

RIBONUKLEÁZY /RNÁZY/ V PROTINÁDOROVÉ TERAPII RIBONUCLEASES /RNASES/ IN ANTI-CANCER TREATMENT

T. ECKSCHLAGER¹, P. POUČKOVÁ², J. MATOUŠEK³

¹KLINIKA DĚTSKÉ HEMATOLOGIE A ONKOLOGIE, UK 2.LF A FN MOTOL, PRAHA,

²ÚSTAV BIOFYZIKY A INFORMATIKY, UK 1LF, PRAHA,

³ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ FYZIOLOGIE A GENETIKY, AV ČR, LIBECHOV

Souhrn: Jednou z perspektiv systémové protinádorové terapie je použití enzymů štěpících kyselinu ribonukleovou – RNáz. Řada přirozených i geneticky modifikovaných RNáz je v různých fázích výzkumu a některé se jeví nadějně jako protinádorové preparáty. RNáza z žabích vajíček a embryí – onkonáza (ranpirnáza) je používána v léčbě mezoteliomu a v dalších indikacích je předmětem klinických studií. Cytostatický účinek je podmíněn inhibicí proteosyntézy štěpením tRNA. Dále se uplatňuje i štěpení rRNA, aktivace kaspáz a snížení exprese Bcl-2. Konečným výsledkem je indukce apoptózy nádorové buňky jak dokazuje řada experimentů *in vitro* i *in vivo*. RNázy navázané na protilátku (proti ErbB-2 a proti CD22) byly úspěšné v preklinických experimentech. Naději pro praxi vzbuzují pokusy prokazující synergismus onkonázy s cytostatiky a s interferony.

Co se týče nežádoucích účinků, které jsou jedním z faktorů limitujících použití cytostatik, jsou u RNáz méně závažné. Zkušenosti s použitím onkonázy u více než 850 pacientů ukázaly, že hlavní nežádoucí účinek jsou „flu-like symptomy“, vasodilatace, parestesie, periferní otoky, alergické reakce a nefrotoxicita projevující se proteinurií a někdy i zhoršením renálních funkcí. Výsledky experimentů a klinických studií naznačují, že zařazení onkonázy eventuálně jiných RNáz do chemoterapeutických režimů by mohlo přispět ke zvýšení účinku bez zvýšení toxicity.

Klíčová slova: protinádorové léky, ribonukleázy, onkonáza, protinádorové RNázy, indukce apoptózy.

Abstract: One of perspective trends in the systemic anti-cancer treatment is the use of enzymes splitting ribonucleic acid – ribonucleases /RNases/. A number of both natural and genetically modified RNases are currently being subjected to different stages of studies and some of them are promising as efficient anticancer agents. RNase from frog eggs and embryos – onconase (ranpirnase) – is currently used in the mesothelioma treatment and subjected to clinical trials in further indications (breast, kidney, and non-small cell lung cancer). The cytostatic effects result from proteosynthesis inhibition due to the tRNA splitting. The splitting of rRNA, activation of caspases and reduction of the Bcl-2 expression also contribute to this action. The final result is the tumor cell apoptosis induction, as demonstrated in many *in vivo* as well as *in vitro* experiments. RNases bound to antibodies (anti Erb-2 and anti CD 22) were successfully tested in preclinical experimental studies. Experiments demonstrating synergism of onconase with cytostatics and interferons offer promising results.

Side effects belonging to factors restricting the use of cytostatics are only mild with the use of RNases. Experience with onconase application in more than 850 patients demonstrated the main undesirable effects to be „flu-like symptoms“, vasodilatation, paresthesia, peripheral oedemas, allergic reactions and nephrotoxicity manifested by proteinuria and sometimes also by renal function impairments.

The results of experiments and clinical trials suggest that inclusion of onconase and/or other RNases into chemotherapeutic protocols could contribute to enhancement of the therapeutic effects without increase of the toxicity.

Key words: anticancer drugs, onconase, anticancer ribonucleases, apoptosis induction.

Protinádorová chemoterapie jako hlavní léčebná metoda, která jediná ovlivňuje rovněž diseminované onemocnění a systémové malignity, je omezena řadou faktorů. Proto se stále hledají nové účinnější terapeutické postupy, které mohou klasickou chemoterapii doplnit nebo dokonce nahradit. Patří sem biomodulační, genová a antiangiogenní terapie, inhibitory růstových faktorů, faktorů signální transdukce, telomerázy, regulačních proteinů buněčného cyklu a transkripčních faktorů a induktory apoptózy (1). Jednou z perspektiv systémové protinádorové terapie je i použití enzymů štěpících kyselinu ribonukleovou – ribonukleáz /RNáz/.

