



## Strategia antysensowych oligonukleotydów

Wojciech J. Stec

Centrum Badań Molekularnych  
i Makromolekularnych PAN  
Łódź

Społeczeństwo niechętnie rezygnuje z osiągnięć cywilizacyjnych często warunkujących nasilanie się zagrożeń, takich jak: przeludnienie, zmiany klimatyczne, konsekwencje zakłócania równowagi ekologicznej, zanieczyszczenie środowiska, wyczerpywanie zasobów energetycznych. Oczekuje ono od uczonych natychmiastowych rozwiązań, chroniących je przed plagami cywilizacyjnymi. O ile groźba głodu, z wyłączeniem państw afrykańskich, jak się wydaje, jest oddalona w świetle nierównomiernej dystrybucji żywności (jej nadprodukcji, np. w USA i w Europie wobec niedostatku w Afryce), choroby cywilizacyjne (AIDS, nowotwory, choroby układu krążenia) stanowią otwarte wyzwanie dla nauki końca XX i początku XXI wieku.

W wyniku olbrzymiego postępu obserwowanego w II połowie naszego stulecia w zakresie nauk biologicznych wytworzył się pogląd, że skutki często bezsensownego działania człowieka będą mogły być naprawiane bez konieczności rezygnowania z dobrodziejstw cywilizacyjnych. W zakresie poszukiwania nowych strategii terapeutycznych zwalczających choroby cywilizacyjne wiele nadziei wiąże się obecnie z poznaniem molekularnych podstaw chorób, takich jak: AIDS, schorze-

nia nowotworowe, czy choroby układu krążenia. Wiadomo, że przyczyną chorób wirusowych jest inkorporacja informacji genetycznej wirusa do zasobów genowych zainfekowanego człowieka i wytwarzanie przez „gospodarza” tzw. „niezdrowych” białek specyficznych dla wirusa. Wyjaśnienie funkcji protoonkogenu i ich aberracji do onkogenów odpowiedzialnych za wytworzenie „niezdrowych” białek tłumaczy niekorzystny dla organizmu rozwój procesów nowotworowych. Restenoza, proces zasklepienia naczyń krwionośnych, jest spowodowana uaktywnieniem genu *c-myb* i niekontrolowanym rozwojem komórek mięśni gładkich.

Konsekwencją pozyskanej wiedzy jest poszukiwanie sposobów postępowania, hamujących wytwarzanie „niechcianych” białek oraz ingerencja w procesy biosyntezy białek regulatorowych. Blokowanie procesów ekspresji genów może być wywołane poprzez ingerencję w chromosomalny DNA w wyniku rekombinacji homologicznej, tj. zamiany fragmentu genu na inny, hamujący jego ekspresję, bądź wprowadzenie do komórek plazmidów zawierających odcinki cDNA, których transkrypcja spowoduje wytworzenie antysensowych, tj. komplementarnych do mRNA, poliirybonukleotydów zdolnych do hybrydyzacji z natywnym mRNA. Utworzenie hybrydy antysensowy RNA/natywny mRNA hamuje proces biosyntezy białka zakodowanego w blokowanym fragmencie RNA (1,2).

Jedną z prostszych strategii ukierunkowujących poszukiwania nowych terapeutyków jest *strategia antygenowa* (3) oraz *strategia antysensowych oligonukleotydów* (4). Podstawą ich jest wiedza o procesie oddziaływań biomolekuł typu DNA/DNA oraz DNA/RNA, którego determinantą jest wytwarzanie wiązań wodorowych pomiędzy donorowymi i akceptorowymi funkcjami zasad nukleinowych. U podstaw strategii antygenowej (zob. M. Kwinkowski) leży założenie, że wprowadzenie do komórki oligonukleotydu zdolnego do selektywnego tworzenia trypleksów z wybranymi fragmentami DNA, hamuje proces replikacji i transkrypcji, wytworzenie dupleksu pomiędzy egzogennymi oligonukleotydami a wybranymi fragmentami mRNA, hamując proces translacji, stanowi założenie dla *strategii DNA antysensowego wobec mRNA* (dla uproszczenia nazywanej w tym opracowaniu *strategią antysensowych oligonukleotydów*). W tym wyidealizowanym modelu zakłada się, że: 1) możliwy jest transport syntetycznych oligonukleotydów poprzez błony komórkowe, 2) oligonukleotydy nie oddziałują z białkami komórkowymi, 3) proces rozpoznawania docelowego DNA lub mRNA jest szybki i w pełni selektywny (specyficzny), 4) zasocjowanie antysensowych oligonukleotydów do fragmentów RNA zahamuje bądź wyeliminuje proces translacyjny, tj. uniemożliwi biosyntezę białek programowaną przez wybrany mRNA, 5) oligonukleotydy nie będą degradowane przez enzymy nukleolityczne z szybkością uniemożliwiającą utworzenie struktur trypleksowych bądź dupleksowych, 6) oligonukleotydy nie są toksyczne dla komórki, 7) produkty ich degradacji, jeżeli ona zachodzi, nawet jeśli wykorzystywane do syntezy *de novo* DNA, nie będą powodowały mutacji genetycznych.

