

Received: 2007.05.28
Accepted: 2007.10.23
Published: 2007.11.05

Atelokolagen jako potencjalny nośnik terapeutyków*

Atelocollagen as a potential carrier of therapeutics

**Tomasz Wysocki, Izabela Sacewicz, Magdalena Wiktorska,
Jolanta Niewiarowska**

Katedra i Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Kolagen jest białkiem powszechnie występującym w organizmach zwierzęcych stanowiąc czasami nawet 25% masy wszystkich białek. Dotychczas opisano jego 28 typów, z czego typ I jest najpowszechniejszy. Wykorzystanie tego białka w medycynie jest ryzykowne, głównie ze względu na wysoką immunogenność oraz ryzyko wprowadzenia do organizmu pacjenta wirusów czy prionów.

Atelokolagen jest pochodną kolagenu typu I, w którym na skutek trawienia pepsyną usunięto telopeptydy odpowiedzialne w głównej mierze za immunogenność białka. Pierwsze doniesienia o wykorzystywaniu atelokolagenu sięgają lat 70 ub.w. Zastosowanie znalazł wtedy jako biomateriał w inżynierii tkankowej. Ostatnie doniesienia wskazują jednak, że dzięki swoim unikalnym właściwościom, takim jak mała immunogenność, stan ciekły w temperaturze 4°C i stały w 37°C oraz silny ładunek dodatni (pI 9) może być z powodzeniem wykorzystywany jako nośnik białek o ujemnym ładunku i kwasów nukleinowych w systemach dostarczania leków. Na uwagę zasługuje również prostota przygotowywania kompleksów terapeutyk/atelokolagen oraz to, że w zależności od stężenia tego drugiego terapeutyk może być wprowadzany do organizmu lokalnie bądź systemowo.

W pracy zebrano doniesienia na temat wykorzystywania atelokolagenu jako nośnika wykorzystwanego *in vivo* dla białek i kwasów nukleinowych (plazmidów, antysensowych oligodeoksy nukleotydów i siRNA) w zwalczaniu chorób dziedzicznych i nowotworów. Wskazują one na to, iż jest to – jak dotąd – jedyny nośnik, który może być używany *in vivo* bez żadnego ryzyka i można z nim wiązać duże nadzieje w terapii genowej.

Słowa kluczowe: atelokolagen • siRNA • terapia genowa

Summary

Collagen is a very abundant protein that makes up about 25% of the total protein in animal organisms. Of the 28 types of collagen described so far, type I is the most common. Applying collagen in medical treatment is dangerous and may be harmful to patients due to its high immunoreactivity and the risk of contamination with viruses or prions. The immunogenicity of collagen I can be significantly reduced by digestion with pepsin, resulting in the release of telopeptides containing mostly antigenic epitopes. The major product of the digestion is called atelocollagen, which was used for the first time in tissue engineering already in the 1970s. Recent data indicate that due to its rare properties, such as low immunogenicity, liquid state at 4°C, and solid state at 37°C as well as its strong positive charge (pI 9), it may be used as a carrier of negatively charged proteins and nucleic acids. In addition, such complexes of atecollagen/therapeutics are easy to obtain and, depending upon the concentration of atelocollagen, they may be used to provide

* Praca jest finansowana z projektu własnego Uczelni nr 502-16-650.

therapeutics to the organism locally or in a systemic manner. In this review the practical application of atelocollagen used as a carrier of proteins and nucleic acids (plasmids, antisense oligodeoxynucleotides, and siRNA) to treat inherited diseases and cancers is critically discussed. The observations described indicate that it is an optimal vehicle to transport medication which may be used *in vivo* with very limited risk. Therefore, atelocollagen has the potential to contribute significantly to the further development of gene therapy.

Key words: atelocollagen • siRNA • gene therapy

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11472.pdf

Word count: 4262

Tables: –

Figures: 2

References: 57

Adres autorki: prof. Jolanta Niewiarowska Katedra i Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; jolan@zdn.am.lodz.pl

Wykaz skrótów: **bFGF** – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; **DDS** – system dostarczania leków; **dsRNA** – dwuniciowy RNA; **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa; **EGFR** – receptor naskórkowego czynnika wzrostu; **FAP** – rodzinna polineuropatia amyloidowa; **FGF-4** – czynnik wzrostu fibroblastów 4; **ICAM-1** – międzykomórkowe białko adhezyjne 1; **IFN- α** – interferon α ; **IL-2** – interleukina 2; **LFA** – antygen związany z funkcją leukocytów; **NGF** – czynnik wzrostu nerwów; **ODC** – dekarboksylaza ornitynowa; **ODNs** – oligodeoksynukleotydy antysensowe; **RNAi** – interferujący RNA; **siRNA** – mały interferujący RNA; **SSOs** – jednoniciowe oligonukleotydy; **TGF- β_3** – transformujący czynnik wzrostu β_3 ; **VEGF** – czynnik wzrostu komórek śródbłonna naczyń.

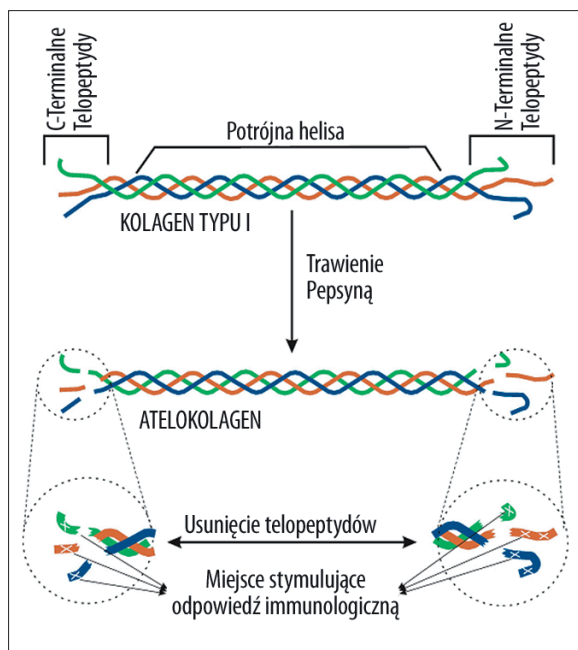
WSTĘP

Kolagen jest białkiem występującym w wielu tkankach i narządach stanowiąc niekiedy 25% masy wszystkich białek budujących dany organizm. Jest obecny w kościach, zębach, ścięgnach oraz w rogówce. Będąc głównym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix – ECM) razem z keratyną odpowiada za elastyczność i wytrzymałość skóry. Dotychczas opisano 28 typów kolagenu, spośród których typ I występuje najpowszechniej.

