

KAMILA BĄKOWSKA-ŻYWICKA, AGATA TYCZEWSKA, TOMASZ TWARDOWSKI

Choroby cywilizacyjne – terapeutyczne zastosowania strategii antysensu

Wprowadzenie i aspekty ogólne

Jednym z największych osiągnięć medycyny XX w. były antybiotyki. Bez żadnej przesady można uznać tę grupę leków za cudowne *panaceum*. Jednakże współcześnie wiemy o kilku zasadniczych ograniczeniach w stosowaniu antybiotyków. Po pierwsze, **oporność** na kolejne, coraz lepsze generacje leków. Po drugie – antybiotyki to leki usuwające (leczące) skutki, a nie przyczyny. Korzystniejsze społecznie i ekonomicznie jest usuwanie „źródeł” choroby.

W ciągu ostatniego wieku w gospodarce, a co za tym idzie – w środowisku naturalnym zaszły ogromne zmiany. Rozwój przemysłu, degradacja środowiska oraz specyficzny tryb życia mieszkańców wielkich aglomeracji przyniosły negatywne rezultaty w postaci chorób cywilizacyjnych, które pochłaniają codziennie tysiące istnień. Należą do nich nowotwory, choroby układu krążenia, alergie i inne. Jednocześnie przedłużenie życia spowodowało dramatyczny rozwój chorób związanych ze starzeniem się społeczeństwa. A to właśnie **jakość** życia ma ścisły związek z rozwojem chorób cywilizacyjnych, w ślad za tym następuje konieczność poszukiwania nowych preparatów farmaceutycznych.

Możemy nakreślić bardzo umownie schemat rozwoju różnych generacji leków:

- 1) Leki naturalne – są to preparaty występujące w przyrodzie, zazwyczaj znane od dawna, a współcześnie często syntetyzowane chemicznie. Doskonałym przykładem takiego preparatu jest kwas sulfosalicylowy, powszechnie znany na świecie jako aspiryna, a w Polsce – polopiryna.
- 2) Leki występujące w środowisku, których otrzymanie wymaga stosowania nowoczesnych technologii. Przykładem doskonałym są właśnie antybiotyki, które produkowane są na dużą skalę w biofermentorach i modyfikowane metodami enzymatycznymi.
- 3) Leki opracowywane na podstawie znajomości struktury molekularnej czynnika odpowiedzialnego za chorobę; najlepszym przykładem ilustrującym ten przypadek są nowoczesne szczepionki monoklonalne.

- 4) Preparaty dostosowane do genomu indywidualnego pacjenta lub organizmu chorobotwórczego. Jest to istotne, wręcz zasadnicze, w odniesieniu do chorób uwarunkowanych genetycznie. Taka strategia stała się możliwa dopiero po poznaniu struktury genomu człowieka czy też organizmów chorobotwórczych.

Oczywiście, dopiero te dwie ostatnie strategie prowadzą do profilaktyki, a zatem do zapobiegania przyczynom chorób, a nie usuwania ich skutków.

Cykl życiowy komórek podlega złożonej regulacji, w której bierze udział wiele białek odpowiedzialnych za przekazywanie sygnałów zewnątrzkomórkowych do wnętrza komórek i ich jądra. Informacja genetyczna zakodowana w około 30 000 genach w ludzkim genomie jest przepisywana w procesie transkrypcji na około 85 000 różnych cząsteczek mRNA. Sekwencja zasad w mRNA służy do syntezy białek w procesie translacji. Tradycyjne farmaceutyki (związki niskocząsteczkowe) zwykle oddziałują bezpośrednio z białkiem odpowiedzialnym za powstanie określonej choroby. Leki antysensowe nowej generacji są komponowane tak, aby oddziaływać z mRNA lub genem kodującym dane białko. Zsekwencjonowanie ludzkiego genomu w Projekcie HUGO (Projekt poznania ludzkiego genomu, ang. *Human Genome Project*), czy też genomów bakteryjnych i wirusowych, zaowocowało istnieniem nieocenionego źródła dla projektowania leków antysensowych bez potrzeby kompleksowych i długotrwałych analiz struktury docelowego białka, co jest niezbędne w konwencjonalnych metodach leczenia.

Antysensowe oligonukleotydy (ASO) są to krótkie, jednoniciowe fragmenty kwasów nukleinowych, wiążące się do DNA lub RNA, względnie białka, na zasadzie hybrydyzacji z wykorzystaniem wiązań wodorowych [1]. ASO są projektowane tak, aby oddziaływały z sekwencją docelową w sposób specyficzny sekwencyjnie. ASO są komplementarne do sekwencji sensowej DNA lub RNA, właśnie dlatego przyjęto nazywać je „antysensowymi oligonukleotydami”. Hybrydyzacja ASO do właściwego fragmentu DNA lub mRNA może powodować zahamowanie procesu replikacji, transkrypcji lub translacji.

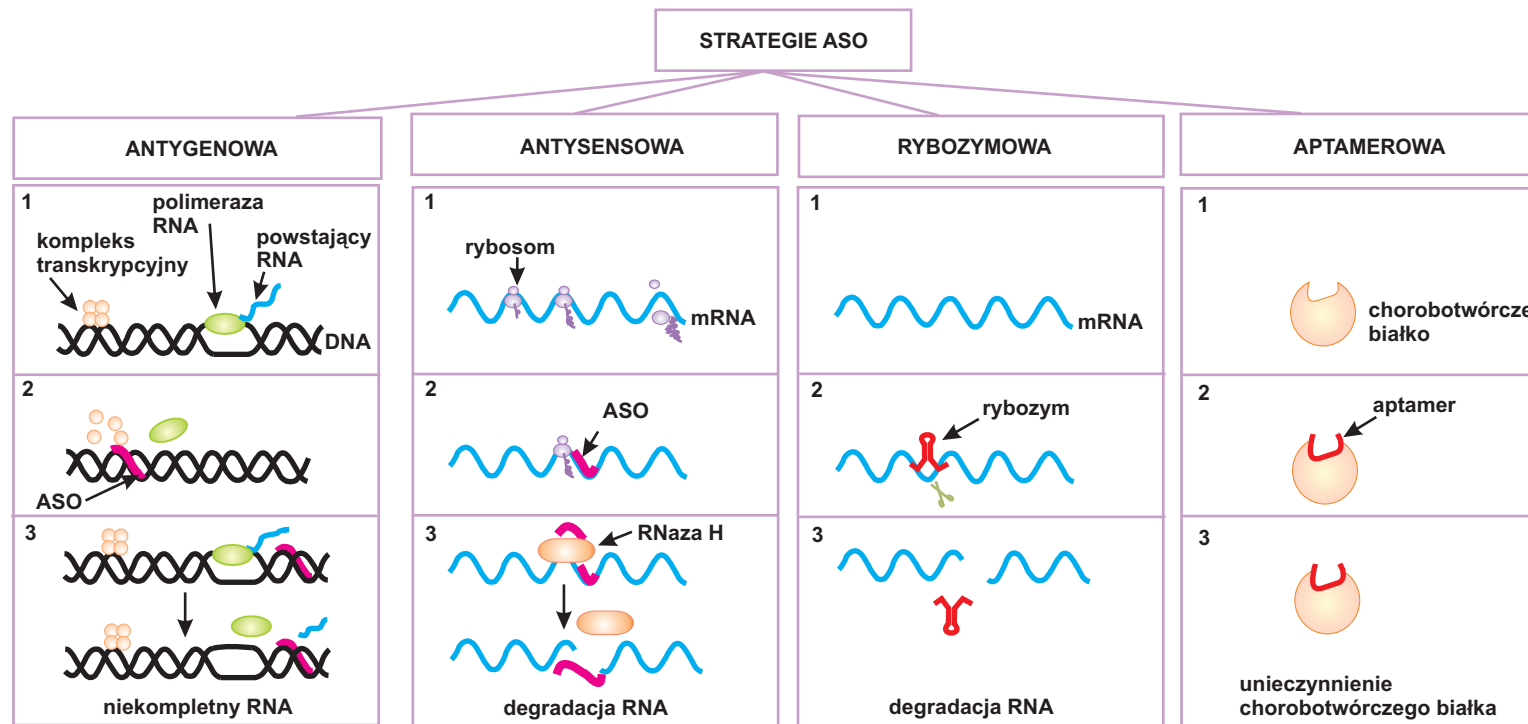
W 1977 r. Paterson, Roberts i Kuff po raz pierwszy opublikowali wyniki obserwacji, z których wynikało, że ekspresja genu (transkrypcja i synteza białka) może ulec zahamowaniu za pomocą egzogenego fragmentu jednoniciowego DNA komplementarnego do sekwencji mRNA [2]. Rok później Paul Zamecnik i Mary Stephenson, dodając do hodowli kurzych fibroblastów zainfekowanych wirusem mięsaka Rousa, 13-nukleotydowy fragment DNA komplementarny do RNA wirusa, uzyskali zahamowanie powstawania nowych cząsteczek wirusa i transformacji nowotworowej komórek kurzych [3]. Były to pierwsze dane świadczące o możliwości zahamowania syntezy białek za pomocą egzogenych syntetycznych oligonukleotydów o specyficznej sekwencji. Nieoceniony jest również udział polskich zespołów w narodzinach i rozwoju strategii antysensowych oligonukleotydów [4]. Obok pionierskich syntez modyfikowanych oligonukleotydów oraz dopracowania technologii ich wykorzystania, od wielu lat w grupie Steca trwają badania