Struktura a funkce RNázy byla studována od počátku 50. let. První zprávy o klinickém použití RNázy jsou již z roku 1958, kdy Aleksandrowicz po její aplikaci pacientům s chronickou

myeloidní leukemií pozoroval parciální odpověď (2) Řada přirozených i geneticky modifikovaných RNáz je v různých fázích výzkumu a některé z nich se jeví nadějně jako účinné protinádorové preparáty (3). RNáza z vajíček a embryí žaby *Rana pipiens* z čeledi skokanovitých – onkonáza (ranpirnáza) je již používána v léčbě mezoteliomu a v dalších indikacích (nema-lobuněčný karcinom plic, pokročilý karcinom prsu, karcinom ledviny) je předmětem klinických studií (1, 3, 4, 5, 6). Ve výzkumu protinádorových účinků RNáz zvláště bovinní seminální RNázy /BS RNáza/ získala skupina z ÚŽFG AV ČR v Liběchově a jejich spolupracovníků řadu priorit. Přesný mechanismus protinádorového účinku RNáz není dosud plně objasněn. RNázy s protinádorovým účinkem se adsorbují specificky na povrch pouze určitých buněk i když

pro ně nebyl nalezen žádný specifický receptor (7). Endocytózou vstupují do cytoplazmy a tam účinkují. Předpokládá se že cytostatický účinek je podmíněn převážně inhibicí proteosyntézy v důsledku štěpení tRNA (8). Dále se u některých RNáz uplatňuje i štěpení rRNA a prokázáno je i aktivace kaspázy 3, 8 a 9 a snížení exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 (9, 10, 11, 12, 13). Jednoznačně je však prokázáno řadou studií *in vitro* i *in vivo*, že konečným výsledkem působení RNáz na nádorovou buňku je indukce apoptózy (9, 10, 12, 14, 15). Indukce apoptózy je nezávislá na přítomnosti funkčního p53. To umožní použít tyto látky i u často se vyskytujících nádorů s inaktivací tohoto proteinu (9). Naše studie s buněčnými liniemi s experimentálně navozenou rezistencí k BS-RNáze ukazují, že na vzniku rezistence se může podílet zvýšená exprese Bcl-2 (15). Na druhou stranu jsou buněčné linie rezistentní k řadě cytostatik (antracykliny, vinca alkaloidy, cisplatinu) citlivé k BS-RNáze jak *in vitro* tak i *in vivo* (14, 15, 16, 17). Byly rovněž připraveny také tak zvané imunoRNázy, což jsou RNázy navázané na protilátku. V pokusu na zvířeti byla testována lidská pankreatická RNáza navázaná na variabilní fragment lidské protilátky proti ErbB-2, která byla účinná proti nádorům exprimujícím tento receptor (4, 18). Na imunodeficitních myších s transplantovaným lidským Burkittovým lymfomem byl ověřen efekt onkonázy navázané na myší monoklonální protilátku proti antigenu CD22 (19). BS RNázu jsme úspěšně použili k experimentálnímu čištění štěpů periferních hematopoetických progenitorových buněk od kontaminace neuroblastomem bez poškození jejich schopnosti obnovit krevtvorbu (20). Protože ve všech tělních tekutinách jsou přítomny inhibitory RNáz /RI/ jsou RNázy *in vivo* účinné pouze pokud jsou k nim rezistentní. Rezistentní k RI jsou oligomerní RNázy – jediná přirozená je dimerní BS RNáza, arteficiální oligomery RNáz nebo RNázy navázané na polymery (21, 22, 23). Výjimku tvoří monomerní onkonáza, která je k RI rezistentní protože se na ně váže s velmi nízkou afinitou (24). K RI jsou rovněž rezistentní některé modifikace RNázyA připravené metodami genového inženýrství nebo RNáza A navázaná na polymery (22, 23, 24). Nemodifikovaná RNázaA je k RI vysoce citlivá. RNázy navázané na polymery nejen odolávají účinkům RI, ale jsou pomaleji eliminovány z organismu (23). V experimentech *in vitro* jsou RNázy navázané na polymery prakticky neúčinné i když jsou *in vivo* účinnější než RNázy nenavázané (15, 22, 23, 25).