Kolagen ma charakterystyczny układ budujących go aminokwasów. Glicyna w tym białku powtarza się niemal co trzeci aminokwas. Oprócz tego bogaty jest w prolinę oraz w zmodyfikowane potranslacyjnie: hydroksyprolinę i hydroksylizynę. O zasadowości atelokolagenu decyduje obecność lizyn (pI 9,82) i arginin (pI 10,76) dzięki czemu w warunkach fizjologicznych (pH 6,8 do 7,5) pI atelokolagenu wynosi 9,0. Jego strukturę trzeciorzędową budują trzy lewoskrętne łańcuchy polipeptydowe nazywane łańcuchami α tworzące razem prawoskrętną potrójną helisę, utrzymywaną poprzez liczne wiązania wodorowe. Za strukturę drugorzędową każdego z polipeptydów jest odpowiedzialna – dzięki swojej pierścieniowej budowie – hydroksyprolina. Konformacja potrójnej helisy jest utrzymywana głównie dzięki występującej regularnie w każdym z trzech łańcuchów glicynie. Jest ona najmniejszym biogennym aminokwasem, co pozwala na ścisłe upakowanie łańcuchów polipeptydowych i formowanie superhelisy. Wymienione wcześniej zmodyfikowane potranslacyjnie aminokwasy są odpowiedzialne za stabilizację struktury helisy. Brak w or-

ganizmie żywym warunków umożliwiających hydroksylację proliny, takich jak niedobór kwasu askorbinowego pociąga za sobą poważne konsekwencje zdrowotne. Przykładem tego jest skorbut, choroba powszechna w XIX wieku wśród marynarzy spowodowana niedoborem witaminy C. Na skutek braku kwasu askorbinowego hydroksylacja proliny jest zahamowana i nowo zsyntetyzowane polipeptydy kolagenu nie mogą przybrać odpowiedniej struktury drugorzędowej, co prowadzi do ich degradacji wewnątrz komórki. Niemożliwość zsyntetyzowania funkcjonalnego kolagenu połączona ze stałą degradacją istniejących już włókien kolagenowych prowadzi do znacznych ubytków tego białka. następstwem tego jest wypadanie zębów i wyjątkowa podatność naczyń krwionośnych na uszkodzenia. Potrójna helisa ma długość 300 nm i średnicę 1,5 nm. Na obu końcach struktury znajdują się telopeptydy odpowiedzialne za immunogenność białka [22]. Zastosowanie kolagenu w medycynie jako biomateriału, mimo jego powszechnego występowania w organizmach, może być ryzykowne, głównie ze względu na dużą immunogenność oraz ryzyko wprowadzenia do organizmu pacjenta – na skutek niedokładnego oczyszczenia – wirusów lub prionów.

Pierwsze informacje na temat atelokolagenu pochodzą z 1974 roku [43]. Jest to przetworzony zwierzęcy kolagen typu I, w którym na skutek trawienia pepsyną usunięto telopeptydy odpowiedzialne za jego immunogenność (ryc. 1). Po dokładnym oczyszczeniu jest biokompatybilnym i nieimmunogennym biomateriałem o szerokim zakresie zastosowań. Małą immunogenność oczyszczonego białka potwierdziły badania przeprowadzone na 705 pa-



Ryc. 1. Otrzymywanie atelokolagenu

centach, którym wszczepiono implant zbudowany z atelokolagenu [4]. Reakcję alergiczną stwierdzono zaledwie u 3,8%, a lokalną reakcję zapalną u 2,3% badanych. Jedną z cennych właściwości atelokolagenu jest stały stan skupienia w 37°C i płynny w 4°C. Procesem suszenia tego biomateriału można w taki sposób sterować, aby w zależności od przeznaczenia otrzymywać go w pożądanej postaci [41]. Najczęściej wykorzystywanymi formami atelokolagenu są roztwór wodny, żel, proszek, włókna, błona, film, rurka, minipellet oraz gąbka. Roztwór wodny atelokolagenu oraz minipellet znalazły zastosowanie jako Systemy Dostarczania Leków (Drug Delivery System – DDS); postaci gąbki i żelu wykorzystywane są w inżynierii tkankowej [10,32,39,57]; błonę, film, rurkę oraz włókna zastosowano m.in. w materiałach wspomagających gojenie ran oraz w tworzeniu sztucznych naczyń krwionośnych [41].

Chociaż atelokolagen początkowo był głównie stosowany w inżynierii tkankowej, to pojawiające się ostatnio doniesienia dotyczące użycia go jako nośnika białek i kwasów nukleinowych *in vitro* i *in vivo* wskazują, że jego całkowity potencjał nie został jeszcze odkryty i wykorzystany.

1. INŻYNIERIA TKANKOWA

Inżynieria tkankowa polega na wykorzystaniu komórek i niektórych biomateriałów do otrzymywania tkanek lub organów *in vitro*, których przeznaczeniem jest naprawa lub zastąpienie uszkodzonych bądź zniszczonych tkanek w organizmie żywym. Gavenis i wsp. [10] w swoich badaniach nad wyborem odpowiedniego biomateriału do hodowli ludzkich chondrocytów przetestowali różne postaci atelokolagenu. Wykazali oni łatwość hodowli tych komórek w żelu oraz ich lepsze przyleganie do niego niż do gąbki. Chondrocyty wykorzystano także w badaniach nad regeneracją stawów kolanowych. Udowodniono, że komórki te hodowane na żelu atelokolagenowym przyspieszają proces regeneracji chrząstek stawowych [32].

Atelokolagen w postaci żelu nadaje się również do hodowli prekursorowych komórek mezenchymalnych (human placenta-derived mesenchymal cells – hPDMCs) izolowanych z kosmka kości łyszka. Autorom udało się przekształcić hPDMCs w chondrocyty wykorzystując podczas hodowli czynniki wzrostu: bFGF i TGF- β_3 [57]. Inna japońska grupa badająca degenerację krążka międzykręgowego wykorzystwała mezenchymalne komórki macierzyste (mesenchymal stem cells – MSC) osadzone w żelu atelokolagenowym do regeneracji dysków w zwierzęcych modelach choroby [39]. MSC są obecne w organizmie ludzkim w niewielkich ilościach we krwi pępowinowej, szpiku kostnym i okostnej. W badaniach przeprowadzanych *in vitro* wykazano, że atelokolagen w postaci żelu wiązał 90% wszystkich MSC. Tak przygotowaną mieszaninę schładzano do 4°C, dzięki czemu żel zachowywał stan płynny i mógł być precyzyjnie wprowadzony do uszkodzonego dysku królika. Osiem tygodni po przeszczepie zaobserwowano wyraźną poprawę, a całkowitą regenerację dysku stwierdzono po 18 tygodniach.

2. ATELOKOLAGEN JAKO NOŚNIK W DDS

Jednym ze sposobów na poprawę właściwości farmakokinetycznych oraz dystrybucji zarówno nowych, jak i już opracowanych leków jest projektowanie nośników dla substancji terapeutycznych [30]. Opracowanie wydajnego i bezpiecznego systemu dostarczającego terapeutyk do komórek ludzkiego organizmu jest jednak bardzo trudne. Nośniki niewirusowe, takie jak liposomy kationowe czy dendrymery są mało wydajne, często nie biodegradowalne, co prowadzi do akumulacji w organizmie i koniecznym staje się ich chirurgiczne usuwanie [41]. Ponadto często są one toksyczne dla makroorganizmów i wywołują odpowiedź immunologiczną. Natomiast nośniki wirusowe, mimo że cechuje je duża wydajność, mają wiele wad: nie nadają się do przenoszenia białek, a jedynie kwasów nukleinowych, generują odpowiedź immunologiczną powodując ich eliminację z organizmu, a niekiedy i groźne powikłania. Dlatego też, w świetle ukazujących się prac badawczych, wykorzystanie atelokolagenu jako nośnika wydaje się obiecującym rozwiązaniem. Za możliwością wykorzystania go w systemach DDS przemawia wiele jego cech, takich jak: duża zawartość prolina, hydroksyprolina oraz hydroksylizyna, które powodują, że może on wiązać znaczne ilości białek o ujemnym ładunku, łączonych najczęściej z minipelletami, a także kwasy nukleinowe w roztworach atelokolagenu o różnych stężeniach. Usunięcie telopeptydów sprawia, że atelokolagen nie indukuje odpowiedzi immunologicznej [41]. Ponieważ kolagen typu I ulega w organizmie reakcjom katabolicznym, wprowadzonego atelokolagenu nie trzeba usuwać. Proces biodegradacji zachodzi stopniowo, co umożliwia kontrolowanie uwalniania terapeutyku. Dzięki temu można nie tylko obniżyć ilość stosowanego leku, ale również zmniejszyć częstość wprowadzania nowych dawek. Kolejną zaletą tego nośnika jest, przy domiejskowym podawaniu terapeutyku, możliwość szybkiego usunięcia go w przypadku reakcji zapalnej lub alergicznej, ponieważ w 37°C atelokolagen zestala się.

