymy skierowane na degradację genu wirusa HIV-1, lub wektorami kontrolnymi. Transdukowane komórki podawane są pacjentom. Skuteczność terapii określana jest poprzez pomiar poziomu wszczepienia i przeżywalności komórek, w których następuje ekspresja rybozymu.

bozymów. Początkowo na podstawie uzyskanych rezultatów sugerowano, że transfer genów kodujących rybozymy jest dobrze tolerowany, a indukowane komórki utrzymują się przez dłuższy czas w organizmie pacjenta, dłużej niż komórki transdukowane wektorem kontrolnym (41). Niestety, długoterminowy transfer genów rybozymowych w komórkach potomnych był niezadowalający. Poziom transdukowanych komórek po roku od podania spadał poniżej poziomu wykrywalności. Badania te wciąż wymagają liczniejszych prób klinicznych, jak również znalezienia skutecznego systemu transferującego gen rybozimu, który będzie efektywnie transdukować komórki krwiotwórcze, posiadające zdolność różnicowania. Zachęcające wyniki badań przedklinicznych sugerują, że kolokalizacja rybozimu z jego cząsteczką docelową mRNA może zwiększyć aktywność rybozimu w układzie *in vivo* (28,29,44).

Interesujący przykład zastosowania dimerycznych rybozymów (MAXIZYME®) do hamowania ekspresji onkogeny kinazy tyrozynowej, kodowanej przez chimeryczny gen *bcr-abl*, powodującej uzłośliwienie białych krwinek w konsekwencji prowadzące do przewlekłej białaczki szpikowej, zaproponowany został przez grupę Tairy (45). Maxizym podawany w systemie retrowirusowym, zawierającym promotor tRNA^{Val} (patrz rozdz. 3.2) zawierał ramię sensorowe, które po rozpoznaniu sekwencji miejsca splicingu genów *bcr* i *abl* wywoływało allosteryczny efekt tworzenia centrum katalitycznego rybozimu typu *hammerhead* i prowadziło do degradacji onkogennej mRNA. Przeżywalność myszy transdukowanych komórkami białaczkowymi spadała stopniowo do zera w ciągu 100 dni, podczas gdy żadna z myszy, którym dodatkowo podano wektor kodujący maxizym, nie wykazywała zmian nowotworowych. Wyniki tych badań stwarzają możliwości wykorzystania maxizymów do oczyszczania komórek szpiku kostnego pobranych od pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową, a następnie zwalczania choroby w wyniku autotransplantacji naprawionego szpiku.

W różnych fazach badań przedklinicznych i klinicznych znajdują się rybozymy skierowane na onkogeny typu *ras*, onkogeny centralnego systemu nerwowego (CNS), np. te wywołujące guzy mózgu. Prowadzone są także badania nad rybozymami skierowanymi na geny wirusowe przewlekłego zapalenia wątroby typu B (HBV) (22,46). Dane dotyczące wybranych aplikacji terapeutycznych rybozymów zebrane są w tabeli 3.

Tabela 3

Przedkliniczne i kliniczne zastosowania rybozymów

Firma	Cząsteczka docelowa/choroba (nazwa rybozimu)	Faza badań klinicznych*	Literatura
1	2	3	4
American Cyanamid	<i>ras</i> / nowotwory	przedkliniczna	(22)
Columbia University	<i>bcl-2</i> / angiogeneza komórek nowotworowych	przedkliniczna	(22)
Gene Shears	HIV-1 / AIDS	faza I/II	(22)
Immusol	HIV-1 / AIDS HBV / wirusowe zapalenie wątroby typu B HCV / wirusowe zapalenie wątroby typu C restenoza	faza I/II przedkliniczna	(22)

1	2	3	4
Innovir	HBV / wirusowe zapalenie wątroby typu B HCV / wirusowe zapalenie wątroby typu C <i>bcr-abl</i> gen kinazy tyrozylowej / CML – przewlekła białaczka szpikowa	przedkliniczna	(22)
Osaka University	HCV / wirusowe zapalenie wątroby typu C	przedkliniczna	(22)
Ribozyme Pharmaceuticals Inc.	<i>tat, rev</i> (HIV-1) / nowotwór układu chłonnego <i>flt-1</i> (VEGFR1) / nowotwór sutka i okrężnicy (ANGIOZYM) 5-UTR HCV / wirusowe zapalenie wątroby typu C (HEPTAZYM) HER2 / nowotwór sutka i okrężnicy (HERZYM)	faza I/II faza II faza II faza II	(39) (39) (39) (39)
Tokio University	HCV / wirusowe zapalenie wątroby typu C <i>bcr-abl</i> / przewlekła białaczka szpikowa	przedkliniczna badania przedkliniczne	(22) (45)
University of Pittsburgh	ekson 2 genu <i>CD44</i> / glejak	przedkliniczna	(22)
City of Hope	HIV-1 / AIDS	faza I/II	(40)
University of California	HIV-1 / <i>ex vivo</i>	faza I	(41)

