

Received: 2010.01.29  
Accepted: 2010.02.11  
Published: 2010.02.19

## Onkonaza – rybonukleaza o aktywności przeciwnowotworowej

### Onconase: A ribonuclease with antitumor activity

Małgorzata Zwolińska<sup>1</sup>, Piotr Smolewski<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Klinika Hematologii,

<sup>2</sup> Zakład Hematologii Doświadczalnej Katedry Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

#### Streszczenie

Onkonaza (ranpirnaza) jest białkiem otrzymanym z jaj żaby *Rana pipiens*. Jej działanie biologiczne, a zwłaszcza przeciwnowotworowe, jest ściśle związane z aktywnością rybonukleazy. Onkonaza wywołuje śmierć komórki poprzez rozkład wewnątrzkomórkowego RNA, hamowanie syntezy białek, hamowanie wzrostu i proliferacji, a także selektywną indukcję apoptozy komórek nowotworowych. Ważnym elementem jej działania cytotoksycznego jest także aktywność antyoksydacyjna. Wyniki badań przedklinicznych potwierdziły dużą skuteczność onkonazy w leczeniu nowotworów złośliwych, w tym postaci opornych na inne chemioterapeutyki. Ponadto lek wykazuje synergizm działania z wieloma rutynowo stosowanymi cytostatykami. Badania kliniczne były prowadzone u pacjentów chorych na raka nerki, piersi oraz trzustki. Niedawno zakończono badania III fazy z onkonazą u chorych na międzybłoniaka (mesothelioma). Prowadzone jest także badanie I/II fazy w niedrobnokomórkowym raku płuc.

#### Słowa kluczowe:

onkonaza • rybonukleaza • apoptoza • aktywność przeciwnowotworowa

#### Summary

Onconase (ranpirnase) is a homologous protein obtained from *Rana pipiens* frog eggs. The activity of onconase, and particularly its antitumor effect, is strictly connected with ribonuclease (RN-ase) activity. Onconase induces cell death through the decomposition of inner cellular RNA, inhibition of protein synthesis, and inhibition of cell growth and proliferation and it also specifically triggers tumor cell apoptosis. A very important mechanisms of its cytotoxicity is also its antioxidant activity. The results of preclinical trials demonstrated a high activity of onconase against tumor cells, also those resistant to cytostatics. Moreover, onconase showed synergic activity with other commonly used anticancer drugs. Several clinical trials were performed on patients suffering from kidney, breast, and pancreatic cancers. Most recently a phase III study of onconase in patients with mesothelioma was completed. There are also ongoing phase I and II clinical trials with non-small-cell lung cancer (NSCLC).

#### Key words:

onconase • ribonuclease • apoptosis • antitumor activity • treatment

#### Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=905228>

#### Word count:

3561

#### Tables:

1

#### Figures:

1

#### References:

58

#### Adres autora:

prof. dr hab. n. med. Piotr Smolewski, Zakład Hematologii Doświadczalnej Katedry Hematologii UM w Łodzi, Woj. Szp. Spec. im. M. Kopernika w Łodzi, ul. Ciołkowskiego 2, 93-510 Łódź; e-mail: piotr\_smolewski@wp.pl



Onkonaza (ranpirnaza) jest białkiem otrzymanym po raz pierwszy z jaj i zarodków żaby *Rana pipiens*. Jest to białko o małej masie cząsteczkowej (12000 D), zbudowane z pojedynczego łańcucha polipeptydowego (104 aminokwasy), bogatego w lizynę [4,40]. Ta stosunkowo niedawno poznana RNAza ma wysoki stopień powinowactwa do niektórych RNAz występujących w organizmie człowieka, takich jak RNAza trzustkowa, wątrobowa, białko kationowe eozynofiliów oraz angiogenina.

Pod względem struktury chemicznej onkonaza jest najmniejszą rybonukleazą należącą do rodziny rybonukleaz trzustkowych [39]. Jej działanie biologiczne, a zwłaszcza przeciwnowotworowe, jest ściśle związane z aktywnością enzymatyczną cząsteczki.