2.1. Transportowanie białka

Atelokolagen jako nośnik białek jest wykorzystywany przede wszystkim pod postacią minipelletu. Powstaje on

poprzez suszenie na powietrzu roztworu otrzymanego ze zmieszania atelokolagenu i białka w dużych stężeniach. Suszenie odbywa się w łagodnych warunkach, dzięki czemu możliwe jest nadawanie mu dowolnego kształtu. Wysuszony minipellet ma najczęściej kształt cylindra o średnicy 0,9 mm i długości 10 mm i jest wprowadzany domięśniowo do organizmu lub w pobliżu miejsca docelowego. Proces uwalniania leku z tej postaci atelokolagenu jest skomplikowany, a jego szybkość zależy od kształtu i długości minipelletu oraz ilości związanego białka [24].

2.1.1. Interferon

Interferon jest stosowany w leczeniu wielu chorób wirusowych, m.in. w przewlekłej żółtacze typu C. Ze względu na jego krótki okres półtrwania najczęściej przeprowadzana terapia wymaga domięśniowych zastrzyków jeden raz dziennie lub trzy razy w tygodniu. Długotrwałe podawanie interferonu wywołuje działania niepożądane, takie jak gorączka, ogólne zmęczenie, anoreksja czy depresja. Grupa Fujioki [8] opracowała nowy sposób dostarczania interferonu α (IFN- α). Wprowadzano go podskórnie królikom w minipelletcie. Terapeutyk był uwalniany stopniowo i stężenie IFN- α w surowicy, zapewniające działanie terapeutyczne, utrzymywało się przez tydzień. Naukowcy odkryli także, iż dzięki modyfikacji kształtu nośnika możliwe jest kontrolowanie ilości uwalnianego białka: minipellet o mniejszej średnicy i większej długości uwalnia duże ilości białka w krótkim czasie, natomiast białko uwalniane jest wolniej, w mniejszych ilościach i dłużej jeśli ma większą średnicę. Kolejne badania Fujioki wykazały, że IFN- α wprowadzany z użyciem minipelletu ma znacznie łagodniejsze działania niepożądane w porównaniu z zastrzykami domięśniowymi [38].

2.1.2. Interleukina 2

Interleukina 2 (IL-2) była pierwszą cytokiną, której struktura chemiczna została całkowicie poznana. Białko to bierze udział w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, np. w proliferacji i różnicowaniu limfocytów T, czy indukcji komórek LAK (lymphokine activated killer) i NK (natural killer). Z tego powodu wykorzystuje się ją w zwalczaniu niedoborów odporności. Niestety, czas półtrwania IL-2 w osoczu jest krótki, co wymusza stosowanie dużych dawek tej cytokiny. Ponadto, aby komórki LAK uległy aktywacji konieczne jest podwyższone stężenie IL-2 w organizmie przez 2–3 dni. Wydaje się, że zastosowanie minipelletu może rozwiązać te problemy. Matsuoka i wsp. donieśli o skutecznym podawaniu rekombinowanej ludzkiej IL-2 w tym nośniku, czego następstwem było równomierne uwalnianie IL-2 *in vivo* [26]. Stężenie IL-2 u myszy było najwyższe 6 godzin po podaniu, po czym zaczęło się stopniowo obniżać, jednak obecność białka w osoczu była jeszcze wykrywalna 72 godziny po iniekcji. Potwierdzeniem tezy, że IL-2 jest systematycznie uwalniany z tej postaci atelokolagenu są wyniki badań Shiozaki i wsp., którzy stosując powyższą terapię zauważyli znaczący wzrost aktywności komórek NK i LAK w śledzionie myszy [42]. Kolejna grupa naukowców badała działanie przeciwnowotworowe związane z aktywacją komórek LAK przez IL-2 w zwierzęcym modelu włókniakomięsaka [9]. Mysiom dostarczano IL-2 w postaci wodnego roztworu lub z atelokolagenem w postaci minipelletu. IL-2

dostarczana za jego pośrednictwem powodowała znaczne zahamowanie wzrostu guza w porównaniu z IL-2 podawaną w roztworze wodnym. Analiza histologiczna ujawniła ponadto, iż u tych myszy dochodziło do znaczącej penetracji mięszu przez komórki LAK oraz nekrozy komórek nowotworowych.

2.1.3. Czynniki wzrostu

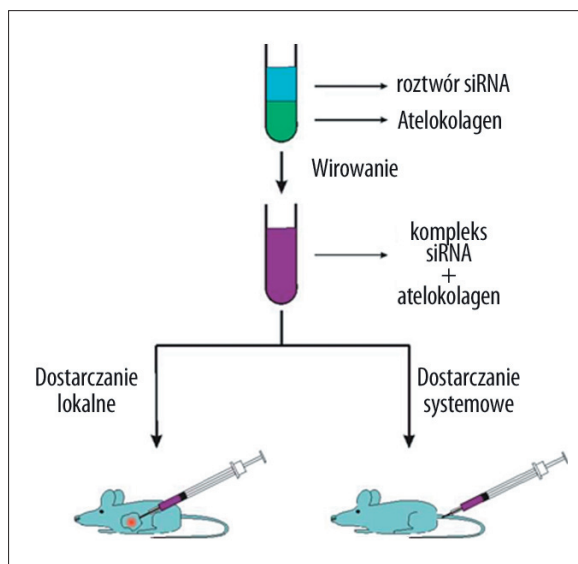
Czynnik wzrostu nerwów (neural growth factor – NGF) jest rozpatrywany przez naukowców jako obiecujący terapeutyk w leczeniu chorób ośrodkowego układu nerwowego, takich jak np. choroba Alzheimera. Ze względu na barierę krew-mózg nie przenika do ośrodkowego układu nerwowego. W celu zbadania dystrybucji terapeutyku i sprawdzenia jego wpływu na przeżywalność komórek piramidalnych hipokampa po niedotlenieniu Yamamoto i wsp. wszczepili myszokoczkom minipellet zawierający NGF [54]. Autorzy odnotowali jego duże stężenie w tkance mózgowej utrzymujące się przez kilka dni.