w zakresie syntezy analogów oligonukleotydów [5-7], właściwości fizykochemicznych [8-10] oraz oddziaływania z wybranymi białkami [11]. W chemicznej syntezie fragmentów RNA i DNA zasłynęły również zespoły badawcze Kraszewskiego [12-16] i Markiewicza [17-19]. Należy także zwrócić uwagę na prace Jaskulskiego [20], Szczylika [21], Ratajczaka [22], Skórskiego [23] i Nieborowskiej-Skórskiej [24], którzy w bezpośredni i zasadniczy sposób przyczynili się do rozwoju strategii antygenowej. W naszej pracowni stosujemy strategię antysensu do analizy mechanizmów regulatorowych biosyntezy białek w układzie roślinnym [25-27].

Mechanizm działania ASO

Zastosowanie oligonukleotydów oparte jest na zrozumieniu mechanizmu biosyntezy białka, począwszy od regulacji, przez transkrypcję i translację, aż do potranslacyjnej modyfikacji białek i blokowania funkcji. W zależności od realizowanej koncepcji badawczej, czy też terapeutycznej, poszczególne drogi postępowania określone są różnymi terminami (ryc. 1):

- 1) **Strategia antygenowa**, polegająca na oddziaływaniu ASO z komplementarnym fragmentem dwuniciowej cząsteczki DNA i zahamowaniu powstawania transkryptu mRNA. Dzieje się to poprzez stabilizację trypleksu ASO/DNA przez wiązania wodorowe między zasadami trzeciej nici a zasadami purynowymi dwuniciowej cząsteczki DNA, tzw. wiązania Hoogstena. Utworzony trypleks może inhibować proces transkrypcji w zależności od miejsca hybrydyzacji poprzez uniemożliwienie tworzenia się kompleksu inicjującego DNA-polimeraza lub przez zablokowanie odczytu informacji DNA [28].
- 2) **Strategia antysensowa**, zazwyczaj stosowana do zahamowania translacji zsyntetyzowanego już mRNA. W tym przypadku ASO przyłącza się do komplementarnego fragmentu mRNA, tworząc dupleks z mRNA za pomocą wiązań typu Watsona-Cricka. W ten sposób dochodzi do zablokowania dostępu rybosomu do informacji zakodowanej w mRNA. Dupleks DNA/mRNA może również aktywować działanie endogennego enzymu, RNazy H, która przecina mRNA, uniemożliwiając w ten sposób proces biosyntezy białka przez degradację matrycy.
- 3) **Strategia rybozymowa**, w której ASO stosowane są jako syntetyczne rybozymy – katalityczne oligonukleotydy degradujące RNA. Skutkiem ich działania jest eliminacja lub ograniczenie populacji cząsteczek RNA niepożądanych w komórce [29]. Strategia degradacji RNA jest ukierunkowana głównie na geny kodujące białka onkogenne [30], czynniki wzrostu, receptory powierzchniowe oraz na cząsteczki przekazujące sygnały komórkowe [31]. Także wirusowe RNA stanowią potencjalne sekwencje docelowe [32-35].



Ryc. 1. Strategie działania ASO

Strategia antygenowa: (1) prawidłowy proces transkrypcji; (2) oddziaływanie ASO z DNA i uniemożliwienie utworzenia kompleksu inicjującego DNA-polimeraza; (3) zablokowanie odczytu informacji DNA.

Strategia antysensowa: (1) prawidłowy proces translacji; (2) zablokowania dostępu rybosomu do informacji zakodowanej w mRNA przez ASO; (3) aktywacja RNazy H i degradacja mRNA.

Strategia rybozymowa: (1) cząsteczka mRNA docelowego; (2) rozpoznanie sekwencji docelowej w mRNA przez rybozym; (3) degradacja mRNA.

Strategia aptamerowa: (1) chorobotwórcze białko docelowe; (2) rozpoznanie i dopasowanie się aptameru do białka; (3) modyfikacja białka i jego unieczynnienie.

- 4) **Strategia aptamerowa**, która wykorzystuje krótkie fragmenty kwasów nukleinowych (uzyskiwane drogą selekcji *in vitro*), wykazujące wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania ze ściśle określonymi biomolekułami. Określenie aptamer pochodzi od łacińskiego słowa „aptus”, co oznacza „pasować” [36]. Aptamery mogą pełnić rolę inhibitorów białek, których funkcją jest rozpoznawanie i oddziaływanie z kwasami nukleinowymi (np. polimeraz wirusowych), jak i białek, które w warunkach fizjologicznych z RNA nie oddziałują. Mogą również pełnić funkcje katalityczne czy też rolę ligandów wiążących inne molekuly, takie jak aminokwasy, nukleotydy, antybiotyki czy witaminy. Do tej pory uzyskano bardzo wiele aptamerów wobec całego szeregu molekuł, począwszy od małych nieorganicznych cząsteczek, a skończywszy na organizmach jednokomórkowych [37].

W przypadku ASO obserwujemy ciekawą rozbieżność pomiędzy postępowaniem badań podstawowych a wdrożeniami pozornie ewidentnych efektów do praktyki, szczególnie do medycyny. Można przecież domniemywać, że skoro znamy fragment DNA odpowiedzialny za daną funkcję, to nic bardziej prostego niż wprowadzenie oligomeru, który hybridyzując, zablokuje funkcję genu czy też informacyjnego RNA. Takie działanie ma miejsce i ten tok postępowania w pełni potwierdzają prace eksperymentalne *in vitro* z zastosowaniem „czystych” wyizolowanych cząsteczek. Bardziej złożona sytuacja ma miejsce *in vivo*, zarówno w układach komórkowych, a w szczególności w odniesieniu do całego organizmu. Krótkie fragmenty naturalnych kwasów nukleinowych, podawane do komórki, są natychmiast rozpoznawane przez system obronny i niszczone przez odpowiednie enzymy, jak również zachodzą liczne oddziaływania konkurencyjne. Dlatego poszukujemy analogów kwasów nukleinowych, których cząsteczki są odporne na działanie tych enzymów oraz spełniają szereg innych wymagań stawianych terapeutom, takich jak łatwe wnikiwanie do komórki, niska toksyczność, wysoka specyficzność i efektywność.