Spełnienie tych założeń, jakkolwiek przeciwstawne do zjawiska homeostazy komórkowej stanowiącej konsekwencje ewolucyjnego rozwoju gatunków, jak się wydaje, jest możliwe w świetle zebranej wiedzy. Liczne dowody zawarte

w raportach z badań *in vitro*, jak i coraz częstszych doniesieniach na temat przeprowadzonych badań w systemach *in vivo*, doprowadziły do narodzin *technologii antysensowych oligonukleotydów*, przedstawionej w kilku opracowaniach monograficznych (5), a także w zarysie w dalszych opracowaniach opublikowanych na łamach tego zeszytu „Biotechnologii”.

W celu zaprezentowania *strategii antysensowych oligonukleotydów* należy wyjaśnić, że antysensowe oligonukleotydy stanowią 12 – 30-merowe fragmenty DNA bądź ich analogi. Z obliczeń statystycznych wynika, że wybrana kombinacja dwunastu nukleotydów może występować w mRNA tylko jeden raz. Komplementarna zatem (wg Watsona i Cricka) sonda oligonukleotydowa zawierająca 12 nukleozasad rozpoznaje wybrany segment RNA ze stuprocentowym prawdopodobieństwem. Parowanie zasad na odcinku krótszym niż 12-merowy w warunkach fizjologicznych powinno być nieskuteczne ze względów energetycznych (zob. M. Boczkowska i P. Guga), jakkolwiek ostatnie doniesienia wskazują na hamowanie ekspresji przez 8-merowe antysensowe oligonukleotydy (6). O ile zatem do komórki zostaną wprowadzone (za pomocą np. mikroiniekcji, bądź przetransportowane wg mechanizmów przedstawionych przez J. Łaskiego) oligonukleotydy o sekwencji komplementarnej do wybranych fragmentów RNA, utworzone heterodupleksy stanowią barierę dla biosyntezy białek wytwarzanych na matrycy mRNA, którego fragmenty uległy asocjacji z egzogennymi oligonukleotydami. Wybór sekwencji mRNA nie może być przypadkowy; im bardziej przewidywalna jest struktura II-rzędowa docelowego RNA, tym bardziej ułatwiony jest wybór atakowanej sekwencji na podstawie przesłanek termodynamicznych. Ogólne zasady wyboru atakowanej sekwencji przebiegają zgodnie z założeniem, że cząsteczka antysensowego oligonukleotydu będzie:

- 1) asocjowała do pre-mRNA, zaburzając jego „składanie” (ang. *editing*),
- 2) hybrydyzowała z mRNA w jądrze komórkowym uniemożliwiając translokację do cytoplazmy,
- 3) hybrydyzowała z cytoplazmatycznym mRNA blokując fizycznie dostęp do rybosomu,
- 4) tworzyła heterodupleks rozpoznawany i atakowany przez RNazę H.

Na podstawie wielu doniesień literaturowych można uznać za udokumentowany proces degradacji niektórych heterodupleksów przez obecną w każdej żywej komórce rybonukleazę H, odpowiedzialną m.in. za degradację „zużytego mRNA”. Czynnikiem promującym egzogenne oligonukleotydy jako sondy antysensowe dla mRNA jest, zdaniem wielu autorów, podatność tworzonych przez nie heterodupleksów z mRNA na działanie RNazy H, jakkolwiek pogląd ten jest przedmiotem kontrowersji (7); jednym z kontrargumentów może być to, że antysensowe oligo(nukleozydometanofosfoniany) są w wielu przypadkach skutecznymi inhibitorami biosyntezy wybranych białek, mimo że heterodupleksy oligo(nukleozydometanofosfonian)/mRNA nie są substratami dla RNazy H.

Innym warunkiem jest trwałość antysensowego oligonukleotydu, determinowana głównie odpornością na działanie nukleaz (zob. M. Koziołkiewicz). Komórkowe endo- i egzozonukleazy powodują bowiem szybką degradację „obcego”

DNA, przy czym szczególnie aktywne są 3'-egzonukleazy. Aby spełniony był wymóg odporności na nukleazy, antysensowe oligonukleotydy muszą zawierać elementy struktury tak zmodyfikowane w stosunku do natywnego DNA, aby nie podlegały procesom degradacji. Stopień modyfikacji struktury antysensowego oligonukleotydu jest ograniczany koniecznością spełnienia przezeń siedmiu wymienionych warunków, rozpoczynając od zachowania właściwości jego rozpuszczalności w mediach fizjologicznych (woda, pH~7,0). Spełniając zasadę minimalnych zmian strukturalnych w stosunku do naturalnych oligonukleotydów najbardziej bezpieczną wydawała się modyfikacja otoczenia atomu fosforu w pozycjach niemostrkowych (ang. *non-bridging oxygen atoms*). Z tego powodu zamiana jednego z dwóch atomów tlenu na atom chalcogenowca (siarka, selen) wydawała się najbardziej atrakcyjna (8).