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor – bFGF) jest białkiem odpowiedzialnym m. in. za proliferację chondrocytów i może być stosowany jako lek przyspieszający gojenie się złamań. bFGF wprowadzany w minipelletcie, bezpośrednio w miejscu wywołania urazu na kości udowej, wykazał znaczącą stymulację formowania się kości w króliczym modelu doświadczalnym. Całkowite wypełnienie uszkodzonego obszaru kostną nastąpiło po 6 tygodniach od rozpoczęcia terapii [23].

2.2. Terapia genowa

Terapia genowa jest strategią polegającą na wprowadzeniu genów do komórek i tkanek w celu zwalczania chorób wywołanych obecnością odmiennego allelu. Głównym jej celem jest zamiana defektywnego allelu na funkcjonalny. Mimo że założenia terapii genowej są stosunkowo proste, efektywność tej strategii w żywych organizmach znajduje się nadal na niezadowolającym poziomie. Komórki eukariotyczne przyjmują obcy materiał genetyczny słabo albo wcale [33]. Głównym problemem są nośniki materiału genetycznego, a właściwie brak wydajnych i zarazem bezpiecznych. Ze względu na pochodzenie wyróżniamy dwa rodzaje tych materiałów: wektory, będące zmodyfikowanymi wirusami oraz nośniki, przeważnie pochodzenia syntetycznego. Niestety, obie grupy mają swoje wady utrudniające stosowanie ich w organizmach żywych. W przypadku wirusów istnieje ryzyko infekcji oraz wywołanie odpowiedzi immunologicznej, a w przypadku nośników mała wydajność, brak degradacji w organizmie oraz toksyczność. Z tych właśnie powodów naukowcy zajmujący się terapią genową zaczęli interesować się atelokolagenem. Ten nowy potencjalny nośnik ma wiele zalet: nie jest immunogeny, wydajnie wiąże DNA i RNA stopniowo je uwalniając, a w zależności od jego stężenia terapeutyk można dostarczać do organizmu lokalnie bądź systemowo (ryc. 2). Ponadto wiążąc zarówno dwuniciowe, jak i jednoniciowe DNA kompleks przybiera strukturę włókna o różnej grubości, skutecznie chroniące kwas nukleinowy przed nukleazami [16].

Jedną z pierwszych publikacji poświęconych zastosowaniu zmodyfikowanego kolagenu typu I w terapii genowej



Ryc. 2. Sposoby dostarczania terapeutyku z wykorzystaniem wodnego roztworu atelokolagenu

jest praca Ochiya i wsp., którzy wykorzystali minipellet jako nośnik plazmidu z wklonowanym cDNA prekursora czynnika wzrostu fibroblastów 4 (HST-1/FGF-4) [33]. Białko to ma właściwości antyapoptyczne [13] i zostało pierwszy raz zidentyfikowane jako produkt onkogenu występującego w mięsaku Kaposiego [56]. Jego podwyższony poziom obserwuje się również w większości nowotworów linii generatywnej [12]. Ponieważ HST-1/FGF-4 indukuje powstawanie płytek krwi z megakariocytów, jego niedobór może wywoływać u ludzi małopłytkowość [33]. W celu zbadania potencjalnych możliwości jej leczenia badacze posłużyli się zwierzęcym modelem choroby. Atelokolagen zawierający plazmid i 30% glukozy został uformowany w minipellet i wprowadzony do mięśnia szkieletowego 7-tygodniowych myszy. Takie miejsce i sposób dostarczania terapeutyku wybrano na podstawie dużej liczby publikacji wskazujących, iż komórki mięśni poprzecznych prążkowanych mogą być wydajnymi „bioreaktorami” do syntezy białka w oparciu o egzogeny materiał genetyczny [2,21,25,51,52]. Wykazano, że plazmid był stopniowo uwalniany z minipelletu. Podwyższonemu poziomowi białka HST-1/FGF-4 w osoczu zsyntetyzowanego przez miocyty, do których wprowadzono plazmid, towarzyszył dwukrotny wzrost liczby płytek krwi, co było wystarczające do zwalczenia małopłytkowości. Co więcej, białko było jeszcze wykrywalne 60 dni po wprowadzeniu plazmidu w minipellecie.

Atelokolagen jako nośnik został wykorzystany również w konwersji genu transtyretyny, białka odpowiedzialnego za transport tyroksyny [28]. Jeden z alleli tego genu jest odpowiedzialny za występowanie rodzinnej polineuropatii amyloidowej (familial amyloid polyneuropathy – FAP). Choroba ta powoduje nagromadzenie się włókien amyloidowych w nerwach obwodowych i narządach prowadząc do zaburzeń w przekaźnictwie sygnałów, a co za tym idzie do dysfunkcji całych narządów i zaburzeń w koordynacji ruchowej. By dokonać konwersji szkodliwego allelu na prawidłowy posłużono się specjalnie do tego celu zaprojektowanymi chimerowymi cząsteczkami RNA/DNA (chi-

meraplastami) oraz jednoniciowymi oligonukleotydami (single-stranded oligonucleotides – SSOs). Chimeraplasty są bardzo wyrafinowanym narzędziem do naprawy mutacji punktowych w docelowych genach [5,55]. Zawierają one krótkie regiony korekcyjnego DNA połączonego z długimi łańcuchami 2'-O-metylo RNA tworzącymi struktury drugorzędowe: spinki do włosów i GC clamp, które zwiększają trwałość chimeraplastów w komórce. Strategia ich wykorzystywania w konwersji genów *in vitro* i *in vivo*, mimo iż odnosi sukcesy [1,17,18,19,54], dla genu transtyretyny nie była skuteczna. Badacze nie byli w stanie jednoznacznie stwierdzić przyczyny niepowodzenia. Jako najbardziej prawdopodobne podali trudności w syntezie oraz oczyszczaniu funkcjonalnych chimeraplastów, gdyż te dwa czynniki mają największy wpływ na konwersję genu [36]. Efekt terapeutyczny osiągnięto dopiero po podaniu jednoniciowych oligonukleotydów razem z atelokolagenem. W mysim modelu polineuropatii konwersja genu zachodziła w tkance na poziomie 8,7%, a w osoczu poziom dzikiego białka transtyretyny wynosił 7,7%.

2.2.1. Terapia antysensowa

Mechanizm terapii antysensowej, chociaż rozpatrywanej razem z terapią genową, jest inny. Jej celem jest zablokowanie ekspresji zmutowanego allelu poprzez niedopuszczenie do zsyntetyzowania niepożądanego białka uprzednio powodując degradację jego mRNA. W tym celu wykorzystuje się różne strategie. Ponieważ w cytoplazmie heteroduplexy DNA/RNA są natychmiast degradowane, możliwe jest wprowadzenie oligodeoksynukleotydów komplementarnych do określonej sekwencji mRNA, lub wykorzystanie zjawiska interferencji RNA – poprzez wprowadzenie małego interferującego RNA (small interfering RNA – siRNA) zaprojektowanego w celu wyciszenia określonego transkryptu.