W związku z tym mamy do czynienia z całym kompleksem kwestii:

- 1) Dostarczanie do żądanej tkanki oraz pobór odpowiedniej ilości ASO przez komórki.** Oligonukleotydy obdarzone są ujemnym ładunkiem, dlatego ujemnie naładowana powierzchnia komórki działa „odpychająco” i hamuje transport ASO przez błonę [38]. Ładunek oligonukleotydów można modyfikować przez sprzężenie ich z dodatnio naładowanymi molekułami, np. polilizyną [39] lub awidyną [40]. Dla ułatwienia transportu ASO przez błony komórkowe zaproponowano również ich modyfikowanie związkami o charakterze lipofilowym, np. cholesterolem lub długołańcuchowymi alkoholami alifatycznymi [28]. W latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia rozwinęto technikę podawania leków w liposomach [38], pęcherzykach o wielkości 0,01-1 µm wypełnionych wodą i otoczonych dwuwarstwą lipidową, dzięki której łatwo fuzują z błonami komórek.
- 2) Stabilność ASO w komórce.** Na niestabilność antysensowych oligonukleotydów po raz pierwszy zwrócił uwagę Wickstrom, wykazując, że okres półtrwania ASO w oso-

czu jest krótszy niż jedna godzina [41]. W późniejszym czasie wykazano, że trwałość ASO determinowana jest głównie odpornością na działanie enzymów, endo- i egzonukleaz, które powodują szybką degradację „obcego” DNA [42]. Zwiększenie stabilności ASO uzyskuje się przez zastosowanie optymalnej długości [43] lub wprowadzenie modyfikacji chemicznych, np. otoczenia atomu fosforu w pozycjach niemostrkowych. Jest to zamiana jednego z dwóch atomów tlenu internukleotydowej grupy fosforanowej na atom siarki (PS-oligonukleotydy, [4]) lub grupę metylową (OMe-oligonukleotydy, [44]). Często stosowane są również pochodne 2'-metoksyetylowe (MOE) oraz analogi RNA, w których w szkieletcie cukrowo-fosforanowym rybozy występuje mostek metylenowy między dwoma atomami tlenu (LNA).

3) Reproduktywność działania ASO. Problemy powtarzalności wyników otrzymywanych z zastosowaniem strategii antysensu wynikają głównie z rozpadu sekwencji docelowej lub samego oligonukleotydu, niespecyficznego hybrydyzacji (przy właściwej sekwencji), błędnej hybrydyzacji, niespecyficznego aktywacji i (lub) blokowania aktywności oraz efektu ubocznego produktów degradacji. Sposoby wyjaśnienia i w konsekwencji zapobiegania tym kwestiom są następujące: zastosowanie trawienia enzymem RNazą H, wykrywania produktów degradacji oraz inhibicji syntezy (białek lub kwasów nukleinowych) oraz brak efektu z błędną sekwencją antysensowego oligonukleotydu.

Droga do leku

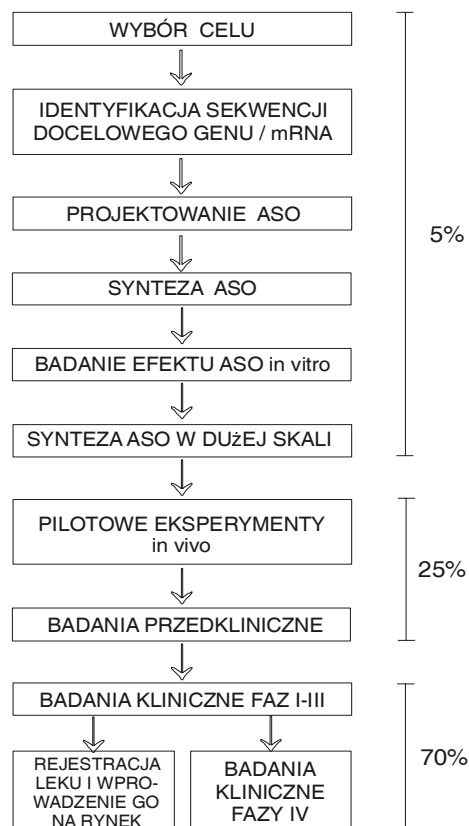
Koncepcja strategii antysensowych oligonukleotydów bezpośrednio ukierunkowuje nasze działania na potencjalne zastosowania terapeutyczne. Droga postępowania przy opracowywaniu nowego leku jest w swej idei nader prosta (ryc. 2), jednakże techniczne wykonanie jest skomplikowane i wymaga złożonego (i bardzo kosztownego) oprzyrządowania. W pracach *in silico*, czyli z wykorzystaniem zaawansowanych metod bioinformatycznych i baz danych, opracowywana jest struktura kwasu nukleinowego i (lub) białka oraz komplementarny ASO. Ta wirtualna wersja eksperymentu jest weryfikowana *in vitro*, czyli w probówce. Jednakże etapem najbardziej kosztownym i faktyczną weryfikacją słuszności idei badacza jest realizacja systemów *in vivo*, a zatem badań przedklinicznych i klinicznych. W przedklinicznej fazie badań obiecujący związek zostaje przebadany na zwierzętach doświadczalnych. Szacuje się, że tylko 5 na 5 tysięcy substancji leczniczych, nad którymi rozpoczyna się prace, pomyślnie przechodzi tę fazę badań. Aby możliwe było dopuszczenie do obrotu substancji chemicznej jako leku, musi ona z sukcesem przejść trzy podstawowe fazy badań klinicznych. Jeśli okaże się bezpieczna i skuteczna – zostaje zarejestrowana jako lek. Nie kończy to jednak procesu prowadzenia badań klinicznych już istniejącego leku. Pewne jego właściwości (zarówno pozytywne, jak i negatywne) mogą ujawniać się dopiero w perspektywie wielu lat. Dlatego też po wprowadzeniu leku na rynek prowadzi się dalsze badania kliniczne w obrębie dopusz-

czonych wskazań, czyli badania tzw. IV fazy. Szczegółowy opis trzech pierwszych faz przedstawia poniższa tabela.

Tabela 1. Trzy podstawowe fazy badań klinicznych (źródło: *Food and Drug Administration*)

	Liczba pacjentów	Długość badania	Cel badania	% substancji zweryfikowanych
Faza I	20-100	kilkanaście miesięcy	bezpieczeństwo, właściwości farmakokinetyczne	70%
Faza II	do kilkuset	do 2 lat	efektywność i bezpieczeństwo	33%
Faza III	kilkuset do kilku tysięcy	1-4 lata	bezpieczeństwo, efektywność oraz określenie dawki	25-30%

Globalne firmy farmaceutyczne szacują, że na wprowadzenie jednego nowego leku potrzebne są nakłady rzędu 3 mld zł, przy czym 70% nakładów pochłaniają końcowe fazy badań klinicznych, 25% – pierwsze fazy badań klinicznych i przedkliniczne, a jedynie 5% – odkrycie i badania wstępne (ryc. 2) [45].



Ryc. 2. Schemat postępowania w celu otrzymania leku antysensowego; po prawej podano procent ogólnych kosztów uzyskania leku dla kolejnych faz procesu

Wprowadzenie jednego nowego leku na rynek trwa przeszło 10 lat, na które składają się 4 lata prac nad odkryciem i badaniami wstępnymi oraz technologicznymi, 2 lata badań przedklinicznych i 4 lata badań klinicznych, po których lek się rejestruje i wprowadza na rynek (1-2 lata).