Oligo(nukleozydotiofosforany) (Oligo-S) stanowiły pierwszą generację antysensowych struktur będących izosterycznymi i izoelektronowymi analogami naturalnych oligonukleotydów. Poli(nukleozydotiofosforany), znane od początku lat siedemdziesiątych dzięki pracom Ecksteina i wytworzone jako produkty reakcji polimerazy z  $\alpha$ -tiotrifosforanami nukleozydów (9), są podobnie jak naturalne kwasy nukleinowe polielektrolitami o porównywalnej rozpuszczalności w mediach fizjologicznych, stosunkowo odporne na działanie nukleaz. Ich pierwsza chemiczna synteza została przeprowadzona w 1984 r. (8), zaś pierwsze próby ich wykorzystania w strategii antysensowych oligonukleotydów datują się od 1987 r. (10). Ich ujemną cechą jest polidiastereomeryzm, gdyż każdy atom fosforu internukleotydogo ugrupowania tiofosforanowego stanowi centrum asymetrii, a zatem niestereospetyczna synteza, niezależnie od zastosowanej metody (zob. A. Okruszek) musi prowadzić do mieszaniny  $2^n$  diastereomerów, gdzie  $n$  równa się liczbie modyfikowanych wiązań internukleotydogo. Co więcej, wskutek częściowej stereoselekcji procesów zawiązywania internukleotydogo wiązania tiofosforanowego, skład mieszaniny  $2^n$  diastereomerów nie jest statystyczny. Niezależnie od stopnia restrykcyjności wymogów prawnych, określających proces rejestrowania nowego leku, dotyczących jednorodności struktury, składu enancjo- i/lub diastereomerycznego, nie bez znaczenia może okazać się, że populacje diastereomerów o tym samym sensie chiralności atomów fosforu mogą być obdarzone pożądaną aktywnością inhibitorową w stopniu znacznie wyższym od randomalnej mieszaniny diastereomerów. Opracowana ostatnio „metoda oksatiafosfolanowa” pozwala na przeprowadzenie syntezy „stereoregularnych” Oligo-S (11). Oligo(nukleozydoseleniofosforany) (Oligo-Se) są obarczone podobnymi wadami jak Oligo-S, ale o ich nieprzydatności w stosunku do realizacji strategii antysensowych oligonukleotydów zadecydowała ich wysoka cytotoksyczność (12).

Mimo wspomnianych wad, Oligo-S, jak dotychczas, są najczęściej wykorzystywaną klasą antysensowych związków oligonukleotydogo zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*.

Klasą związków nieobciążonych zjawiskiem polidiastereomerii są oligo(nukleozydoditiofosforany) (Oligo-S<sub>2</sub>), w których obydwie niemostrkowe atomy tlenu internukleotydogo funkcji fosforanowej są zastąpione przez atomy

siarki. Oligo-S<sub>2</sub> obdarzone są właściwościami podobnymi jak naturalne oligonukleotydy, wykazując jednak pełną odporność na degradacyjne działanie naturalnych nukleaz. Ze względu na ciągle ograniczoną dostępność liczba prac wskazujących na ich wykorzystanie dla celów realizacji *strategii antysensowych oligonukleotydów* jest niewielka (13). Należy podkreślić, że zarówno Oligo-S, jak i Oligo-S<sub>2</sub>, tworzą z mRNA trwałe duplekisy rozpoznawane i degradowane przez RNazę H.

Innym, historycznie wcześniejszym podejściem do modyfikacji szkieletu fosfodiesterowego, jest zamiana atomu tlenu na element struktury pozbawiający oligonukleotyd ładunku. Takim elementem struktury jest grupa alkilowa bądź arylowa, co w rezultacie prowadzi do otrzymania oligo(nukleozydoalkaniofosfonianów), bądź w przypadku grup alkoksylowych — do otrzymywania DNA-triestrów. Pionierskie prace Ts'o i Millera zmierzające do syntezy Oligo-Me i DNA-triestrów doprowadziły do wypromowania oligo(nukleozydometanofosfonianów) jako drugiej, po Oligo-S, grupy związków szeroko wykorzystywanych w *strategii antysensowych oligonukleotydów* (14).