#### AKTYWNOŚĆ RYBONUKLEAZ

RNAzy odgrywają bardzo istotną rolę jako mediatory reakcji wewnątrzkomórkowych wywołanych przez cytokiny, takie jak interferon  $\alpha/\beta$ 1 (IFN- $\alpha/\beta$ 1). IFN aktywowany przez podwójny łańcuch RNA (dsRNA) wirusa, indukuje syntezę 2'-5'-oligoadenylołą. W rezultacie zostaje aktywowana wewnątrzkomórkowa RNAza L, która może rozkładać RNA rybosomalne oraz inne typy RNA komórkowego. Jednocześnie, kinazy indukowane przez IFN hamują syntezę białek przez zablokowanie wiązania tRNA z rybosomami.

Dimery rybonukleaz mogą powodować rozkład dsRNA [23]. Onkonaza może, podobnie do innych RNAz, tworzyć

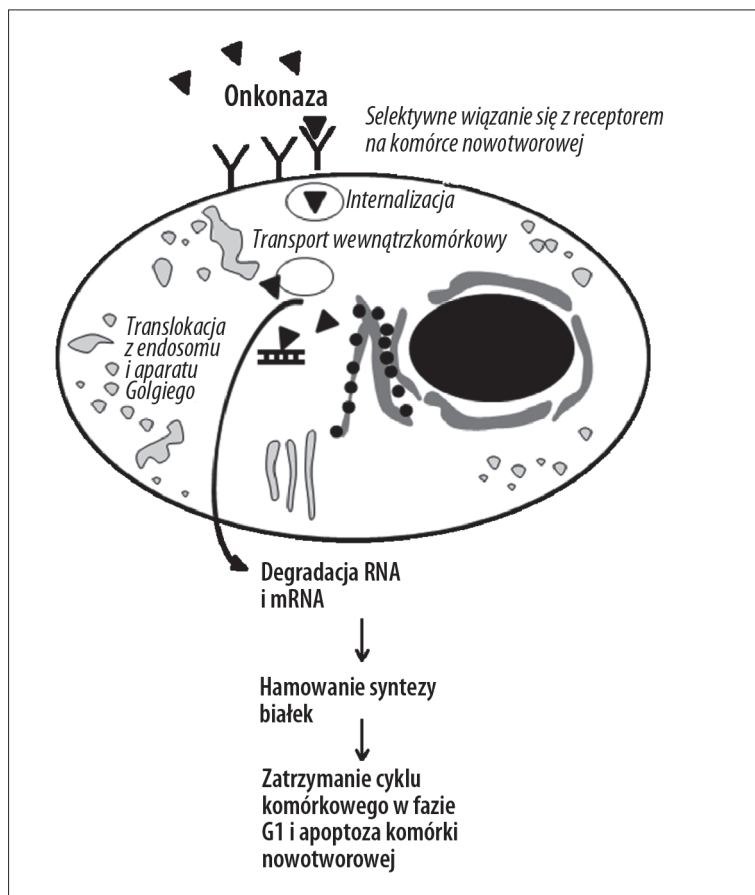
aktywne biologicznie dimery, zdolne rozkładać dsRNA [58]. Możliwy jest również synergizm działania IFN i onkonazy [53].

#### MECHANIZM DZIAŁANIA PRZECIWNOWOTWOROWEGO ONKONAZY

Onkonaza wiąże się z komórkami docelowymi przez receptory i wnika do ich cytoplazmy. Powoduje śmierć komórki poprzez rozkład wewnątrzkomórkowego RNA, hamowanie syntezy białek, hamowanie wzrostu i proliferacji komórki [57]. Udowodniono zdolność onkonazy także do wywoływania apoptozy komórek nowotworowych [15] (ryc. 1).