Przykłady prób zastosowań klinicznych antysensowych oligonukleotydów

Prace kliniczne, na różnych etapach, w odniesieniu do wielu zróżnicowanych przypadków są szeroko realizowane. Lista wybranych, reprezentatywnych przykładów zebrana jest w tabeli, a kilka zagadnień omówiono bardziej szczegółowo.

Tabela 2. Przykłady badań klinicznych realizowanych w zakresie zastosowania ASO

Gen docelowy	Firma	Stan badań	Choroba
Bcl-2	Genta	faza I-III	czerniak, przewlekła białaczka limfocytowa, szpiczak, rak gruczołu krokowego
c-Myb	Genta	faza I	przewlekła białaczka szpikowa
IGFBP2/5	Oncogenex	badania przedkliniczne	rak gruczołu krokowego, piersi, glejak
Klasteryna	Oncogenex	faza II	nowotwór gruczołu krokowego, piersi, niedrobnokomórkowy rak płuca
HSP27	Oncogenex	faza I	nowotwór gruczołu krokowego
PKC α	Isis	faza III	niedrobnokomórkowy rak płuca
STAT3	Isis	badania przedkliniczne	ksenotransplantacje
Raf	Isis	faza II	guz lity
Ras	Isis	faza II	guz lity
Bcl-xl	Isis	badania przedkliniczne	ksenotransplantacje
Mcl-1	Isis	badania przedkliniczne	ksenotransplantacje
Surwiwina	Lilly/Isis	faza I	guz lity
eIF4E	Lilly/Isis	badania przedkliniczne	liczne nowotwory
TGF- β 2	Antisense Pharma	faza II	guz mózgu
		faza I	nowotwór odbytnicy, złośliwe guzy mózgu i czerniak złośliwy
XIAP	Aegera	faza I	guz lity
PKA	Hybridon	badania przedkliniczne	ksenotransplantacje
Metylotransferaza	Methylgene	faza II	rozsiany rak nerki
Reduktaza rybonukleotydowa	Lorus	faza II	nowotwór gruczołu krokowego

Obecnie sprawdzane możliwości zastosowania terapii antysensowej dotyczą głównie onkologii, angioplastyki naczyń wieńcowych, chorób neurologicznych oraz leczenia niektórych chorób wirusowych i pasożytniczych [46].

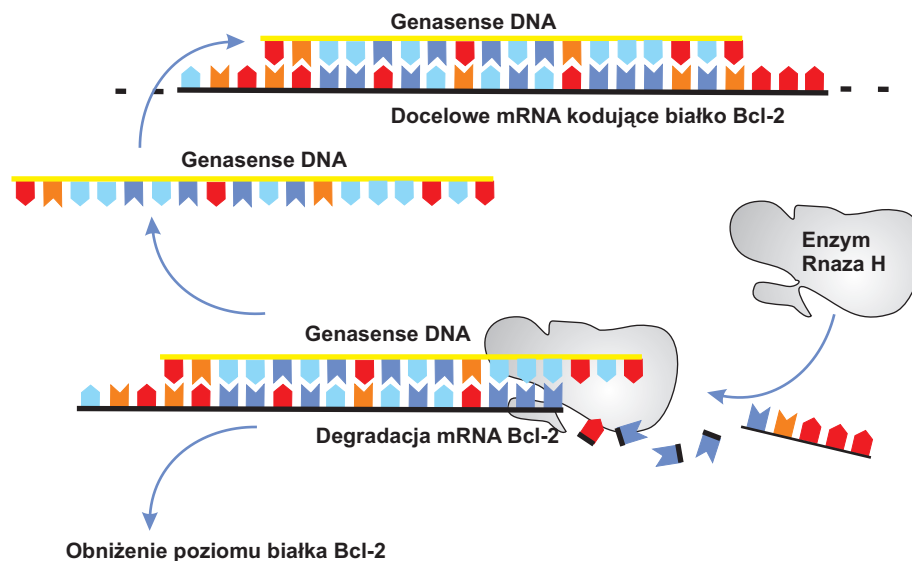
Aktywność przeciwnowotworowa ASO

Nowotwory to grupa chorób, w których komórki organizmu dzielą się w sposób niekontrolowany, a nowo powstałe komórki nowotworowe nie różnicują się w typowe tkanki. Utrata kontroli nad podziałami jest związana z mutacjami genów kodujących białka uczestniczące w cyklu komórkowym. Mutacje te powodują, że komórka wcale lub niewłaściwie reaguje na sygnały pochodzące z organizmu. Teoretycznie zatem, antysensowe oligonukleotydy skierowane przeciwko specyficznym genom stanowią idealne narzędzie terapii przeciwnowotworowej.

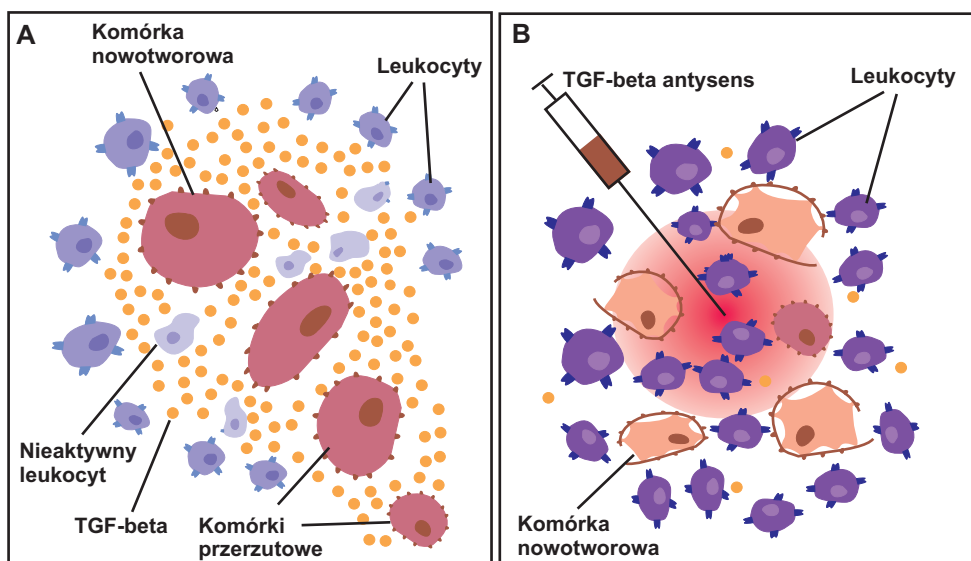
Jako przykład można przedstawić badania kliniczne (faza III), w których stosuje się antysensowy DNA G3139 firmy Genta (Genasense, oblimersen sodu), hamujący czynność białka antyapoptotycznego Bcl-2. Białko to pomaga komórkom nowotworowym uniknąć niszczenia przez chemioterapię. Stwierdzono, że przez zahamowanie ekspresji mRNA Bcl-2, oblimersen sodu czyni komórki nowotworu bardziej podatnymi na chemioterapię i wywołuje apoptozę nawet w opornych na leki komórkach szpiczaka mnogiego [47]. Ponadto stosowanie G3139 jednocześnie z naświetlaniem wzmacnia jego efekt antynowotworowy [48]. Mechanizm działania tego leku przedstawia rycina 3.

Dwie grupy badaczy: Chi oraz Winqvist przedstawiły w 2005 i 2006 r. rezultaty terapii z użyciem oligonukleotydu antysensowego OGX-011 firmy Oncogenex wobec mRNA kodującego klasterynę [49, 50]. Stwierdzono, że poziom klasteryny wzrasta na wczesnym etapie rozwoju raka okrężnicy i piersi. W ten sposób następuje inhibicja pro-apoptotycznego białka Bax związanego z Bcl-2, co skutkuje wydłużeniem przeżycia komórek nowotworowych. OGX-011 jest 2'-metoksyetylową pochodną tiofosforanową ASO komplementarnego do mRNA klasteryny. W fazie I badań klinicznych stwierdzono, że OGX-011 skutecznie obniża ekspresję klasteryny, nawet do 90%, zwiększając w ten sposób efektywność chemioterapii.