Cechą odróżniającą Oligo-Me i DNA-triestry od Oligo-S i Oligo-S<sub>2</sub> jest ich elektryczna obojętność — konstrukty te są pozbawione ładunku i nie są polielektrolitami. Cechą wspólną Oligo-Me z Oligo-S jest ich polidiastereomeryzm. Wyższość stereoregularnych (o konfiguracji „all-R<sub>p</sub>”) oligotymidylo-Me nad mieszaniną ich diastereomerów bądź oligotymidylo-Me o konfiguracji „all-S<sub>p</sub>” wykazane zostały we wczesnych pracach Leśnikowskiego i współ. Prowadzone badania opierały się na pomiarze wartości temperatur mięknienia heterodupleksów tworzonych przez te konstrukty z kwasem pentadekaadenylowym (15). Zaletą tej klasy modyfikowanych oligonukleotydów jest ułatwiony transport do- i wewnątrzkomórkowy, oraz pełna odporność na działanie enzymów nukleolitycznych, zaś cechą obciążającą jest wysoka lipofilowość i ograniczona rozpuszczalność w mediach fizjologicznych, a także wspomniany już brak zdolności substratowej heterodupleksów Oligo-Me/mRNA w stosunku do RNazy H. Molekularny mechanizm ich działania nie jest znany jakkolwiek odnotowano szereg przypadków inhibicji procesów biosyntezy białka przez Oligo-Me zastosowane w układach komórkowych.

Ostatnio pojawiły się prace, w których grupa metylowa w Oligo-Me jest zastąpiona resztą hydroksymetylową (16) lub aminometylową (17). Intencją tych modyfikacji jest podwyższenie hydrofilowości oraz wprowadzenie do antysensowego konstruktów grup funkcyjnych zdolnych do tworzenia wiązań kowalencyjnych z cząsteczkami innych związków, poprawiających właściwości np. transportu dokońrkowego.

Kolejnym podejściem do modyfikacji szkieletu fosforanowego jest zastąpienie jednego z niemostrkowych atomów tlenu przez grupy kationoidowe, tj. obarczone ładunkiem dodatnim. Cząsteczki o ładunku dodatnim były często wykorzystywane do podwyższenia zdolności transportu wytwarzanych koniugatów do wnętrza komórki. Tak na przykład transferyna była skoniugowana z protaminą bądź polilizyną w celu podwyższenia transportu białek, zaś kationowe lipidy służyły do celów wprowadzania DNA do jądra komórek zwię-

rzęcych. Wcześniej stwierdzono, że transport białek i peptydów, takich jak albumina i enkefalina przez barierę krew-mózg był ułatwiony poprzez skoniugowanie tych związków z kationoidową cząsteczką heksametylenodiaminy, podczas gdy koniugacja takich leków jak metotreksat i daunomycyna z polilizyną poprawiała ich transport i efektywność działania. Koniugaty polilizyny z oligonukleotydami komplementarnymi do wybranych sekwencji mRNA VSV i HIV były bardziej efektywne niż ich niemodyfikowane odpowiedniki. Kationowe grupy przyłączone do funkcji fosforanowej za pomocą wiązania amidofosforanowego były opisane przez Letsingera (zob. K. Misiura). Należy podkreślić, że oligo(nukleozydoamidofosforany) (17) są zarówno obciążone cechą polidiastereomeryzmu oraz nie podlegają degradacji enzymatycznej (18). Inne rodzaje modyfikacji zostały przedstawione w kolejnych opracowaniach. Uwadze czytelnika polecam artykuł L. Woźniak, w którym przedstawiono mechanizm „niszczenia” wybranego RNA za pomocą rybozymów; jakkolwiek mechanizm degradacji RNA jako matrycy biosyntezy białka jest spowodowany katalityczną aktywnością rybozymu, rozpoznawanie jego sekwencji jest także konsekwencją antysensowego rozpoznawania miejsca hybrydyzacji rybozymu do RNA.

Ze względów historycznych, a także w wyniku nagromadzonej wiedzy na temat działania antysensowych Oligo-S, zarówno w tym, jak i w kolejnych opracowaniach, najwięcej uwagi poświęcono tej klasie modyfikowanych oligonukleotydów. W tabelach zestawiono przykłady, w których właśnie te konstrukty wykorzystywano w badaniach *in vivo* hamowania biosyntezy białek (tab. 1), jak i w pierwszych fazach prób klinicznych (tab. 2).