* badania przedkliniczne – badania laboratoryjne i na zwierzętach; badania kliniczne faza I – badania na 20-80 zdrowych ochotnikach; badania kliniczne faza II – badania na 100-300 chorych ochotnikach

5. Deoksyrybozomy jako potencjalne terapeutyki

Dotychczas w literaturze pojawiło się także kilkanaście doniesień o skutecznym wykorzystaniu deoksyrybozomów do hamowania ekspresji genów wirusowych (wirusa HIV-1, wirusów zapalenia wątroby typu B i C) oraz genów niektórych potencjalnie chorobotwórczych białek (genu *hungtingtyny*, kinazy tyrozynowej *bcr-abl*, czy genu *c-myc*). Badania te prowadzone były w systemach komórkowych i są omówione w kilku pracach przeglądowych (22,47,48). Dotychczas nie pojawiły się doniesienia o wprowadzeniu deoksyrybozomów do badań na zwierzętach, czy też do badań klinicznych. Prawdopodobnie te terapeutyczne kwasy nukleinowe z powodu łatwiejszej dostępności syntetycznych oligodeoksyrybonukleotydów i ich zwiększonej trwałości w płynach ustrojowych, znajdują się w kręgu zainteresowań klinicznych w najbliższych latach.

6. Perspektywy

Katalityczne kwasy nukleinowe – rybozomy i deoksyrybozomy – rozpoznają docelową cząsteczkę komórkowego lub wirusowego RNA poprzez tworzenie dupleksu typu Watsona-Cricka. Ta właściwość czyni rybozomy i deoksyrybozomy wysoce specyficznymi rybonukleazami, zdolnymi do ukierunkowanej degradacji komplementarnego RNA ze sprawnością porównywalną do sprawności enzymów białkowych. Katalityczne kwasy nukleinowe od momentu ich odkrycia i udokumentowania ich aktywności wobec substratów w układzie *trans* znalazły się w centrum zainteresowania jako potencjalne narzędzia molekularne dla ukierunkowanej degradacji ge-

nów białek potencjalnie chorobotwórczych i genów wirusowych. Skompletowanie sekwencji ludzkiego genomu, a także zsekwencjonowanie licznych genów wirusowych i genów organizmów patogennych, oferuje olbrzymią ilość potencjalnych sekwencji, które mogą być użyte jako sekwencje docelowe dla katalitycznych kwasów nukleinowych. Ta ilość ulegnie jeszcze zwiększeniu, gdy zidentyfikowane zostaną funkcje dotychczas nie znanych genów. Jednakże, ażeby rybozimy mogły być użyte w badaniach klinicznych, muszą spełniać szereg wymagań w badaniach prowadzonych na systemach komórkowych i na układach zwierzęcych. Najważniejsze z nich to odpowiednia trwałość w bogatych w nukleazy płynach ustrojowych i tkankach, prawidłowy profil właściwości farmakokinetycznych oraz wysoka efektywność w badaniach przedklinicznych.

Ostatnie kilka lat to okres rozkwitu technologii interferencyjnego RNA, w której krótkie dwuniciowe RNA, komplementarne do sekwencji docelowego mRNA wywołują w komórkach efekt wyciszania ekspresji atakowanego genu (49), i tym samym stanowią alternatywne podejście dla terapeutycznego wykorzystania kwasów nukleinowych. Wydaje się jednak, że olbrzymia praca badawcza włożona zarówno w technologię antysensową jak i technologię rybozymową zaowocuje w najbliższych latach w pojawieniu się na rynku nowych, skutecznych leków przeciwko wielu dotychczas nieuleczalnym chorobom (50).

Praca powstała w ramach realizacji grantów finansowanych przez Komitet Badań Naukowych, grant nr PBZ-KBN-059/T09/09 oraz 5 Program Ramowy Unii Europejskiej, grant QLRT nr 2001-02774.

Literatura

1. Kruger K., Grabowski P. J., Zaug A. J., Sands J., Gottschling D. E., Cech T. R., (1982), *Cell*, 31, 147-157.
2. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S., (1983), *Cell*, 35, 849-857.
3. Tanaka T., Letsinger R. L., (1982), *Nucleic Acids Res.*, 10, 3249-3260.
4. Caruthers M. H., (1985), *Science*, 230, 281-285.
5. Mullis K., Faloona F., Sharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H., (1986), *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51, 263-273.
6. Efimov V. A., Chakhmakheva O. G., Ovchinnikov Y. A., (1986), *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, 4, 79-116.
7. Zamecnik P., Stephenson M. L., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 280-284.
8. Tuerk C., Gold L., (1990), *Science*, 249, 505-510.
9. Ellington A. D., Szostak J. W., (1990), *Nature*, 346, 818-822.
10. Robertson D. L., Joys G. F., (1990), *Nature*, 344, 467-468.
11. Santoro S. W., Joyce G., (1997), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94, 4262-4266.
12. Doudna J. A., Cech T. R., (2002), *Nature*, 418, 222-228.
13. Christoffersen R. E., Marr J. J., (1995), *J. Med. Chem.*, 38, 2023-2037.
14. Lyne P. D., Karplus M., (2000), *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 166-167.
15. Torres R. A., Bruice T. C., (2000), *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 781-789.
16. Warashina M., Takagi Y., Sawata S., Zhou D. M., Kuwabara T., Taira, K., (1997), *J. Org. Chem.*, 62, 9138-9147.