#### Hamowanie syntezy białek

Cytotoksyczność onkonazy jest związana m.in. z hamowaniem syntezy białek, co odbywa się przez rozkład tRNA. Niektóre mechanizmy wewnątrzkomórkowego działania tego enzymu nie mogą być jednak tłumaczone tylko degradacją tRNA [48]. Prawdopodobnie istotne znaczenie ma tu wpływ onkonazy na inne rodzaje komórkowego RNA. Uważa się, że celem jej działania może być iRNA (interferencyjne RNA) – mały fragment RNA (18–24 kpz), wykazujący funkcje regulatorowe w komórce. Badania wskazują, że siRNA (małe interferencyjne RNA, small interfering – RNA), jest bardzo wczesnym czynnikiem uczestniczącym w procesie indukcji i progresji nowotworu. Rozkładając małe, niechronione przez białka fragmenty RNA (zbliżone do tRNA) onkonaza powoduje zmiany w ekspresji genów. Badania *in vitro* wykazały preferencję tej RNAzy do



Ryc. 1. Mechanizm działania onkonazy

rozszczepiania łańcuchów rybonukleotydowych w miejscach UG i GG [50], podczas gdy homologiczne RNAzy trzuskowe nie wykazują w swoim działaniu przewagi rozszczepiania fragmentów G. Ten mechanizm może być odpowiedzialny za hamowanie proliferacji komórek nowotworowych oraz ich śmierć w mechanizmie apoptozy [1]. Uszkodzenia RNA powodowane przez ranpirnazę zapoczątkowują łańcuch zmian molekularnych, których kulminacją jest aktywacja kaskady kaspaz, czego następstwem jest dezintegracja komórki [13].

### Aktywność antyproliferacyjna

Onkonaza wpływa także na przekazywanie wewnątrzkomórkowych sygnałów regulujących wzrost i śmierć komórek nowotworowych. Cytostatyczne działanie onkonazy jest spowodowane hamowaniem cyklu komórkowego w fazie G1, co stwierdzono w badaniach na liniach komórkowych COLO 320DM (gruczolakorak jelita grubego), A-253 (rak płaskonabłonkowy ślinianki), HL-60 (komórki białaczki promielocytowej) [8] oraz przez hamowanie ekspresji cykliny D3 (komórki chłoniaka histiocytowego, linii U937) [15,21]. W odróżnieniu od zdrowych komórek, które w fazie spoczynkowej, charakteryzującej się niskim poziomem RNA, mogą pozostawać przez dowolnie długi okres czasu, komórki nowotworowe pozostające w fazie spoczynkowej cyklu komórkowego w krótkim czasie tracą swoją żywotność i ulegają apoptozie [5,49].

Juan i wsp. [21] prowadzili badania mające na celu ustalenie mechanizmów hamowania cyklu komórkowego przez onkonazę. W komórkach linii U937 traktowanych tym lekiem określano poziomy cyklina D3, E oraz inhibitorów kinaz cyklinozależnych (CKI) – p16, p21 i p27, w zależności od fazy cyklu komórkowego. Jednocześnie określano stopień fosforylacji białka retinoblastomy (pRb). Komórki inkubowane z onkonazą w stężeniu 170 nM przez 24 godziny i dłużej pozostawały zatrzymane w fazie G1 cyklu komórkowego. Wiązało się to ze spadkiem aktywności cykliny D3 (przy niezmiennym poziomie cykliny E), oraz wzrostem aktywności wszystkich trzech CKI. Prowadziło to do zmniejszenia fosforylacji pRb komórek zatrzymanych w fazie G1. W komórkach znajdujących się w innej fazie cyklu komórkowego (S, G<sub>2</sub>/M) fosforylacja pRb była prawidłowa. Cytostatyczne działanie onkonazy wydaje się więc spowodowane zahamowaniem ekspresji cykliny D3, zwiększoną ekspresją p16, p21, p27, co powoduje zmniejszenie fosforylacji pRb podczas fazy G<sub>0</sub>/1 i zatrzymanie cyklu komórkowego w punkcie restrykcyjnym, pod kontrolą cyklin Cdk4/6 oraz D.

Badania przeprowadzone przez Hsieha i wsp. [18] miały na celu określenie wpływu onkonazy na zmiany poziomu i wewnątrzkomórkowej dystrybucji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF (nuclear factor) kappa B (NF-κB) oraz białka regulatorowego cyklu komórkowego Rb, w hodowli komórek ostrej białaczki T-komórkowej Jurkat SN oraz BαM. W obu typach komórek poziom ekspresji NF-κB uległ zmniejszeniu o 20 i 50%. Całkowity poziom białka Rb umiejscowionego w jądrze nie zmniejszył się w komórkach SN, obserwowano natomiast wzrost liczby hipofosforyzowanych postaci tego białka. W przypadku komórek Jurkat BαM całkowity poziom białka Rb został zmniejszony do poziomów ledwo wykrywalnych. Wynika

z tego, że obserwowane zmiany ekspresji białek NF-κB i Rb zależą od swoistego dla danych komórek działania przeciwnowotworowego onkonazy.