Wykazano, że interesującą z punktu widzenia strategii antysensowych oligonukleotydów cechą Oligo-S jest ich korzystna farmakokinetyka i brak toksyczności (19,20). Półokres rozpadu ( $t_{1/2}$ ) 27-merowego Oligo-S w surowicy myszy, przy podawaniu dożylnym, wynosił od 40 do 70 godzin, przy czym akumulację preparatów Oligo-S obserwowano w wątrobie i w nerkach, gdzie stężenie kilkakrotnie przewyższało stężenie w surowicy. Przeprowadzenie tych badań było możliwe dzięki zastosowaniu [ $^{35}$ S]Oligo-S (21). Interesujące okazało się to, że: 1) stopień degradacji metabolitów Oligo-S w moczu był niewielki, 2) obecność Oligo-S w mózgu myszy, które traktowano tymi preparatami, świadczą o przenikaniu Oligo-S przez barierę krew-mózg. Istotny jest też wynik podawania na przestrzeni 12-30 dni gramowych ilości Oligo-S myszom bądź małpom, u których nie stwierdzono toksycznego działania tych preparatów. Za ważny należy uznać opisany w literaturze przypadek pierwszego dożylnego podawania antysensowych Oligo-S pacjentowi (hamowanie biosyntezy białka p53) w dawce 0,05 mg/kg wagi ciała/godz. w łącznej ilości 700 mg, co okazało się dawką bezpieczną.

Ocena terapeutycznej wartości antysensowych Oligo-S, a także innych konstruktywów będzie przedmiotem badań wielu zespołów przez kilka kolejnych lat, i to w przypadkach chorób wirusowych, nowotworowych, pasożytniczych, chorób będących konsekwencją nadciśnienia czy angioplastii. Uzyskane podczas przeprowadzonych badań wyniki będą oceniane przez lekarzy, którzy ostatecznie zadecydują o skuteczności tych nowych form terapii. W mojej

TABELA 1  
 WYBRANE DONIESIENIA LITERATUROWE O „ANTYSENSOWEJ” AKTYWNOŚCI  
 TIOFOSFORANOWYCH ANALOGÓW OLIGONUKLEOTYDÓW (Oligo-S) W WARUNKACH *in vitro*

Potencjalne zastosowanie w terapii	Docelowy gen	Model zwierzęcy; sposób podawania oligonukleotydów
restenoza	c-myb	tętnica szyjna szczura; żel pluronowy <sup>1</sup>
	cdc2 i PCNA	tętnica szyjna szczura; liposomy <sup>2</sup>
	c-myc	tętnica wieńcowa świni; angioplastyka <sup>3</sup>
	cdc2 i cdk2	tętnica szyjna szczura; żel pluronowy <sup>4</sup>
	cdk2	tętnica szyjna szczura; liposomy <sup>5</sup>
	PCNA	tętnica szyjna szczura; żel pluronowy <sup>6</sup>
białaczka	c-myb	SCID-myszy zainfekowane linią ludzkich komórek K526; podskórnice, pompa osmotyczna <sup>7</sup>
	bcr-abl	SCID-myszy zainfekowane linią BV 173; dożylnie <sup>8</sup>
chłoniak	BCL-2	SCID-myszy zainfekowane ludzkimi komórkami DoHH2; podskórnice, pompa osmotyczna <sup>9</sup>
rak okrężnicy	PKA/RJα	Nude myszy z rosnącymi ludzkimi komórkami LS174T; podskórnice, pompa osmotyczna <sup>10</sup>
czerniak złośliwy	c-myb	SCID-myszy z ludzkimi komórkami Hs 294T; podskórnice, pompa osmotyczna <sup>11</sup>
	NF-κB/p65	Nude myszy z wszczepionymi ludzkimi komórkami B-16; podskórnice lub pompa osmotyczna <sup>12</sup>
	p120	Nude myszy z wszczepionymi komórkami ludzkimi Lox; dootrzewnowo <sup>13</sup>
włókniakomięsak	NF-κB/p65	myszy transformowane wirusem HTLV-1-Tax; iniekcje dootrzewnowe <sup>14</sup>
		Nude myszy transformowane ludzką linią komórkową K-BALB; iniekcje podskórne bądź pompa osmotyczna <sup>15</sup>
nadciśnienie tętnicze	gen angiotensyny II	szczury z wywołanym nadciśnieniem; wstrzyknięcia dokomorowe <sup>16</sup>
	c-fos	szczury po podaniu amfetaminy; iniekcje <sup>17</sup>
zakłócenie funkcjonowania neuronów	c-fos	szczury po potraktowaniu amfetaminą i apomorfiną; iniekcje <sup>18</sup>
	gen kinezynowy	króliki; iniekcje dokomorowe <sup>19</sup>
zawał spowodowany niedokrwieniem	gen receptora N-metylo-D-asparagianu	szczury z wywołanym nadciśnieniem; iniekcje dokomorowe <sup>20</sup>
wzrost aksonów	SNAP-25	embriony kurze; mikroiniekcje <sup>21</sup>
choroby psychiczne	gen receptora D <sub>2</sub> -dopaminy	myszy po potraktowaniu 6-hydroksydopaminą; iniekcje dokomorowe <sup>22</sup>
zaburzenia pamięci	gen endyminy	złote rybki; iniekcje <sup>23</sup>
żółtaczka	wirus żółtaczki typu B	kaczki pekińskie; iniekcje dożylnie <sup>24</sup>
zmiany behawioralne	gen angiotensyny I	szczury; iniekcje dokomorowe <sup>25</sup>
regulacja ciśnienia krwi	c-fos	szczury; iniekcje <sup>26</sup>
indukowanie moczówki prostej	gen wazopresyny	szczury; iniekcje dokomorowe <sup>27</sup>