2.2.1.1. Oligodeoksynukleotydy antysensowe

Na potencjalną możliwość wykorzystania atelokolagenu w transferze oligodeoksynukleotydów antysensowych (antisense oligodeoxynucleotides – ODNs) *in vitro* uwagę zwrócili Honme i wsp. [14]. Naukowcy podkreślili prostotę takiego transferu. ODNs dodawano do roztworu atelokolagenu, mieszano i pokrywano nim szalkę, po czym suszono na powietrzu. Następnie dodawano zawiesinę komórek. Kompleks DNA lub RNA z atelokolagenem powstaje na skutek oddziaływań elektrostatycznych między ujemnie naładowanymi cząsteczkami kwasów nukleinowych, a dodatnio naładowanym atelokolagenem. W ludzkiej linii komórkowej nowotworu jąder NEC8, do których wprowadzono ODNs przeciwko HST-1/FGF-4 zaobserwowano znaczne zahamowanie ekspresji tego białka. Honme potwierdził także przydatność atelokolagenu do transportu plazmidowego DNA i adenowirusów, przy czym ekspresja genu wprowadzonego do komórek była odnotowana nawet po 52 dniach od transfekcji. W innych badaniach poświęconych białku HST-1/FGF-4 podjęto próbę wyciszenia jego ekspresji w mysim modelu ludzkiego nowotworu jąder [12]. Komórki nowotworowe NEC8 wstrzykiwano do jąder zmutowanych, pozbawionych grasicy myszy szczepu BALB/c nu/nu. Po 10 dniach myszy dzielono na grupy i wprowadzano lokalnie do guza kompleks ODNs/atelokolagen, sam atelokolagen lub tylko ODNs.

Dwadzieścia dni po iniekcji odnotowano znaczące zahamowanie wzrostu guza, do którego wstrzykiwano ODNs z atelokolagenem w porównaniu z iniekcjami do guza samego atelokolagenu, ODNs oraz z guzami myszy, którym nic nie podawano.

Antysensowe oligodeoksynukleotydy zastosowano także do wyciszenia ekspresji midkiny (Midkine-MK) – czynnika wzrostu wiążącego heparynę. Jej nadekspresję zaobserwowano w wielu nowotworach i uważa się, że jest odpowiedzialna za ich transformację i progresję [47]. W badaniach Takei i wsp. sprawdzano wpływ ODNs dla mRNA midkiny na rozwój guzów wywołanych przez mysie komórki raka jelita grubego CMT-93 *in vivo*. Gdy terapeutyk wraz z atelokolagenem wprowadzano lokalnie do guza co 14 dni, zaobserwowano zahamowanie wzrostu guza w porównaniu z guzami myszy traktowanymi samym atelokolagenem lub ODNs. W swojej kolejnej pracy Takei i wsp., by zwiększyć trwałość ODN na jego 3' i 5' końcach wprowadzili zmodyfikowany nukleotyd tymidynowy [46]. Zastosowanie takiego analogu okazało się skuteczne i znacznie zahamowało wzrost guza *in vivo*, a ponadto było mniej toksyczne niż użycie analogu, w którym tlen w grupie fosforanowej zastąpiono siarką.

ODNs zostały także wykorzystane do zwalczania stanów zapalnych. Hanai i wsp. w stworzonym mysim modelu alergii skórnej w celu redukcji stanu zapalnego zastosował ODNs dla mRNA białka ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) [11]. Białko to jest członkiem nadrodziny immunoglobulin i pełni funkcję liganda antygeny z funkcją leukocytów (lymphocyte function-associated antigen – LFA-1). Ekspresja ICAM-1 w komórkach nabłonkowych, dendrytycznych czy makrofagach jest niewielka. Czynniki stresogenne wywołują jej wzrost w komórkach nabłonkowych, co stymuluje adhezję leukocytów i inicjację lokalnej reakcji zapalnej. Podanie antysensowych oligodeoksynukleotydów dla mRNA ICAM-1 w kompleksie z atelokolagenem myszom, u których wywołano reakcję zapalną obniżało ekspresję białka, czego następstwem było zmniejszenie opuchlizny w miejscu wywołania tej reakcji w porównaniu z grupą zwierząt, której podawano jedynie ODNs lub atelokolagen.

Jedną z najnowszych prac dotyczących wykorzystania atelokolagenu jako nośnika ODNs jest praca Nakazawy i wsp. [29]. Jako potencjalną tarczę dla terapii przeciwnowotworowej wybrano w niej enzym dekarboksylazę ornitynową (ornithine decarboxylase – ODC), głównie ze względu na doniesienia o podwyższonym poziomie tego białka w komórkach nowotworowych. Dekarboksylaza ornitynowa jest enzymem pełniącym główną rolę w metabolizmie poliamidów, takich jak putrescyna, spermidyna czy spermina, niezbędnych komórce do wzrostu i różnicowania, a których podwyższone stężenie zaobserwowano w komórkach nowotworowych [20,34,35]. W badaniach zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* wykorzystano trzy linie komórkowe: MKN45 (raka żołądka), COLO201 (raka okrężnicy) i RD (mięśniakomięsaka prążkowanego). Antysensowe oligonukleotydy dla mRNA ODC wprowadzane z atelokolagenem znacząco hamowały wzrost komórek wszystkich trzech linii nowotworowych *in vitro*, przy czym w przypadku linii RD nawet o 95%. W doświadczeniach *in vivo*, oprócz badania wpływu ODNs na wzrost guza, sprawdzano również

skuteczność metod dostarczania terapeutyku. Kompleks ODNs/atelokolagen podawano myszom BALB/c Slc-nu trzema sposobami: poprzez żyłę ogonową, lokalnie i domięśniowo. Oligonukleotydy dla mRNA dekarboksylazy ornitynowej wywoływały znaczące zahamowanie wzrostu guzów wszystkich trzech linii komórkowych. Najlepszą metodą podawania terapeutyku było wprowadzanie systemowe poprzez żyłę ogonową.

2.2.1.2. Małe interferujące RNA (siRNA)

Zjawisko interferencji RNA (RNA interference – RNAi) w komórkach opisali po raz pierwszy Fire i wsp. (na przykładzie nicienia *Caenorhabditis elegans*) jako naturalnie występujący komórkowy mechanizm post-transkrypcyjnego wyciszenia ekspresji genów, w którym dwuniciowe RNA (double-stranded RNA – dsRNA) hamuje ekspresję genu docelowego przez degradację sekwencji jego mRNA [7]. Uważa się, że mechanizm RNAi wykształcił się jako system obronny przeciwko infekcji wirusowej. Mały interferujący RNA (siRNA) jest dupleksem o długości 21–25 par zasad (pz). W komórce syntetyzowany jest z dwuniciowych prekursorów o długości 200 pz, które są następnie cięte przez rybonukleazę Dicer na krótkie duplekisy. Nici antysensowe takich dupleksów są komplementarne do docelowego mRNA. Dupleks siRNA jest następnie rozwijany przez kompleks białek nazwany RISC, przy czym nie antysensowa wchodzi w jego skład. Wykorzystując pojedynczą nici RNA kompleks RISC wyszukuje docelowe mRNA i przeprowadza jego degradację. Dzięki opracowaniu metod syntetyzowania egzogenego siRNA oraz stworzeniu algorytmów gwarantujących jego dużą efektywność możliwe stało się niemal całkowite wyciszenie dowolnego genu. Interferencja RNA stała się narzędziem w badaniach nad utratą jego funkcji oraz w analizie skomplikowanych szlaków regulatorowych i jest obecnie najszerzej stosowaną techniką w funkcjonalnej genomice [50]. Co więcej, siRNA został okrzyknięty wielkim narzędziem terapii genowej przeciwko wielu chorobom wliczając w to infekcje czy nowotwory. Mimo sukcesów w zastosowaniu siRNA *in vitro* jego skuteczność *in vivo* wciąż stanowi duży problem. Przyczyną niepowodzeń jest obecność w organizmach RNaz zdolnych do jego degradacji. Tymczasem atelokolagen ma wiele zalet umożliwiających wykorzystanie go jako nośnika syntetycznych siRNA. Efektywnie wiążąc ujemnie naładowane kwasy nukleinowe i białka skutecznie zabezpiecza je przed nukleazami. Kompleks siRNA/atelokolagen tworzy się na skutek oddziaływań atelokolagenu ze szkieletem fosforanowym siRNA i grupami –OH 2' rybozy. Równomierne rozłożenie grup fosforanowych w cząsteczce stanowi idealną matrycę do jego powstawania. Przypuszcza się, że na jedną cząsteczkę siRNA przypada 5 cząsteczek atelokolagenu [44]. W zależności od stężenia atelokolagenu możliwe jest lokalne dostarczenie siRNA (1,75%) lub systemowe (0,05%) (ryc. 2).