17. Zhou D. M., Zhang L. H., Orita M., Sawata S., Yoshinari K., Taira K., (1996), *Phosphorus, Sulfur, Silicon, Relat. Elem.*, 109, 273-276.
18. Westhof E., (1999), *Science*, 286, 61-62.
19. Rupert P. B., Ferre-D'Amare A. R., (2001), *Nature*, 410, 780-786.
20. Ferre-D'Amare A. R., Zhou K., Doudna J. A., (1998), *Nature*, 395, 567-574.
21. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P. B., Steitz T. A., (2000), *Science*, 289, 920-930.
22. Sun L. Q., Cairns M. J., Saravolac E. G., Baker A., Gerlach W. L., (2000), *Pharm. Rev.*, 52, 325-347.
23. Wincott F., DiRenzo A., Shaffer C., Grimm S., Tracz D., Workman C., Sweedler D., Gonzalez C., Scaringe S., Usman N., (1995), *Nucleic Acids Res.*, 23, 2677-2684.
24. Beigelman L., McSwiggen J. A., Draper K. G., Gonzalez C., Jensen K., Karpeisky A. M., Modak A. S., Matulic-Adamic J., DiRenzo A. B., Haerberli P., et al. (1995), *J. Bol. Chem.*, 270, 25702-25708.
25. Cameron F. H., Jennings P. A., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9139-9143.
26. Bertrand E., Castanotto D., Zhou C., Carbonnelle C., Lee G. P., Chatterjee S., Grange R., Pictet R., Kohn D., Engelke D., Rossi J. J., (1997), *RNA*, 3, 75-88.
27. Koseki S., Tanabe T., Tani K., Asano S., Shioda T., Nagai Y., Shimada T., Ohkawa J., Taira K., (1999), *J. Virol.*, 1868-1877.
28. Miyagishi M., Kuwabara T., Taira K., (2001), *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48, Suppl. 1, 96-101.
29. Kuwabara T., Warashina M., Koseki S., Sano M., Ohkawa J., Nakayama K., Taira K., (2001), *Nucleic Acids Res.*, 29, 2780-2788.
30. Lund E., Dahlberg J. E., (1998), *Science*, 282, 2082-2085.
31. Kuwabara T., Warashina M., Sano M., Tang H., Wong-Staal F., Munekta E., Taira K., (2001), *Biomacromol.*, 2, 1229-1242.
32. Kato Y., Kuwabara T., Warashina M., Toda H., Taira K., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 15378-15385.
33. Zucker M., Stiegler P., (1981), *Nucleic Acids Res.*, 9, 133-148.
34. Tang H., Gaietta G. M., Fischer W. H., Ellisman M. H., Wong-Staal F., (1997), *Science*, 276, 1412-1415.
35. Warashina M., Kuwabara T., Kato Y., Sano M., Taira K., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 5572-5577.
36. Dutkiewicz M., Ciesiolka J., (2002), *Biotechnologia*, 1, 57-70.
37. Rola M., Kuźmak J., (2001), *Postępy Biochem.*, 47, 282-291.
38. Usman N., Blatt L. M., (2000), *J. Clin. Inv.*, 106, 1197-1202.
39. Ribozyme Pharmaceuticals Inc., Next Generation Nucleic Acid Technology, www.rpi.com
40. Bauer G., Valdez P., Kearns K., Bahner I., Wen S. F., Zaia J. A., Kohn D. B., (1997), *Blood*, 89, 2259-2267.
41. Wong-Staal F., Poeschla E. M., Looney D. J., (1998), *Hum. Gene Ther.*, 9, 2407-2425.
42. Amado R. G., Mitsuyasu R. T., Symonds G., Rosenblatt J. D., Zack J., Sun L. Q., Miller M., Ely J., Gerlach W., (1999), *Hum. Gene Ther.*, 10, 2255-2270.
43. Sullenger B. A., Gilboa E., (2002), *Nature*, 418, 252-258.
44. Sullenger B. A., Cech T. R., (1993), *Science*, 262, 1566-1569.
45. Tanabe T., Kuwabara T., Warashina M., Tani K., Taira K., Asano S., (2000), *Nature*, 473.
46. Opalinska J. B., Gewirtz A. M., (2002), *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 3, 928-933.
47. Nawrot B., (2001), *Postępy Biochem.*, 48, 20-33.
48. Khachigian L. M., (2002), *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 4, 119-121.
49. Hannon G. J., (2002), *Nature*, 418, 244-251.
50. McCoy M., (2001), *C&EN*, Sept 24, 22-23.