- 1 Simmons M., et al., (1992), Nature, 359, 67 – 70.
- 2 Morishita R., et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 8474 – 8478.
- 3 Shi Y., et al., (1994), Circulation, in press.
- 4 Abe J.-I., et al., (1994), Biochem. Biophys. Res. Comm., 198, 16 – 24.
- 5 Morishita R., et al., (1994), J. Clin. Invest., 93, 1458 – 1464.
- 6 Simmons M., et al., (1994), J. Clin. Invest., 93, 2351 – 2356.
- 7 Ratajczyk M. Z., et al., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 11823 – 11827.
- 8 Skórski T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., in press.
- 9 Pocock C., et al., (1993), American Society of Hematology Meeting, abstract no. 784.
- 10 Cho-Chung Y. S., unpublished results.
- 11 Hijjya N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., in press.
- 12 Higgins K. A., et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 9901 – 9905.
- 13 Perlakey L., et al., (1993), Anti Cancer Drug Design, 8, 3 – 14.
- 14 Kitajima I., et al., (1992), Science, 258, 1792-1795.
- 15 Higgins K. A., et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 9901 – 9905.
- 16 Gyurko R., et al., (1993), Regulatory Peptides, 49, 167 – 174.
- 17 Heilig M., et al., (1993), European J. Pharmacol., 236, 339 – 340.
- 18 Dragunow M., et al., (1993), NeuroReport, 5, 305-306.
- 19 Armaratunga A. J., (1993), J. Biol. Chem., 268, 17427 – 17430.
- 20 Wahlestedt C., et al., (1993), Nature, 363, 260 – 263.
- 21 Osen-Sand A., et al., (1993), Nature, 364, 445 – 448.
- 22 Weiss B., et al., (1993), Neuroscience, 55, 607 – 612.
- 23 Schlingensiepen K.-H., unpublished results.
- 24 Offensperger W.-B., et al., (1993), EMBO Journal, 12, 1257 – 1262.
- 25 Safai R. R., et al., (1994), J. Neurochem., 62, 2053 – 2056.
- 26 Suzuki S., et al., (1994), Am. Physiol. Soc., 1418 – 1422.
- 27 Skutella T., et al., (1994), J. Neuroendocrinology, 6, 121 – 125.

TABELA 2

STAN BADAŃ KLINICZNYCH Z ZASTOSOWANIEM Oligo-S WG STRATEGII ANTYSENSOWEGO mRNA\*

Choroba; sposób podawania oligonukleotydu	Transkrypt RNA genu	Instytucja prowadząca badania	Stan badań klinicznych
ostra białaczka pochodzenia szpikowego; wlewy dożylnie o zasięgu ogólnoustrojowym	p53	University of Nebraska Medical Center/Lynx Therapeutics	zakończona faza I
ostra białaczka pochodzenia szpikowego; terapia szpiku kostnego w warunkach <i>ex vivo</i>	p53	ju.	zakończona faza I
przewlekła białaczka pochodzenia szpikowego; terapia szpiku kostnego w warunkach <i>ex vivo</i>	c-myb	University of Pennsylvania/Hammersmith Hospital, London/Lynx Therapeutics	faza I
przewlekła białaczka pochodzenia szpikowego; wlewy dożylnie o zasięgu ogólnoustrojowym	c-myb	University of Pennsylvania/Lynx Therapeutics	faza I
brodawczaki; iniekcje miejscowe	Human Papiloma Virus	ISIS Pharmaceuticals	faza II
zapalenie siatkówki związane z AIDS; iniekcje śródoczne	Cytomegalowirus	ju.	zakończone fazy I i II
AIDS; wlewy dożylnie o zasięgu ogólnoustrojowym	HIV	University of Alabama/Hybridon Inc.	faza II

\* Wojciech J. Stec — informacje prywatne.



ocenie, w najbliższych kilku latach, równoległe z poznawaniem etiologii i genetycznych konsekwencji (bądź podłoża) wielu chorób na poziomie molekularnym, będą podejmowane kolejne próby wykorzystania strategii antysensowych oligonukleotydów do zwalczania szeregu innych, dotychczas nieuleczalnych bądź lekoodpornych schorzeń.