Atelokolagen jako nośnik siRNA wykorzystano w badaniu supresji angiogenezy u myszy szczepu BALB/c nu/nu, którym wprowadzano podskórnie komórki nowotworowe PC-3 (raka gruczołu krokowego) [48]. Tarczą siRNA było mRNA czynnika wzrostu komórek śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor – VEGF), odpowiedzialnego za stymulowanie procesu angiogenezy. Po trzech tygodniach od wprowadzenia komórek, do uformowanych

guzów wstrzykiwano kompleks siRNA/atelokolagen dla VEGF, sam atelokolagen lub sam siRNA. Terapeutyk podawano 4-krotnie, co 10 dni. W przypadku wprowadzania kompleksu zahamowanie wzrostu guza było znacznie w porównaniu z iniekcją samego siRNA lub atelokolagenu oraz z grupą kontrolną zwierząt, którym do guzów nic nie podawano. Badania poziomu mRNA VEGF wykazały, że w przypadku stosowania kompleksu materiał genetyczny był obecny w tkance jeszcze 8 dni po iniekcji, podczas gdy podawany bez nośnika był szybko eliminowany. Wykorzystanie atelokolagenu pozwoliło nie tylko na zmniejszenie liczby iniekcji, ale również nie zaobserwowano żadnych działań niepożądanych, takich jak np. spadek masy ciała zwierząt podczas trwania eksperymentu.

siRNA dla HST-1/FGF-4 w kompleksie z atelokolagenem jako potencjalny terapeutyk testowano również na mysim modelu ludzkiego nowotworu jąder [27]. Po iniekcji do jąder myszy BALB/c nu/nu komórek NEC8, co 10 dni, docelowo wstrzykiwano siRNA/atelokolagen. Po 21 dniach od rozpoczęcia eksperymentu objętość guza poddanego działaniu kompleksu była znacząco mniejsza niż objętość guza, do którego podawano sam siRNA lub tylko atelokolagen.

W opisanych powyżej doświadczeniach siRNA był wprowadzany lokalnie do guza dzięki zdolności do zesłania się stężonego atelokolagenu (1,75%) w 37°C. Nośnik ten można również skutecznie wykorzystać w systemowym dostarczaniu terapeutycznego. Zmniejszenie stężenia atelokolagenu w mieszaninie do 0,05% powoduje, iż nie została się on w 37°C, ale nadal jest w stanie tworzyć funkcjonalne kompleksy z siRNA. Takeshita i wsp. zbadali efektywność systemowego dostarczenia siRNA w mysim modelu przerzutowania nowotworu do kości [49]. Komórki PC-3, po stabilnej transfekcji plazmidem zawierającym gen lucyferazy, wprowadzano do lewej komory serca atymicznych myszy szczepu BALB/c nu/nu. Występowanie przerzutów monitorowano poprzez system IVIS mierzący bioluminescencję. W doświadczeniach użyto siRNA dla transkryptów dwóch genów EZH2 (human enhancer zeste homolog 2), którego nadekspresja łączy się ze złymi rokowaniami dla pacjenta oraz dla p110- α kodującego kinazę-3-fosfatydyloinozytolu, odpowiedzialną m.in. za hamowanie apoptozy, proliferację oraz migrację komórek [15]. Trzeciego, szóstego i dziewiątego dnia po iniekcji komórek do lewego przedsionka serca wprowadzano przez żyłę ogonową mieszaninę siRNA EZH2 lub p110- α i atelokolagenu. U myszy, którym podawano siRNA z atelokolagenem zaobserwowano zahamowanie rozwoju przerzutów w porównaniu ze zwierzętami, którym podawano jedynie siRNA lub atelokolagen. Iniekcja samego atelokolagenu oraz w kompleksie z siRNA nie wywoływała u myszy indukcji IFN- α , co potwierdziło brak właściwości immunogennych tego nośnika.

W ostatnich latach podjęto również próbę łączenia terapii wykorzystującej siRNA z klasyczną chemioterapią. W tym celu siRNA dla mRNA midkiny użyto wraz z klasycznym chemioterapeutycznym Paclitaxelem® (PTX). Jego głównym działaniem cytotoksycznym jest stabilizacja wrzeciona kariokinetycznego i zatrzymanie komórki w fazie mitozy [45]. Komórki PC-3 wprowadzano podskórnie do myszy BALB/c nu/nu. Po trzech tygodniach myszy dzie-

lono na grupy i co 10 dni wstrzykiwano im lokalnie do guzów: PTX, siRNA/atelokolagen oraz PTX-siRNA/atelokolagen. W przypadku wprowadzania chemioterapeutyku razem z kompleksem jego dawka była znacznie mniejsza. Powyższa terapia spowodowała znaczący spadek wzrostu guza oraz zahamowanie angiogenezy w porównaniu z guzami traktowanymi każdym z terapeutyków osobno. Co więcej, stosowanie samego PTX w mysich modelach wymaga dawek 24 i 48 mg/kg masy ciała. Tak silne dawki wywołują działania niepożądane – leukopenie i neutropenie, natomiast podanie go razem z siRNA i atelokolagenem pozwoliło na zmniejszenie dawki do 12 mg/kg m.c., przy której nie zaobserwowano opisanych wcześniej skutków ubocznych.

Innym przykładem łączenia klasycznej terapii przeciwnowotworowej z terapią antysensową jest wykorzystanie cisplaty i siRNA dla receptora naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor – EGFR) [31]. Receptor naskórkowego czynnika wzrostu należy do rodziny receptorów ErbB i jego konstytutywna aktywacja oraz nadekspresja jest obserwowana w wielu litych guzach wliczając w to guzy mózgu, piersi, okrężnicy, płuc, prostaty, jajnika czy głowy i szyi [6,37,40]. Aby zbadać efektywność połączonej terapii *in vivo* komórki nowotworowe raka płaskonabłonkowego głowy i szyi SAS wprowadzano podskórnie zmutowanym myszom BALB/c nu/nu. Po upływie tygodnia rozpoczęto leczenie polegające na jednoczesnym podawaniu siRNA/atelokolagenu bezpośrednio do guza oraz dootrzewnowym podawaniu cisplaty w dawce 1 μ g/g m.c. Po dwudziestu jeden dniach od rozpoczęcia terapii odnotowano znaczące zahamowanie wzrostu guzów u myszy, którym wstrzykiwano kompleks siRNA/atelokolagen i cisplatinę, w porównaniu z guzami myszy, którym podawano oddzielnie: cisplatinę, siRNA, atelokolagen, kompleks siRNA/atelokolagen oraz z guzami zwierząt, którym nic nie podawano.