Velkou nadějí pro klinickou praxi vzbuzují experimenty *in vitro* i *in vivo*, které prokazují synergismus onkonázy s cytostatiky a s interferony (26, 27, 28, 29, 30). Cytostatický účinek onkonázy na buněčnou linii OVCAR-3 odvozenou od ovariálního karcinomu byl potencován tamoxifenem, lovastinem a cisplatinou (27). Účinek tamoxifenu na buněčnou linii odvozenou od karcinomu pankreatu se zvyšoval po přidání onkonázy (30) Doxorubicin potencoval cytotoxicitu onkonázy na linii lidského karcinomu prsu MDA-MB-231 transplantovanou imunodeficitním myším (26). Synergismus s interferonem gama byl popsán u linií HL-60 (promyelocytární leukemie) a MCF-7 (karcinom prsu), ale ne u SK-Hep-1 (adenokarcinom jater) (28). Jiná studie prokazuje potenciaci účinku onkonázy interferonem beta na linii karcinomu prostaty JCA-1 (29). Společné působení onkonázy a interferonu vyvolává vyšší aktivaci kaspáz. V současné době probíhá klinická studie srovnávající efekt doxorubicinu a doxorubicinu v kombinaci s onkonázou u pacientů s mesotheliomem.

Co se týče nežádoucích účinků, které jsou jedním z hlavních faktorů limitujících použití cytostatik, jsou převážně méně závažné. Pokusy na zvířatech i klinické studie prokazují, že RNázy nejsou myelotoxické (4, 31). *In vitro* pokusy prokázaly, že BS RNáza a dimer lidské pankreatické RNázy byly účinné pouze proti buněčným liniím odvozeným od lidského nebo myšího karcinomu štítné žlázy, ale ne odvozených z normálních buněk lidské nebo myší štítné žlázy, na rozdíl od doxorubicinu který poškozoval i buňky nenádorové (13). Zkušenosti s použitím onkonázy u více než 850 pacientů ukázaly, že má jako hlavní nežádoucí účinek „flu-like symptom“, vasodilataci, parestezie, periferní otoky, alergické reakce a nejčastěji nefrotoxicitu, která se projevuje proteinurií a v horším případě i zhoršením renálních funkcí. (4, 5).

Jak naznačují výše zmíněné výsledky experimentů *in vitro* i *in vivo* a klinických studií zařazení onkonázy eventuálně jiných RNáz s protinádorovými účinky do chemoterapeutických režimů by mohlo přispět ke zvýšení jejich účinku bez výraznějšího zvýšení toxicity.

Experimenty s RNázami prováděné autory jsou financovány GA ČR grant č.523/04/0755 a výzkumnými záměry MŠMT č. 0021620813.

Literatura:

- Klener P: Klinická onkologie. Galén, Praha 2002
- Aleksandrowicz J.: Intracutaneous ribonuclease in chronic myeloid leukemia. Lancet, 1958; 1: 420- 422
- De Lorenzo C, Di Gaetano S, Notomista E et al.: Human antitumor RNases and ImmunoRNases. Abstracts, 7th International Meeting on Ribonucleases, June 16- 20, 2005, Stara Lesna
- Mikulski SM, Costanzi JJ, Vogelzang NJ et al.: Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirinase in patients with unresectable malignant mesothelioma. J. Clin. Oncol., 2002; 20: 274- 281
- Vogelzang NJ, Aklilu M, Stadler WM et al.: A phase II trial of weekly intravenous ranpirinase (Onconase), a novel ribonuclease in patients with metastatic kidney cancer. Investigational New Drugs 19: 255-260, 2001
- Leland PA, Raines RT: Cancer chemotherapy- ribonucleases to the rescue. Chem Biol., 2001;8:404- 413
- Mastronicola MR, Piccoli R, D'Alessio G: Key extracellular steps in the antitumor action of seminal ribonuclease. Eur.J.Biochem., 1995; 230: 242- 249
- Lee I, Lee YH, Mikulski SM et al.: Tumorinhibitory effects of onconase on various tumors. J. Surg.Oncol., 2000; 73: 164- 171
- Iordanov MS, Ryabinina OP, Wong J et al.: Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease Onconase: Evidence for cytotoxic mechanism different from inhibition of protein synthesis. Cancer Res., 2000; 6: 1983- 1994
- Kotchetkov R, Cinatl J, Krivtchik AA et al.: Selective activity of BS-RNase against anaplastic thyroid cancer. Anticancer Res., 2001; 21:1035- 1042
- Schindler DG, Davies JE: Specific cleavage of ribosomal RNA caused by by alpha sarcin. Nucl. Acids res., 1977; 4: 1097- 1110