Intencją moją w tym artykule jest zwrócenie uwagi polskiego środowiska naukowego na tę fascynującą i obiecującą strategię ochrony naszego zdrowia, oraz zapewnienia komfortu naszego życia. Chcę jednocześnie dać wyraz pogładowi, że jako chemik oceniam tę strategię jako potencjalną, gdyż Natura wielokrotnie upokorzyła Człowieka wskazując stopień komplikacji procesu nazywanego Życiem, i wykazała jego arogancję oraz ignorancję. Nie należy bowiem zapominać, że idealistyczny model asocjacji antysensowego oligonukleotydu do wybranego fragmentu mRNA nie uwzględnia, a wręcz z założenia eliminuje, możliwość oddziaływań antysensowego konstruktów z komponentami białkowymi, obecnymi w przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Przykłady takich oddziaływań są znane (22), zaś w przypadku Oligo-S mechanizm działania jest podważany ze wskazaniem na racjonalną komponentę specyficzności oraz dotychczas nie wyjaśnioną komponentę niespecyficzności (23). Jednakże niezależnie od ostatecznego skutku, badania w obszarze *strategii antysensowych oligonukleotydów* wzbogacają naszą wiedzę w zakresie biologii doświadczalnej w sposób rewolucyjny, o czym świadczą już nie setki, ale tysiące publikacji. Drugim celem tego opracowania jest pobudzenie wyobraźni i uświadomienie, jak multidyscyplinowa jest batalia o wypracowanie nowych strategii terapeutycznych, stwarzając pole do działania genetyków i biologów molekularnych, biofizyków, chemików zajmujących się syntezą, strukturą i termodynamiką oddziaływań biomolekuł, farmakologów, immunologów, i oczywiście lekarzy.

Drugorzędnym celem, choć wartym podkreślenia, jest udział polskich zespołów w narodzinach i rozwoju *strategii antysensowych oligonukleotydów*. Obok pionierskich syntez Oligo-S (8) oraz dopracowania technologii ich wytwarzania w skali zabezpieczającej fazę B+R (24), wymienionych w tym opracowaniu, należy dostrzegać i pamiętać nazwiska D. Jaskulskiego (25), C. Szczylika (26), M. Ratajczaka (27), T. Skórskiego (28), M. Nieborowskiej-Skórskiej (29), którzy w sposób bezpośredni i zasadniczy, pracując w ośrodku filadelfijskim (USA), przyczynili się do rozwoju *Antisense mRNA Strategy*.

Prowadzone od ponad dziesięciu lat prace w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMiM w zakresie syntezy analogów oligonukleotydów, badania ich właściwości fizykochemicznych oraz oddziaływań z wybranymi białkami byłyby niemożliwe bez udziału, zaangażowania i entuzjazmu wielu moich współpracowników; nazwiska tylko niektórych widnieją w bibliografii tego numeru „Biotechnologii”. Im, a także wielu anonimowym Koleżankom i Kolegom, składam wyrazy uznania i podziękowanie.

W ostatnich trzech latach badania były finansowane przez KBN, zarówno w zakresie działalności statutowej CBMiM, jak i poprzez uzyskane granty KBN: nr 6 6286 92 03, nr 6 P203 007 05, nr 6 6287 92 03.