Mały interferujący RNA dla midkiny użyli także Banno i wsp. do modulowania zjawiska hiperplazji po przeszczepie żyły [3]. Rozrost komórek występujący po implantacji może powodować skurczenie się błony wewnętrznej naczyń. Aby temu zapobiec badacze zaprojektowali króliczy model doświadczalny, w którym implant został pokryty atelokolagenem zawierającym siRNA dla midkiny. Wszczepienie implantu zatrzymało zjawisko hiperplazji na 7 dni, lecz po 14 dniach nie zaobserwowano już wystarczającej supresji. Supresja ta we wczesnym etapie spowalniała jednak znacznie hiperplazję. Spowolnienie widoczne było nawet po 28 dniach od chwili rozpoczęcia eksperymentu.

PODSUMOWANIE

Atelokolagen stał się źródłem zainteresowania ponad 30 lat temu. Jego pierwszym zastosowaniem były podłoża do hodowli komórek w inżynierii tkankowej. Szybko jednak zaczęto go wykorzystywać w produkcji implantów i kosmetyce. Dopiero od niedawna zaczął on przyciągać uwagę naukowców opracowujących systemy dostarczania leków. Ze względu na swój dodatni ładunek nadaje się on do wprowadzania do organizmu białek o ujemnym ładunku. Największy potencjał atelokolagenu wydaje się jednak związany z terapią genową, dzięki temu, iż może on wią-

zać kwasy nukleinowe – zarówno jedno- jak i dwuniciowe DNA i RNA o różnej długości. Atelokolagen jest w stanie chronić je przed degradacją w makroorganizmie oraz stopniowo uwalniać do komórek. Jego unikalne właściwości, takie jak np. płynny stan skupienia w 4°C, pozwalają na łatwe przygotowanie terapeutyki i precyzyjne wprowadzenie go do organizmu. W przypadku reakcji alergicznej na lek lub atelokolagen można je szybko usunąć, ponieważ w temperaturze 37°C została się. Przy małych stężeniach jest w stanie stworzyć kompleksy z kwasem nukle-

inowym na tyle małych rozmiarów, by terapeutyk mógł być bez przeszkód wprowadzony systemowo. Ponadto jest on całkowicie biodegradowalny. Są to cechy bardzo pożądane w przypadku nośnika materiału genetycznego. Jego największą zaletą jest jednak nie wywoływanie odpowiedzi immunologicznej i reakcji zapalnej. Pojawiające się doniesienia naukowe sugerują, iż jak dotąd jest to jedyny nośnik, który może być używany *in vivo* bez żadnego ryzyka. Czy zatem do niego będzie należeć przyszłość terapii genowej?

PIŚMIENNICTWO

- [1] Alexeev V., Yoon K.: Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA/DNA oligonucleotide. *Nat. Biotechnol.*, 1998; 16: 1343–1346
- [2] Anwer K., Shi M., French M.F., Muller S.R., Chen W., Liu Q., Proctor B.L., Wang J., Mumper R.J., Singhal A., Rolland A.P., Alila H.W.: Systemic effect of human growth hormone after intramuscular injection of a single dose of a muscle-specific gene medicine. *Hum. Gene Ther.*, 1998; 9: 659–670
- [3] Banno H., Takei Y., Muramatsu T., Komori K., Kadomatsu K.: Controlled release of small interfering RNA targeting midkine attenuates intimal hyperplasia in vein grafts. *J. Vasc. Surg.*, 2006; 44: 633–641
- [4] Charriere G., Bejot M., Schnitzler L., Ville G., Hartmann D.J.: Reactions to a bovine collagen implant – clinical and immunological study in 705 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1989; 21: 1203–1208
- [5] Cole-Strauss A., Yoon K., Xiang Y., Byrne B.C., Rice M.C., Gryn J., Holloman W.K., Kmiec E.B.: Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA–DNA oligonucleotide. *Science*, 1996; 273: 1386–1389
- [6] Davies D.E., Chamberlin S.G.: Targeting the epidermal growth factor receptor for therapy of carcinomas. *Biochem. Pharmacol.*, 1996; 51: 1101–1110
- [7] Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998; 391: 806–811
- [8] Fujioka K., Takada Y., Sato S., Miyata T.: Long-acting delivery system of interferon: IFN minipellet. *J. Control. Release*, 1995; 33: 317–323
- [9] Fujiwara T., Sakagami K., Orita K.: Antitumor effects of a new interleukin-2 slow delivery system on methylcholanthrene-induced fibrosarcoma in mice. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, 1990; 116: 141–148
- [10] Gavenis K., Schmidt-Rohlfing B., Mueller-Rath R., Andereya S., Schneider U.: *In vitro* comparison of six different matrix systems for the cultivation of human chondrocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 2006; 42: 159–167
- [11] Hanai K., Kurokawa T., Minakuchi Y., Maeda M., Nagahara S., Miyata T., Ochiya T., Sano A.: Potential of atelocollagen-mediated systemic antisense therapeutics for inflammatory disease. *Hum. Gene Ther.*, 2004; 15: 263–272
- [12] Hirai K., Sasaki H., Sakamoto H., Takeshita F., Asano K., Kubota Y., Ochiya T., Terada M.: Antisense oligodeoxynucleotide against HST-1/FGF-4 suppresses tumorigenicity of an orthotopic model for human germ cell tumor in nude mice. *J. Gene Med.*, 2003; 5: 951–957
- [13] Hirai K., Sasaki H., Yamamoto H., Sakamoto H., Kubota Y., Kakizoe T., Terada M., Ochiya T.: HST-1/FGF-4 protects male germ cells from apoptosis under heat-stress condition. *Exp. Cell. Res.*, 2004; 294: 77–85
- [14] Honma K., Ochiya T., Nagahara S., Sano A., Yamamoto H., Hirai K., Aso Y., Terada M.: Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 289: 1075–1081
- [15] Katso R., Okkenhaug K., Ahmadi K., White S., Timms J., Waterfield M.D.: Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2001; 17: 615–675
- [16] Kaya M., Toyama Y., Kubota K., Nodasaka Y., Ochiai M., Nomizu M., Nishi N.: Effect of DNA structure on the formation of collagen-DNA complex. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2005; 35: 39–46
- [17] Kren B.T., Bandyopadhyay P., Steer C.J.: *In vivo* site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nat. Med.*, 1998; 4: 285–290
- [18] Kren B.T., Cole-Strauss A., Kmiec E.B., Steer C.J.: Targeted nucleotide exchange in the alkaline phosphatase gene of HuH-7 cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Hepatology*, 1997; 25: 1462–1468
- [19] Kren B.T., Parashar B., Bandyopadhyay P., Chowdhury N.R., Chowdhury J.R., Steer C.J.: Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 10349–10354
- [20] Kubota S.: Ornithine decarboxylase and cancer. *Cancer J.*, 1998; 11: 294–297
- [21] Levy M.Y., Barron L.G., Meyer K.B., Szoka F.C. Jr: Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Ther.*, 1996; 3: 201–211
- [22] Lynn A.K., Yannas I.V., Bonfield W.: Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2004; 71: 343–354
- [23] Maeda M., Sano A., Fujioka K., Inui K., Koike T.: Local sustained release formulation for fracture treatment, basic fibroblast growth factor minipellet. *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.*, 2005; 22: 494–495
- [24] Maeda M., Tani S., Sano A., Fujioka K.: Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs. *J. Control. Release.*, 1999; 62: 313–324
- [25] Manthorpe M., Cornefert-Jensen F., Hartikka J., Felgner J., Rundell A., Margalith M., Dwarki V.: Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum. Gene Ther.*, 1993; 4: 419–431
- [26] Matsuo K., Sakagami K., Shiozaki S., Uchida S., Fujiwara T., Gohchi A., Orita K.: Development of an interleukin-2 slow delivery system. *ASAIO Trans.*, 1988; 34: 729–731
- [27] Minakuchi Y., Takeshita F., Kosaka N., Sasaki H., Yamamoto Y., Kouno M., Honma K., Nagahara S., Hanai K., Sano A., Kato T., Terada M., Ochiya T.: Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res.*, 2004; 32: e109
- [28] Nakamura M., Ando Y., Nagahara S., Sano A., Ochiya T., Maeda S., Kawaji T., Ogawa M., Hirata A., Terazaki H., Haraoka K., Tanihara H., Ueda M., Uchino M., Yamamura K.: Targeted conversion of the thymosin gene *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther.*, 2004; 11: 838–846
- [29] Nakazawa K., Nemoto T., Hata T., Seyama Y., Nagahara S., Sano A., Itoh H., Nagai Y., Kubota S.: Single-injection ornithine decarboxylase-directed antisense therapy using atelocollagen to suppress human cancer growth. *Cancer*, 2007; 109: 993–1002
- [30] Neovzhay D., Kanska U., Budzyńska R., Boratyński J.: Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in treatment of cancer and other diseases. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 350–360
- [31] Nozawa H., Tadakuma T., Ono T., Sato M., Hiroi S., Masumoto K., Sato Y.: Small interfering RNA targeting epidermal growth factor receptor enhances chemosensitivity to cisplatin, 5-fluorouracil and docetaxel in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*, 2006; 97: 1115–1124
- [32] Ochi M., Uchio Y., Kawasakiv K., Wakitani S., Iwasa J.: Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in treatment of cartilage defect of the knee. *J. Bone Joint Surg.*, 2002; 84: 571–578