Niemieckie przedsiębiorstwo Antisense Pharma znane jest w Europie w dziedzinie poszukiwania i komercjalizacji antysensowych leków w terapii nieuleczalnych chorób nowotworowych. Najbardziej znanym preparatem jest AP 12009, obecnie w fazie II badań klinicznych, ukierunkowany na złośliwe guzy mózgu oraz w fazie I badań klinicznych w leczeniu nowotworu odbytnicy, trzustki i czerniaka złośliwego. Lek ten ma za zadanie hamowanie ekspresji genu kodującego czynnik wzrostu nowotworu TGF-beta2, który jest odpowiedzialny za eksplozywny wzrost guza oraz agresywne rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych (przerzuty). Ponadto TGF-beta2 tworzy warstwę wokół guza, chroniącą go przed działaniem systemu immunologicznego.



Ryc. 3. Mechanizm działania antysensowego preparatu Genasense. Antysensowy DNA Genasense degraduje mRNA kodujące białko antyapoptotyczne Bcl-2 pomagające komórkom nowotworowym uniknąć niszczenia przez chemioterapię. Heterodupleks Genasense/mRNA aktywuje enzym RNazę H, który powoduje degradację mRNA Bcl-2 i obniżenie produkcji białka Bcl-2.



Ryc. 4. Mechanizm działania antysensowego preparatu AP 12009. A. Guzy produkują duże ilości czynnika wzrostu nowotworów TGF-beta. Białko to generuje warstwę ochronną otaczającą guz i chroniącą go przed działaniem systemu odpornościowego. TGF-beta powoduje również powstawanie przerzutów. B. Lek antysensowy przeciwko TGF-beta specyficznie blokuje ekspresję czynnika wzrostu nowotworów TGF-beta, powodując rozbięcie warstwy ochronnej guza. Zaktywowany system odpornościowy penetruje nowotwór i niszczy komórki rakowe poprzez ich lizę. Przerzuty również są hamowane.

Antysensowy lek AP 12009, blokując powstawanie czynnika TGF-beta2, rozbija warstwę ochronną. W rezultacie rozwój guza zostaje zahamowany, a układ odpornościowy organizmu zwalcza komórki nowotworowe (ryc. 4).

Antisense Pharma bada również potencjalne antysensowe leki: AP 11014 (I faza badań klinicznych) oraz AP 15012 (badania przedkliniczne) ukierunkowane na nowotwory płuc i gruczołu krokowego.

Wydaje się, że oligonukleotydy typu antysens mogłyby stanowić dobre narzędzie terapii genowej do obniżania oporności wielolekowej, która pozwala „przeżyć” chemioterapię komórkom nowotworowym [51]. W badaniach na liniach komórkowych raka jajnika opornych na chemioterapię z powodzeniem stosowano ASO w stosunku do mRNA kinazy proteinowej C a i b [52]. Ekspresja tego enzymu wiąże się z opornością wielolekową.

Przykłady ASO, które znalazły zastosowanie w przedklinicznych lub klinicznych etapach terapii przeciwnowotworowej, zostały zebrane w tabeli 1 [1, 53].

Aktywność przeciwwirusowa ASO

Trwają również badania zmierzające do zastosowania ASO w celu zahamowania replikacji wirusów szkodliwych dla roślin, zwierząt i ludzi. Dotychczas tylko jeden lek oparty na ASO (Vitravene) wykorzystywany jest w leczeniu choroby oczu wywołanej przez cytomegalowirusy (CMV) u pacjentów z AIDS [54, 55]. Jednak nowa metoda leczenia AIDS – HAART (ang. *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) skutecznie zapobiega zapaleniom siatkówki i popyt na lek ASO jest ograniczony [56].

Proponowana jest także terapia genowa w przypadku wirusa upośledzenia odporności (HIV). W terapii tej zakłada się zablokowanie ekspresji określonych genów w komórkach zainfekowanych wirusem HIV [57] lub wstrzymanie replikacji samego wirusa w zainfekowanym układzie biologicznym za pomocą antysensowych oligonukleotydów RNA (lek VRX496 firmy VIRxSYS w fazie I badań klinicznych) [58].

W 2006 roku opublikowano również wyniki badań z zastosowaniem strategii antysensowej w leczeniu infekcji wirusem Ebola (EBOV) z użyciem tiofosforanowych oligomerów morfolinowych (PMO). PMO komplementarne do wirusowych mRNA kodujących białka VP24 i VP35 wykazały działanie ochronne przed infekcją EBOV u 75% pacjentów [59].

W 2006 roku opublikowano również doniesienie o wyselekcjonowaniu ASO DNA specyficznie inhibujących działanie receptora asialoglikoproteinowego (ASGRP), który bierze udział w przyłączaniu wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) do hepatocytów. W badaniach tych wyselekcjonowano ASO, które redukowały poziom DNA wirusa, poziom antygeny powierzchniowego wirusa (HbsAg) oraz poziom antygeny „e” wirusa (HbeAg) [60].

Najnowsze badania dotyczą również wykorzystania wektorów wirusowych kodujących sekwencje antysensowych oligonukleotydów. Badania takie wykonywano między innymi na liniach komórkowych zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego typu 16 (HPV). Zakażenie typem HPV 16 może prowadzić do niekontrolowanych podziałów komórkowych nabłonka szyjki macicy, czego skutkiem może być rak szyjki macicy. W badaniach zastosowano wektory pochodzące z wirusa opryszczki pospolitej (HSV) dla ekspresji antysensowego RNA komplementarnego do genu E7 HPV-16. Stwierdzono, że konstrukty takie skutecznie inhibują ekspresję tego onkogenu [61].

Aktywność terapeutyczna ASO w chorobach naczyń krwionośnych

W chorobach naczyń krwionośnych występują zmiany degeneracyjne, zapalne i zakrzepowe, powodujące zwężenie lub niedrożność światła naczyń, a co za tym idzie zaburzenia ukrwienia w obszarach zaopatrywanych przez te naczynia.

Trwają badania kliniczne (faza II) w przypadku zastosowania leku ISIS 301012 firmy Isis. Jest to ASO zawierający modyfikacje 2'-o-metoksyetylowe rybozy, które zwiększają powinowactwo do docelowej cząsteczki oraz lepsze wchłanianie leku. ISIS 301012 powoduje inhibicję ekspresji apolipoproteiny B (ApoB), odpowiedzialnej za transport cholesterolu lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) do tętnic. Wskutek tego następuje gromadzenie się cholesterolu w błonie wewnętrznej tętnic, co może prowadzić do miażdżycy tętnic. Stwierdzono, że ISIS 301012 powoduje skuteczne obniżenie poziomu LDL [62].

W maju tego roku dwie amerykańskie firmy, Bristol-Myers Squibb Company oraz Isis Pharmaceuticals, przystąpiły do współpracy w celu wynalezienia i komercjalizacji nowego antysensowego leku nakierowanego na PCSK9 – chorobotwórczą glikoproteinę, której wysoką ekspresję stwierdza się w wątrobie, jelitach i nerkach. Jak wykazano w modelu doświadczalnym, nadmierna ekspresja PCSK9 w mysiej wątrobie powoduje zwiększenie stężenia cholesterolu we krwi [63].

Aktywność terapeutyczna ASO w innych chorobach cywilizacyjnych

Łódzcy badacze, pod kierunkiem Nawrot, poszukują aktywnych fragmentów kwasów nukleinowych (DNA lub RNA) skutecznych w hamowaniu biosyntezy białka beta-sekretazy, które jest znamienne dla rozwoju choroby Alzheimera.