## Literatura

1. Capecchi M., (1989), *Trends Genet.*, 5, 70.
2. Waldman A. S., (1992), *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 12, 49.
3. Thuong N.T., Helene H., (1993), *Angew. Chem. Int. Engl.*, 32, 666.
4. Zon G., (1988), *Pharm. Res.*, 5(9), 539; Stein C.A., Cohen J. S., (1988), *Cancer Research*, 48, 2659; Calabretta B., (1991), *Cancer Research*, 51, 4505.
5. *Discoveries in Antisense Nucleic Acids*, (1989), Ed. Brakel Ch. L., Portfolio Publishing Company, Houston; *Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expressions*, (1989), Ed. Cohen J. S., CRC Press, Boca Raton FL; *Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS*, (1991), Ed. Wickstrom E., Wiley-Liss, New York NY; *Antisense Research and Applications*, (1993), Eds. Crook S.T., Lebleu B., CRC Press, Boca Raton FL.
6. Fakler B., Herlitz S., Amthors B., Zenner H.-P., Ruppertsberg J.-P., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 16187.
7. Rosolen A., Kyle E., Chavany C., Bergan R., Kalman E.T., Crouch R., Neckers L., (1993), *Biochemie*, 75, 79.
8. Stec W.J., Zon G., Egan W., Stec B., (1984), *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 6077; Stec W. J., Zon G., Uznański B., (1985), *J. Chromatogr.*, 326, 263; Koziolkiewicz M., Uznański B., Stec W. J., Zon G., (1986), *Chemica Scripta*, 26, 251; Zon G., Stec W. J., (1991), in: *Oligonucleotides and Analogues*; in: *A Practical Approach*, Ed. Eckstein F., IRL Press, Oxford, 87.
9. Eckstein F., Gindl H., (1970), *Eur. J. Biochem.*, 13, 558; Eckstein F., Armstrong W., Sternbach H., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2987; Kunkel T. A., Eckstein F., Mildvan A. S., Koplitz R. M., Loeb L., (1981), *IBID*, 78, 6734; Latimer L. J. P., Hampel K., Lee J. S., (1989), *Nucleic Acids Res.*, 17, 1549.
10. Matsukura M., Shinozuka K., Zon G., Mitsuya H., Reitz M., Cohen J. S., Broder S., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7706; Matsukura M., Zon G., Shinozuka K., Robert-Guroff M., Shimada T., Stein C. A., Mitsuya H., Wong-Staal F., Cohen J. S., Broder S., (1989), *IBID*, 86, 4244; Agrawal S., Goodchild J., Civeira M. P., Thornton A. H., Sarin P. S., Zamecnik P. C., (1988), *IBID*, 85, 7079; Agrawal S., Ikeuchi T., Sun D., Sarin P. S., Konopka A., Maizel J., Zamecnik P. C., (1989), *IBID*, 86, 7790.
11. Stec W. J., Grajkowski A., Koziolkiewicz M., Uznański B., (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19, 5883; Stec W.J., Wilk A., (1994), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33, 709.
12. Stein C. A., Mori K., Boiziau C., Cazenave C., Matsukura M., Subasinghe C., Cohen J.S., Broder S., Toulme J. J., (1989), *Nucleic Acid Res.*, 17(20), 8207.
13. Marshall M. S., Caruthers M. H., (1993), *Science*, 259, 1564.
14. Miller P.S., (1991), *Biotechnology*, 9, 358.
15. Leśnikowski Z. J., Jaworska M., Stec W. J., (1990), *Nucleic Acids Research*, 18(8), 2109.
16. Leśnikowski Z.J., (1993), *Bioorganic Chem.*, 22, 128 - 139.
17. Fathi R., Huang Q., Syi J.-I., Delaney W., Cook A. F., (1994), *Bioconjugate Chem.*, 5, 47.
18. Gryaznov S., Chen J.-K., (1994), *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 3143.
19. Iversen P., (1993), Chapter 26, in: *Antisense Research and Applications*, Eds. Crooke S.T., Lebleu B., CRC Press, 462-469.
20. Crook R.M., (1993), Chapter 27, in: *Antisense Research and Applications*, Eds. Crooke S.T., Lebleu B., CRC Press, 472-492.
21. Stein C.A., Iversen P. L., Subasinghe C., Cohen J. S., Stec W.J., Zon G., (1990), *Analytical Biochemistry*, 188, 11.
22. Majumdar C., Stein C.A., Cohen J. S., Broder S., Wilson S. H., (1989), *Biochemistry*, 28, 1340; Bielińska A., Shivdasani R. A., Zhang L., Nabel G. J., (1990), *Science*, 250, 997.

23. Boiziau C., Moreau S., Toulme J.-J., (1994), FEBS Letters, 340, 236.
24. Stec W.J., Uznański B., Wilk A., Hirschbein B.L., Fearon K. L., Bergot B.J., (1993), Tetrahedron Lett., 34, 5317; United States Patent, No 5, 151, 510 udzieleny 29.09.1992 r.
25. Calabretta B., Jaskulski D., Driel J. K., Mercer W.E., Baserga R., (1988), Science, 240, 1544.
26. Szczylik C., Skórski T., Nicolaidis N. C., Manzella L., Malaguarnera L., Venturelli D., Gewirtz A.M., Calabretta B., (1991), Science, 253, 562.
27. Ratajczak M.Z., Kant J.A., Luger S. M., Hijiya N., Zhang J., Zon G., Gewirtz A.M., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 11823.
28. Skórski T., Nieborowska-Skórska M., Nicolaidis N.C., Szczylik C., Iversen P., Iozzo R.V., Zon G., Calabretta B., (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 4504.
29. Skórski T., Kanakaraj P., Nieborowska-Skórska M., Ratajczak M. Z., Szczylik C., Arlinghaus R.B., Gewirtz A.M., Perussia B., Calabretta B., (1993), J. Exp. Med., 178, 1923.

*Adres dla korespondencji:*

Wojciech J. Stec, Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Sienkiewicza 112, Łódź.