Tsai i wsp. [52] badali wpływ dawki oraz czasu działania onkonazy, na wzrost komórek Jurkat SN. Największe zahamowanie proliferacji komórek było obserwowane 72 i 96 godzin po podaniu onkonazy. Najbardziej obiecujące wyniki otrzymano przy zastosowaniu największej dawki (10 μg/mL) tego białka. Zmniejszenie proliferacji komórkowej było spowodowane przez spadek aktywności białka Rb oraz indukcję apoptozy. Nie było natomiast związane ze zmianą liczby komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Analizy biochemiczne ujawniły, że wzrost działania supresyjnego, był powiązany ze zmniejszeniem ekspresji oraz wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia NF-κB, czynnika transkrypcyjnego funkcjonalnie związanego z przeżyciem komórek. Zwiększenie supresji jest poprzedzane przez zmniejszenie aktywności czynnika NF-κB przez onkonazę.

Wysunięto hipotezę, że komórkowa lokalizacja i aktywność NF-κB, może mieć istotne znaczenie dla komórkowej odpowiedzi na działanie onkonazy [52]. Wzrost efektu jej działania był obserwowany w komórkach Jurkat BαM, z dominującym negatywnym genem inhibitorów IκB. Wzrost działania supresyjnego ranpirnazy w komórkach BαM był bardziej widoczny, niż we wcześniej badanych komórkach SN, jednocześnie nie uwidoczniło zmian liczby komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Zaobserwowano również znaczne zmniejszenie aktywności NF-κB w komórkach BαM. Zjawisko to sugeruje, że czynnik transkrypcyjny, który w tych komórkach chroniony jest przed dysocjacją spowodowaną inhibitorami IκB, jest bardziej podatny na rozkład spowodowany działaniem onkonazy [52]. Wyniki te wskazują, że w przypadku ostrych białaczek T-komórkowych, antyproliferacyjne i proapoptotyczne działanie onkonazy jest w dużym stopniu determinowane przez czynnik NF-κB i jego metabolizm.

### Indukcja apoptozy

Onkonaza indukuje zaprogramowaną śmierć komórki czyli apoptozę. Apoptoza zapoczątkowana przez czynnik martwicy nowotworów α (TNF-α), jest spowodowana przez inhibitory syntezy białek. Badania przeprowadzone przez Deptalę i wsp. [9] porównywały wzrost i żywotność kolonii komórek U937, po inkubacji z onkonazą lub TNF-α. Po 72 godzinach stwierdzono dwukrotnie wolniejszy wzrost komórek oraz zwiększenie odsetka komórek martwych, w porównaniu z kontrolą. Połączenie działania ranpirnazy i TNF-α spowodowało całkowite zahamowanie wzrostu i śmierć 54% komórek. Stwierdzono również, że w przypadku komórek białaczkowych HL-60 inkubowanych z onkonazą, TNF-α lub przeciwciałem anti-CD95 (FasL), odsetek komórek apoptotycznych był większy w przypadku 24 godzin preinkubacji z tym białkiem. Mechanizm, dzięki któremu lek ten wzmacnia działanie TNF-α, może być związany z supresją ekspresji genów odpowiedzialnych za przeżycie komórki i zależnych od aktywności czynnika NF-κB [9].

Cytotoksyczne działanie leków przeciwnowotworowych, może być modyfikowane przez czynnik NF-κB aktywowany przez wolne rodniki tlenowe (ROI). Ardelt i wsp. [2] ocenili



wpływ onkonazy na wewnątrzkomórkowy poziom nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) w wybranych liniach komórek nowotworowych. W komórkach tych stwierdzono istotnie obniżony poziom  $H_2O_2$ . Działanie takie jest zależne od enzymatycznej aktywności onkonazy i wiąże się z przyspieszeniem rozkładu wolnych rodników. Nie jest jednak do końca poznany mechanizm, dzięki któremu onkonaza wpływa na wolne rodniki.