Australijska firma Antisense Therapeutics Limited, której celem jest tworzenie, udoskonalanie oraz komercjalizacja nowoczesnych antysensowych terapeutyków, testuje obecnie dwa leki: ATL1102 oraz ATL1103.

ATL1102 jest preparatem nakierowanym na stwardnienie rozsiane (SM) (II faza badań klinicznych) oraz astmę (badania przedkliniczne). SM jest chorobą ośrodkowego układu nerwowego, objawiającą się licznymi zaburzeniami neurologicznymi. SM wystę-

puje z częstością 30-100 zachorowań na 100 000 mieszkańców. W tradycyjnym leczeniu SM stosuje się wyłącznie postępowanie objawowe. Antisense Therapeutics proponuje zastosowanie inhibitora CD49d (podjednostki VLA-4, tzw. późnego antygenu wytwarzanego przez leukocyty, których zadaniem jest ochrona organizmu przed patogenami takimi jak wirusy i bakterie). W stanach zapalnych leukocyty przenikają z krwi do chorej tkanki, w przypadku SM do centralnego układu nerwowego, a w przypadku astmy – do pęcherzyków płucnych. Inhibicja VLA-4 może zahamować wnikanie leukocytów do zmienionych chorobowo tkanek, zatrzymując w ten sposób rozwój choroby. Takie efekty uzyskano w wielu modelach zwierzęcych chorób zapalnych.

ATL103 jest preparatem antysensowym, obecnie w fazie badań przedklinicznych, z potencjalnym zastosowaniem w leczeniu zaburzeń widzenia i akromegalii (choroby spowodowanej nadmiernym wydzielaniem hormonu wzrostu). ATL103 ma za zadanie hamowanie ekspresji receptora hormonu wzrostu, obniżając w ten sposób poziom hormonu wzrostu we krwi.

W październiku tego roku naukowcy z University of California, San Diego (UCSD) School of Medicine, the Center for Neurologic Study oraz Isis Pharmaceutical opublikowali wyniki badań terapii molekularnej w modelu zwierzęcym ASL (stwardnienie zanikowe boczne). ASL jest najczęstszym schorzeniem paralitycznym dorosłych prowadzącym w ciągu 3-5 lat do paraliżu mięśni oddechowych i śmierci [64]. Ponury rozgłos ASL zyskało w roku 1941 w USA, gdy stało się przyczyną śmierci jednego z najwybitniejszych sportowców amerykańskich, baseballisty Henry'ego Louisa (Lou) Gehriga, znanego jako *Iron Horse* (Żelazny Koń) – stąd schorzenie to jest także znane jako „choroba Lou Gehriga”. ASL występuje dość rzadko (1-3 nowe zachorowania/100 tysięcy mieszkańców/rok), ale jest chorobą całkowicie nieuleczalną i staje się przyczyną co osiemsetnego zgonu [65]. Grupa prof. Clevelanda wykazała, że lek antysensowy może być dostarczony do mózgu i rdzenia kręgowego przez płyn mózgowo-rdzeniowy w dawkach, które spowalniają rozwój choroby u myszy [66].

W listopadzie tego roku przodująca amerykańska firma, Isis Pharmaceuticals, Inc., produkująca nowe leki oparte na technologii RNA, przystąpiła do projektu poszukiwania skutecznego farmaceutyku ASO nakierowanego na choroby zwłóknieniowe, w tym również na bliznowacenie, która jest groźną chorobą skóry uwarunkowaną genetycznie.

Podsumowanie

Celem, a może wręcz marzeniem, każdego lekarza jest usuwanie przyczyn, a nie skutków chorób. Profilaktyka daje znacznie lepsze efekty niż terapia. Współczesna wiedza o strukturze molekuł uczestniczących w procesach chorobotwórczych daje podstawy do optymizmu. Znamy już przecież genomy wielu bakterii, wirusów i ssaków. Intensywnie badane są białka, które odgrywają równie istotną rolę jak kwasy nukleinowe.

Koncepcja zahamowania funkcji zdefiniowanej cząsteczki jest bardzo klarowna i nie budzi żadnych obiekcji. Trudności i wątpliwości związane są z techniczną realizacją tego zadania: sposób dostarczenia „do celu” aktywnej molekuly, jej dezintegracja i produkty rozpadu, aktywności uboczne czy też oddziaływania z innymi cząsteczkami.

Strategie antysensowe są trudne w zastosowaniu, bowiem szereg czynników warunkuje sukces takiej koncepcji modyfikowania szlaku metabolicznego. Jednakże wiele walorów tej technologii pozwala sądzić, że medyczne zastosowania będą coraz powszechniejsze. Bowiem choroby cywilizacyjne (AIDS, nowotwory, choroby układu krążenia) nadal stanowią otwarte wyzwanie dla nauki XXI wieku.

Należy jednak pamiętać, że szczególnie przy stosowaniu ASO w komórkach, efekty terapeutyczne mogą być wynikiem zarówno bezpośredniego działania antysensowych oligonukleotydów na sekwencję docelową lub też może dochodzić do aktywacji mechanizmów, takich jak RNAi (interferencja RNA) czy aptamerów. W pierwszym przypadku degradacja docelowego mRNA może być indukowana wprowadzeniem (lub syntezą) RNA o homologicznej sekwencji. Ponadto ASO zastosowany w celu zahamowania biosyntezy określonego białka poprzez hybrydyzację z odpowiednim mRNA i jego degradację może okazać się aptamerem dla zupełnie innego białka. W pewnych przypadkach aptameryczny efekt działania oligonukleotydu może wzmacniać jego działanie antysensowe, ale może również powodować zdecydowanie negatywne skutki, szczególnie przy długotrwałym podawaniu antysensowego specyfiku.

Praca finansowana z grantu MNiSW nr PZB-MNiSW-2/3/2006

Literatura

- [1] Vidal, L., Blagden, S., Attard, G., de Bono, J., *Making Sense of Antisense*, „Eur. J. Cancer” 2005, nr 41, s. 2812-8.
- [2] Paterson, B. M., Roberts, B. E., Kuff, E. L., *Structural Gene Identification and Mapping by DNA-Mrna Hybrid-Arrested Cell-Free Translation*, „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1977, nr 74, s. 4370-4.
- [3] Zamecnik, P. C. and Stephenson, M. L., *Inhibition of Rous Sarcoma Virus Replication and Cell Transformation by a Specific Oligodeoxynucleotide*, „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1978, nr 75, s. 280-4.
- [4] Stec, W., *Strategia Antysensowych Oligonukleotydów*, „Biotechnologia” 1994, nr 4, s. 5-15.
- [5] Stec, W. J., Wozniak, L. A., Pyzowski, J., Niewiarowski, W., *Novel Cost-Effective Methanephosphonoanilidothioate Approach to the Stereoselective Synthesis of Dinucleoside (3',5')-Methanephosphonates*, „Antisense Nucleic Acid Drug Dev.” 1997, nr 7, s. 381-95.
- [6] Nawrot, B., Sobczak, M., Wojcik et al. *A Novel Class of DNA Analogs Bearing 5'-C-Phosphonothymidine Units: Synthesis and Physicochemical and Biochemical Properties*, „Oligonucleotides” 2006, nr 16, s. 68-82.
- [7] Guga, P., Maciaszek, A., Stec, W. J., *Oxathiaphospholane Approach to the Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides Containing Stereodefined Internucleotide Phosphoroselenoate Function*, „Org. Lett.” 2005, nr 7, s. 3901-4.