- [33] Ochiya T., Takahama Y., Nagahara S., Sumita Y., Hisada A., Itoh H., Nagai Y., Terada M.: New delivery system for plasmid DNA *in vivo* using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet. *Nat. Med.*, 1999; 5: 707–710
- [34] Pegg A.E.: Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res.*, 1988; 48: 759–774
- [35] Pegg A., Shantz L., Coleman C.: Ornithine decarboxylase as a target for chemoprevention. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 1995; 22: 132–138
- [36] Richardson P.D., Kren B.T., Steer C.J.: Gene repair in the new age of gene therapy. *Hepatology*, 2002; 35: 512–518
- [37] Rusch V., Mendelsohn J., Dmitrovsky E.: The epidermal growth factor receptor and its ligands as therapeutic targets in human tumors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 1996; 7: 133–141
- [38] Saigusa T., Arita J., Iriki M., Aisaka A., Takada Y., Fujioka K.: Attenuation of interferon- α -induced fever by a low dose interferon- α pretreatment: A possible mechanism underlying decreased pyrogenic action of an interferon- α long acting formulation. *Autonomic Nerv. Syst.*, 1996; 33: 46–53
- [39] Sakai D., Mochida J., Iwashina T., Hiyama A., Omi H., Imai M., Nakai T., Ando K., Hotta T.: Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials*, 2006; 27: 335–345
- [40] Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N.: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 1995; 19: 183–232
- [41] Sano A., Hojo T., Maeda M., Fujioka K.: Protein release from collagen matrices. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 1998; 31: 247–266
- [42] Shiozaki S., Sakagami K., Matsuoka J., Uchida S., Miyazaki M., Orita K.: Sustained-release formulation of interleukin-2 (IL-2)-preliminary study of IL-2 mini-pellet. *Drug Deliv. Syst.*, 1987; 2: 101–106
- [43] Stenzel K.H., Miyata T., Rubin A.L.: Collagen as a biomaterial. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1974; 3: 231–253
- [44] Svintradze D.V., Mrevlishvili G.M.: Fiber molecular model of atelocollagen-small interfering RNA (siRNA) complex. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2005; 37: 283–286
- [45] Takei Y., Kadomatsu K., Goto T., Muramatsu T.: Combinational antitumor effect of siRNA against midkine and paclitaxel on growth of human prostate cancer xenografts. *Cancer*, 2006; 107: 864–873
- [46] Takei Y., Kadomatsu K., Itoh H., Sato W., Nakazawa K., Kubota S., Muramatsu T.: 5'-,3'-inverted thymidine-modified antisense oligodeoxynucleotide targeting midkine. Its design and application for cancer therapy. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 23800–23806
- [47] Takei Y., Kadomatsu K., Matsuo S., Itoh H., Nakazawa K., Kubota S., Muramatsu T.: Antisense oligodeoxynucleotide targeted to Midkine, a heparin-binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells. *Cancer Res.*, 2001; 61: 8486–8491
- [48] Takei Y., Kadomatsu K., Yuzawa Y., Matsuo S., Muramatsu T.: A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res.*, 2004; 64: 3365–3370
- [49] Takeshita F., Minakuchi Y., Nagahara S., Honma K., Sasaki H., Hirai K., Teratani T., Namatame N., Yamamoto Y., Hanai K., Kato T., Sano A., Ochiya T.: Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 12177–12182
- [50] Takeshita F., Ochiya T.: Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci.*, 2006; 97: 689–696
- [51] Wolff J.A., Ludtke J.J., Acsadi G., Williams P., Jani A.: Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.*, 1992; 1: 363–369
- [52] Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L.: Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990; 247: 1465–1468
- [53] Xiang Y., Cole-Strauss A., Yoon K., Gryn J., Kmiec E.B.: Targeted gene conversion in a mammalian CD34⁺-enriched cell population using a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *J. Mol. Med.*, 1997; 75: 829–835
- [54] Yamamoto S., Yoshimine T., Fujita T., Kuroda R., Irie T., Fujioka K., Hayakawa T.: Protective effect of NGF atelocollagen mini-pellet on the hippocampal delayed neuronal death in gerbils. *Neurosci. Lett.*, 1992; 141: 161–165
- [55] Yoon K., Cole-Strauss A., Kmiec E.B.: Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA-DNA oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 2071–2076
- [56] Yoshida T., Miyagawa K., Odagiri H., Sakamoto H., Little P.F., Terada M., Sugimura T.: Genomic sequence of hst, a transforming gene encoding a protein homologous to fibroblast growth factors and the int-2-encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 7305–7309
- [57] Zhang X., Mitsuru A., Igura K., Takahashi K., Ichinose S., Yamaguchi S., Takahashi T.A.: Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 340: 944–952