- Spalletti-Cernia D, Sorrentino R, Di Gaetano S et al.: Antineoplastic ribonucleases selectively kill thyroid carcinoma cells via caspase-mediated induction of apoptosis. J. Clin. Endocrinol. Metab., 2003; 88: 2900- 2907
- Spalletti-Cernia D, Sorrentino R, Di Gaetano S et al.: Highly selective toxic and proapoptotic effects of two dimeric ribonucleases on thyroid cancer cells compared to the effects of doxorubicin. Br. J. Cancer., 2004; 90: 270- 277
- Eckschlagler T, Matoušek J, Cinatl J Jr., Cinatl J.:Effect of BS RNase on chemosensitive and chemoresistant neuroblastoma cell lines. Abstracts, 6th International Meeting on Ribonucleases, University of Bath, June 14-18, 2002, Bath,
- Eckschlagler T, Hraběta J, Škvor J et al.: Effect of RNases of different origin on chemosensitive and chemoresistant neuroblastoma cell lines. Abstracts, 7th International Meeting on Ribonucleases, June 16- 20, 2005, Stara Lesna
- Cinatl J Jr, Cinatl J, Kotchetkov R et al.: Bovine seminal ribonuclease selectively kills human multidrug-resistant neuroblastoma cells via induction of apoptosis. Int.J. Oncol., 1999; 15: 1001- 1009
- Cinatl J Jr, Cinatl J, Kotchetkov R et al.: Bovine seminal ribonuclease exerts selective cytotoxicity toward neuroblastoma cells both sensitive and resistant to chemotherapeutic drugs. Anticancer Res., 2000; 20: 853- 859
- De Leronzo C, Arciello A, Cozzolino R et al.: A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. Cancer Research, 2004; 64: 4870- 4874
- Newton DL, Hansen HJ, Mikulski SM et al.: Potent and specific antitumor effects of an anti-CD22-targeted cytotoxic ribonuclease: potential for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. Blood 2001;97: 528-535

20. Cinátl J jr., Cinátl J, Kotechetkov R et al.: Bovine seminal ribonuclease depleted multidrug resistant human neuroblastoma cells from ex vivo expanded blood derived CD34+ hematopoietic progenitor cells. 5th International Meeting on Ribonucleases. May 12- 16, Warrenton 1999
21. Di Gaetano S, D'Alessio G, Picocoli: second generation antitumour human RNase: significance of its structural and functional features for the mechanism of antitumour action. *Biochem J.*, 2001;358: 241- 247
22. Matoušek J, Poučková P, Souček J, Škvor J: PEG chains increase asprematogenic and antitumor activity of RNase A and BS-RNase enzymes. *J. Control. Release*, 2002; 82. 29- 37
23. Matoušek J, Poučková P, Hloušková B et al.: Effect of hyakuronidase and PEG chain conjugation on the biologic and antitumor activity of RNase A. *J. Control. Release*, 2004; 94: 401- 410
24. Leland PA, Schultz LW, Byung-Moon K, Raines RT et al.: Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998; 95: 10407- 10412
25. Souček J, Poučková P, Zadinová M et al.: Polymer conjugated bovine seminal ribonuclease inhibits growth of solid tumors and development of metastases. *Neoplasma*, 2001; 48: 127- 132
26. Mikulski SM, Newton DL, Wiltout RH et al.. Onconase and doxorubicin synergy in prolonging survival of MDA-MB-231 human breast cancer-bearing nude mice. *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.* 1999; 40: 491
27. Mikulski SM, Viera A, Shogen K: In vitro synergism between anovel amphibian oocytic ribonuclease (Onconase) and tamoxifen, lovastatin, and cisplatin in human OVCAR-3 ovarian carcinoma cell line. *Int. J.Oncol.*, 1992; 1:779- 785
28. Tang CH, Hu CC, Wei CW, Wang JJ: Synergism of *Rana catesbeiana* ribonuclease and IFN-gamma triggers distinct death machineries in different human cancer cells. *FEBS Lett.*, 2005; 579: 265- 270
29. Tsai SY, Hsieh TC, Ardelt B et al.: Combined effects of onconase and IFN-beta on proliferation, macromolecular synthesis and expression of STAT-1 in JCA-1 cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 2002; 20. 891- 896
30. Lee I, Lee YH, Mikulski SM, Shogen K: Effect of ONCONASE +/- tamoxifen on ASPC-1 human pancreatic tumors in nude mice. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 530: 187-196
31. Souček J, Chudomel V, Potměšilová I a Novák JT.: Effect of Ribonucleases on cell-mediated lympholysis reaction and on GM-CFC colonies in bone marrow culture. *Nat.Immun.Cell Growth Regul.*,1986; 5: 250- 258