- [8] Wozniak, L. A., Gora, M. and Stec, W. J., *Chemoselective Activation of Nucleoside 3'-O-Methylphosphonothioates with 1,3,5-Triazinyl Morpholinium Salts*, „J. Org. Chem.” 2007, nr 72, s. 8584-7.
- [9] Da Costa, C. P., Krajewska, D., Okruszek et al. *Stabilities of Lead(II) Complexes Formed in Aqueous Solution with Methyl Thiophosphate (Meops(2-)), Uridine 5'-O-Thiomonophosphate (Umps(2-)) or Adenosine 5'-O-Thiomonophosphate (Amps(2-))*, „J. Biol. Inorg. Chem.” 2002, nr 7, s. 405-15.
- [10] Koziolkiewicz, M., Wojcik, M., Kobylanska, A. et al. *Stability of Stereoregular Oligo(Nucleoside Phosphorothioate)s in Human Plasma: Diastereoselectivity of Plasma 3'-Exonuclease*, „Antisense Nucleic Acid Drug Dev.” 1997, nr 7, s. 43-8.
- [11] Stec, W. J., Cierniewski, C. S., Okruszek, A. et al. *Stereodependent Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 by Phosphorothioate Oligonucleotides: Proof of Sequence Specificity in Cell Culture and in Vivo Rat Experiments*, „Antisense Nucleic Acid Drug Dev.” 1997, nr 7, s. 567-73.
- [12] Sobkowski, M., Jankowska, J., Kraszewski, A. and Stawinski, J., *Stereochemistry of Internucleotide Bond Formation by the H-Phosphonate Method. 1. Synthesis and ³¹P Nmr Analysis of 16 Diribonucleoside (3'-5')-H-Phosphonates and the Corresponding Phosphorothioates*, „Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids” 2005, nr 24, s. 1469-84.
- [13] Cieslak, J., Sobkowski, M., Jankowska, J. et al. *Nucleoside Phosphate Analogues of Biological Interest, and Their Synthesis Via Aryl Nucleoside H-Phosphonates as Intermediates*, „Acta Biochim. Pol.” 2001, nr 48, s. 429-42.
- [14] Szymanska, A., Szymczak, M., Boryski, J. et al. *Aryl Nucleoside H-Phosphonates. Part 15: Synthesis, Properties and, Anti-Hiv Activity of Aryl Nucleoside 5'-Alpha-Hydroxyphosphonates*, „Bioorg. Med. Chem.” 2006, nr 14, s. 1924-34.
- [15] Szymczak, M., Szymanska, A., Stawinski, J. et al. *Aryl H-Phosphonates. 14. Synthesis of New Nucleotide Analogues with Phosphonate-Phosphate Internucleosidic Linkage*, „Org. Lett.” 2003, nr 5, s. 3571-3.
- [16] Kraszewski, A. and Norris, K. E., *Simple and Rapid Procedure for Synthesis of Deoxynucleoside 3'-2'-Cyanoethyl-N,N-Diisopropyl-Amino Phosphites*, „Nucleic Acids Symp. Ser.” 1987, nr s. 177-80.
- [17] Markiewicz, W. T., Biala, E., Adamiak, R. W. et al. *Further Studies on Oligoribonucleotide Synthesis*, „Nucleic Acids Symp. Ser.” 1980, nr s. 115-27.
- [18] Markiewicz, W. T., Groger, G., Rosch, R. *A New Method of Synthesis of Fluorescently Labeled Oligonucleotides and Their Application in DNA Sequencing*, „Nucleic Acids Res.” 1997, nr 25, s. 3672-80.
- [19] Markiewicz, W. T., Niewczyk, A., Gdaniec et al. *Studies on Synthesis and Structure of O-Beta-D-Ribofuranosyl (1"->2') Ribonucleosides and Oligonucleotides*, „Nucleosides Nucleotides” 1998, nr 17, s. 411-24.
- [20] Jaskulski, D., deRiel, J. K., Mercer, W. E. et al. *Inhibition of Cellular Proliferation by Antisense Oligodeoxynucleotides to Pcn Cyclin*, „Science” 1988, nr 240, s. 1544-6.
- [21] Szczylik, C., Skorski, T., Nicolaides, N. C. et al. *Selective Inhibition of Leukemia Cell Proliferation by Bcr-Abl Antisense Oligodeoxynucleotides*, „Science” 1991, nr 253, s. 562-5.
- [22] Ratajczak, M. Z., Kant, J. A., Luger, S. M. et al. *In Vivo Treatment of Human Leukemia in a Scid Mouse Model with C-Myb Antisense Oligodeoxynucleotides*, „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1992, nr 89, s. 11823-7.

- [23] Skorski, T., Nieborowska-Skorska, M., Nicolaides, N. C. et al. *Suppression of Philadelphia1 Leukemia Cell Growth in Mice by Bcr-Abl Antisense Oligodeoxynucleotide*, „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1994, nr 91, s. 4504-8.
- [24] Skorski, T., Kanakaraj, P., Nieborowska-Skorska, M. et al. *P120 Gap Requirement in Normal and Malignant Human Hematopoiesis*, „J. Exp. Med.” 1993, nr 178, s. 1923-33.
- [25] Bakowska-Zywicka, K., Twardowski, T., *Correlation of the Structure and Conformational Changes of Selected Fragments of Plant Small Ribosomal Rna within the Steps of Polypeptide Chain Elongation*, „J. Plant Physiol.” 2007, nr 164, s. 496-504.
- [26] Dudzińska, B., Astriab, M., Smół, J., Twardowski, T., *Application of Antisense Oligomers to the Interpretation of Ribosomal Machinery of Translation.*, „Biologia” 2001, nr 56, s. 243-46.
- [27] Dudzińska-Bajorek, B., Bakowska, K., Twardowski, T., *Conformational Changes of L-rRNA During Elongation of Polypeptide*, „J. Plant Physiol.” 2006, nr 163, s. 463-74.
- [28] Dudzińska, B., Twardowski, T., *Antysens – Dwie Strony Medalu, Na pograniczu chemii i biologii*, red. J. Barciszewski, H. Koroniak 2000, nr s. 181-200.
- [29] Dutkiewicz, M., Ciesiołka, J., *Strategia ukierunkowanej degradacji RNA oraz wybrane przykłady zastosowania w terapii przeciwwirusowej*, „Biotechnologia” 2002, nr 1, s. 57-70
- [30] Tanabe, T., Kuwabara, T., Warashina, M. et al. *Oncogene Inactivation in a Mouse Model*, „Nature” 2000, nr 406, s. 473-4.
- [31] Sun, L. Q., Cairns, M. J., Saravolac, E. G. et al. *Catalytic Nucleic Acids: From Lab to Applications*, „Pharmacol. Rev.” 2000, nr 52, s. 325-47.
- [32] Swiatkowska, A., Dutkiewicz, M., Ciesiolka, J., *Structural Features of Target RNA Molecules Greatly Modulate the Cleavage Efficiency of Trans-Acting Delta Ribozymes*, „Biochemistry” 2007, nr 46, s. 5523-33.
- [33] Legiewicz, M., Wichlacz, A., Brzezicha, B., Ciesiolka, J., *Antigenomic Delta Ribozyme Variants with Mutations in the Catalytic Core Obtained by the in Vitro Selection Method*, „Nucleic Acids Res.” 2006, nr 34, s. 1270-80.
- [34] Wyszko, E., Barciszewska, M. Z., Bald, R. et al. *The Specific Hydrolysis of HIV-1 TAR RNA Element with the Anti-TAR Hammerhead Ribozyme: Structural and Functional Implications*, „Int. J. Biol. Macromol.” 2001, nr 28, s. 373-80.
- [35] Wyszko, E., Fuerste, J. P., Barciszewska, M. et al. *Preparation of HIV TAR RNA with RNA Scissors*, „J. Biochem. (Tokyo)” 1999, nr 126, s. 326-32.
- [36] Tyczewska, A., Figlerowicz, M., Twardowski, T., *Aptamery RNA jako potencjalne leki przeciwwirusowe*, „Biotechnologia” 2003, nr 2, s. 153-64.
- [37] Tyczewska, A., Bąkowska-Żywicka, K., Twardowski, T., *Terapeutyczne zastosowania aptamerów*, [w:] *Na pograniczu chemii i biologii*, red. J. Barciszewski, H. Koroniak 2006, nr XIV, s. 176-203.
- [38] Łaski, J., *Transport oligonukleotydów przez błonę komórkową*, „Biotechnologia” 1994, nr 4, s. 40-49.
- [39] Leonetti, J. P., Machy, P., Degols, G. et al. *Antibody-Targeted Liposomes Containing Oligodeoxyribonucleotides Complementary to Viral RNA Selectively Inhibit Viral Replication*, „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 1990, nr 87, s. 2448-51.
- [40] Pardridge, W. M., Boado, R. J., *Enhanced Cellular Uptake of Biotinylated Antisense Oligonucleotide or Peptide Mediated by Avidin, a Cationic Protein*, „FEBS Lett.” 1991, nr 288, s. 30-2.
- [41] Wickstrom, E., *Oligodeoxynucleotide Stability in Subcellular Extracts and Culture Media*, „J. Biochem. Biophys. Methods” 1986, nr 13, s. 97-102.

- [42] Koziolkiewicz, M., *Stabilność oligonukleotydów antysensowych – możliwość ich degradacji enzymatycznej*, „Biotechnologia” 1994, nr 4, s. 50-54.
- [43] Sanghvi, Y. S., Hoke, G. D., Freier, S. M. et al. *Antisense Oligodeoxynucleotides: Synthesis, Biophysical and Biological Evaluation of Oligodeoxynucleotides Containing Modified Pyrimidines*, „Nucleic Acids Res.” 1993, nr 21, s. 3197-203.
- [44] Miller, P. S., *Oligonucleoside Methylphosphonates as Antisense Reagents*, „Biotechnology (N Y)” 1991, nr 9, s. 358-62.
- [45] Borowicz, P., *Droga do leku*, „Sprawy Nauki” 2004, nr 2.
- [46] Stec-Michalska, K., *Strategia antysensowych oligonukleotydów – aktualny stan zaawansowania badań klinicznych w wybranych schorzeniach nowotworowych*, „Współczesna Onkologia” 2000, nr 4, s. 279-84.
- [47] Bedikian, A. Y., Millward, M., Pehamberger, H. et al. *Oblimersen Melanoma Study Group, Bcl-2 Antisense (Oblimersen Sodium) Plus Dacarbazine in Patients with Advanced Melanoma: The Oblimersen Melanoma Study Group.*, „J. Clin. Oncol.” 2006, nr 24, s. 4738-45.
- [48] Wiedenmann, N., Koto, M., Raju, U. et al. *Modulation of Tumor Radiation Response with G3139, a Bcl-2 Antisense Oligonucleotide*, „Invest New Drugs” 2007.
- [49] Chi, K. N., Eisenhauer, E., Fazli, L. *A Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Ogx-011, a 2'-Methoxyethyl Antisense Oligonucleotide to Clusterin, in Patients with Localized Prostate Cancer*, „J. Natl. Cancer Inst.” 2005, nr 97, s. 1287-96.
- [50] Winkquist, E., Knox, J., Ayoub, J. P. et al. *Phase II Trial of DNA Methyltransferase 1 Inhibition with the Antisense Oligonucleotide Mg98 in Patients with Metastatic Renal Carcinoma: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Investigational New Drug Study*, „Invest. New Drugs” 2006, nr 24, s. 159-67.
- [51] Liu, C., Qureshi, I. A., Ding, X. *Modulation of Multidrug Resistance Gene (Mdr-1) with Antisense Oligodeoxynucleotides*, „Clin. Sci. (Lond)” 1996, nr 91, s. 93-8.
- [52] Masanek, U., Stammer, G., Volm, M., *Modulation of Multidrug Resistance in Human Ovarian Cancer Cell Lines by Inhibition of P-Glycoprotein 170 and Pkc Isoenzymes with Antisense Oligonucleotides*, „J. Exp. Ther. Oncol.” 2002, nr 2, s. 37-41.
- [53] Wachek, V., Zangemeister-Wittke, U., *Antisense Molecules for Targeted Cancer Therapy*, „Crit. Rev. „Oncol. Hematol.” 2006, nr 59, s. 65-73.
- [54] Robinson, R., *RNAi Therapeutics: How Likely, How Soon?*, „PLoS Biol.” 2004, nr 2, s. E28
- [55] Kurreck, J., *Antisense Technologies. Improvement through Novel Chemical Modifications*, „Eur. J. Biochem.” 2003, nr 270, s. 1628-44.
- [56] Gabryelska, M., Wyszko, E., Nowak, S. et al. *Zastosowanie technologii interferencji RNA w medycynie*, „Neuroskop.” 2006, nr 8, s. 143-59.
- [57] Tamm, I., *Antisense Therapy in Malignant Diseases: Status Quo and Quo Vadis?*, „Clin. Sci. (Lond)” 2006, nr 110, s. 427-42.
- [58] Levine, B. L., Humeau, L. M., Boyer, J. et al. *Gene Transfer in Humans Using a Conditionally Replicating Lentiviral Vector*, „Proc. Natl. Acad. Sci. USA” 2006, nr 103, s. 17372-7.
- [59] Warfield, K. L., Swenson, D. L., Olinger, G. G. et al. *Gene-Specific Countermeasures against Ebola Virus Based on Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers*, „PLoS Pathog.” 2006, nr 2, s. e1.
- [60] Yang, J., Bo, X. C., Ding, X. R. et al. *Antisense Oligonucleotides Targeted against Asialoglycoprotein Receptor 1 Block Human Hepatitis B Virus Replication*, „J. Viral Hepat.” 2006, nr 13, s. 158-65.

- [61] Kari, I., Syrjanen, S., Johansson, B. et al. *Antisense Rna Directed to the Human Papilloma-virus Type 16 E7 Mrna from Herpes Simplex Virus Type 1 Derived Vectors is Expressed in Caski Cells and Downregulates E7 Mrna*, „Virol. J.” 2007, nr 4, s. 47.
- [62] Potera, C., *Antisense-Down, but Not Out*, „Nat. Biotechnol.” 2007, nr 25, s. 497-9.
- [63] Graham, M. J., Lemonidis, K. M., Whipple, C. P. et al. *Antisense Inhibition of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Reduces Serum Ldl in Hyperlipidemic Mice*, „J. Lipid Res.” 2007, nr 48, s. 763-7.
- [64] Haverkamp, L. J., Appel, V., Appel, S. H., *Natural History of Amyotrophic Lateral Sclerosis in a Database Population. Validation of a Scoring System and a Model for Survival Prediction*, „Brain” 1995, nr 118 (Pt 3), s. 707-19.
- [65] Yoshida, S., Mulder, D. W., Kurland, L. T. et al. *Follow-up Study on Amyotrophic Lateral Sclerosis in Rochester, Minn., 1925 through 1984*, „Neuroepidemiology” 1986, nr 5, s. 61-70.
- [66] Smith, R. A., Miller, T. M., Yamanaka, K. et al. *Antisense Oligonucleotide Therapy for Neurodegenerative Disease*, „J. Clin. Invest.” 2006, nr 116, s. 2290-6.

Civilization diseases – therapeutic application of antisense strategy

Modulation and regulation of biosynthesis process by means of antisense oligonucleotides lay the foundation for new therapeutic strategies, among others against cancer, viral or angiogenesis diseases. The aim of this account is the presentation of molecular basis of antisense strategy and mechanism of action of antisense oligonucleotides. Furthermore we present the state of art in clinical studies of application of antisense oligonucleotides in some of civilization diseases.

Key words: civilization diseases, antisense oligonucleotides, novel therapies