Onkonaza obniża poziom ROI zarówno w komórkach nowotworowych jak i w innych liniach komórkowych [3]. Zależy to od rybonukleotycznej aktywności enzymu, powodującej zarówno zmniejszenie poziomu ROI, jak i zwiększenie ich degradacji. Onkonaza zmniejsza potencjał międzybłonowy mitochondriów i w konsekwencji poziom ATP. Jednocześnie obniża się ekspresja białka antyapoptotycznego Bcl-2, zwiększa się natomiast ekspresja proapoptotycznego białka Bax. Aktywność antyoksydacyjna onkonazy, może być ważnym elementem jej aktywności cytotoksycznej przeciw komórkom nowotworowym.

Onkonaza, w odróżnieniu od innych chemioterapeutyków, nie wymaga udziału supresorowego białka p53 do wywołania śmierci komórki. Jest to istotne, gdyż w komórkach nowotworowych często jest wytwarzane nieaktywne białko p53, a to może zmniejszać aktywność cytotoksyczną [19].

#### Aktywność w nowotworach wykazujących oporność wielolekową

W innych badaniach [32] potwierdzono, że onkonaza wykazuje aktywność w przypadku nowotworów wykazujących wielolekową oporność, która jest główną przyczyną niepowodzenia chemioterapii systemowej. Michaelis i wsp. [32] zbadali wpływ onkonazy na wzrost *neuroblastoma*. Badano żywotność komórek *neuroblastoma* chemiowrażliwych oraz chemioopornych, wykazujących dużą ekspresję glikoproteiny P (P-gp) oraz brak ekspresji białka p53. Onkonaza wykazywała działanie apoptotyczne, hamowała cykl komórkowy i wzrost obu typów komórek *neuroblastoma* niezależnie od ekspresji P-gp i mutacji genu P53. Udowodniono aktywność onkonazy w opornych na chemioterapię nowotworach wieku dziecięcego – *neuroblastoma* i *rhabdomyosarcoma* [32,46].

W badaniach *in vitro* i *in vivo* Rybak i wsp. [47] wykazali synergistyczne działanie onkonazy i winkrystyny na komórki nowotworowe chemiooporne z powodu dużej ekspresji P-gp. Jednocześnie nie zaobserwowali oni synergizmu działania winkrystyny i onkonazy na oporne na leki komórki *neuroblastoma*.

Onkonaza wykazuje synergizm działania z wieloma lekami przeciwnowotworowymi. Współdziałanie z cisplatyną, dokсорubicyną, winkrystyną, tamoksifenem, trifluoperazyną, IFN- $\alpha$  i - $\beta$ , TNF- $\alpha$  czy FasL może mieć istotne znaczenie w terapii nowotworów wykazujących pierwotną lub wtórną chemiooporność [9,33,37,38,46,47,53].

#### Selektywność działania przeciwnowotworowego onkonazy

Mechanizm powodujący obserwowaną selektywność działania onkonazy na komórki nowotworowe nie jest znany. Rybonukleazy o podobnej budowie wiążą się częściej

z komórkami nowotworowymi, niż prawidłowymi. Być może jest to spowodowane różnicą w budowie sialoglikopeptydów błony komórkowej [42,43]. Inną przyczyną może być zwiększona w porównaniu z komórkami zdrowymi, przepuszczalność błony komórkowej komórek nowotworowych dla makrocząsteczek, takich jak rybonukleazy [11]. Prawdopodobnie, selektywne przeciwnowotworowe działanie onkonazy wynika zarówno z właściwości samych komórek nowotworowych, jak i z wpływu tej substancji na metabolizm RNA i białek. Wydaje się, że onkonaza normalizuje efekty nadmiernej ekspresji podstawowych białek regulatorowych w cyklu komórkowym komórek nowotworowych, jednocześnie nie powodując zmian w cyklu komórek prawidłowych [15].

#### AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA – BADANIA PRZEDKLINICZNE *IN VITRO*

Badania *in vitro* prowadzone na różnych liniach ludzkich komórek nowotworowych, wykazały różną aktywność onkonazy. Znaczącą aktywność cytotoksyczną leku wykazano w stosunku do linii komórkowych raka pęcherza (T-24), raka płaskonabłonkowego ślinianki (A-253), raka okrężnicy (COLO-320 DM), czerniaka (LOX), glejaka wielopostaciowego (U373MG), raka płaskonabłonkowego płuc (HT-520), białaczki szpikowej (HL-60), erytroleukemii (K-562), raka nerki (CAKI-1 i ACHN) czy linii wywodzących się z raka piersi (MCF7/ADR-RES, HS-578T czy T47D). Małą aktywność *in vitro* onkonaza wykazywała dla linii raka jajnika (NIH OVCAR-3), raka okrężnicy (HT-29), raka płuc (A-549), rdzeniaka (TE-671) i raka trzustki (ASPC-1). Brak aktywności przeciwnowotworowej onkonazy dla linii prawidłowych fibroblastów: ludzkich (GM-7306 i GM-2374) i myszy (L929), keratynocytów oraz limfocytów krwi obwodowej [8,15,16,28,29,31, 32,33,37,38,46,47] (tabela 1).

Ustalono także, że onkonaza zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych oraz komórek śródbłonka CCL-209 na napromienianie [29,31]. Wykazano zmiany w parametrach fizjologicznych komórek nowotworowych, takich jak wewnątrzkomórkowe  $pO_2$  i pH. Trwająca 24 godziny inkubacja z onkonazą, poprzedzająca radioterapię (100–500 radów), była konieczna do zahamowania cyklu komórkowego w fazie spoczynkowej G<sub>1</sub> [31]. Po podaniu onkonazy w infuzji do komórek guza LS174T obserwowano spadek ciśnienia płynu wewnątrzkomórkowego z około 10 do 3 mm Hg w przeciągu 2 minut. Udowodniono również, że onkonaza w dawce 5–10  $\mu\text{g/ml}$  uwrażliwiała *in vitro* komórki nowotworowe linii A549 na działanie radioterapii [28]. Na podstawie licznych doświadczeń wysnuto wniosek, że onkonaza pełni rolę adiuwantu w przypadku radioterapii i chemioterapii [28,29,31].

W doświadczeniach prowadzonych *in vitro* na komórkach ludzkiego międzybłoniaka (*mesothelioma*), badano również efekt terapeutyczny onkonazy [44,45]. Jest ona jednym z niewielu chemioterapeutyków o małej toksyczności i działaniach niepożądanych, których efekt przeciwnowotworowy był badany u chorych na ten nowotwór złośliwy. Badania *in vitro* wykazały, że onkonaza indukuje apoptozę komórek międzybłoniaka. Oceniano również wpływ ekspresji fosfatydilinozytolo-3-kinazy/Akt (PI3-K/Akt) na aktywność onkonazy przeciw komórkom *mesothelioma*. Komórki z najwyższą aktywnością Akt, która związana jest z prezentacją antygenów wirusa SV40 na limfocytach T, wykazywały największą oporność na terapię. Obserwowano

Tabela 1. Aktywność cytotoksyczna i hamowanie wzrostu przez onkonazę dla różnych linii komórkowych

Znacząca aktywność	Mała aktywność	Brak aktywności
T-24 komórki raka pęcherza	NIH OVCAR-3 komórki raka jajnika	GM-7306&GM2374 prawidłowe fibroblasty ludzkie
A-253 komórki raka płaskonabłonkowego ślinianki	HT-29 komórki raka okrężnicy	L929 prawidłowe komórki myszy
COLO-320 DM komórki raka okrężnicy	A-549 komórki raka płuca	prawidłowe keratynocyty
LOX komórki czerniaka	TE-671 komórki rdzeniaka	prawidłowe limfocyty*
U373MG komórki glejaka wielopostaciowego	ASPC-1 komórki raka trzustki	
HT-520 komórki raka płaskonabłonkowego płuc		
HL-60 komórki białaczki		
K-562 komórki białaczki		
CAKI-1 komórki raka nerki**		
ACHN komórki raka nerki**		
MCF7/ADR-RES komórki raka piersi**		
HS-578T komórki raka piersi**		
T47D komórki raka piersi**		

\* Aktywność stwierdzona tylko przy dużych dawkach onkonazy (ranpirnazy) (1  $\mu\text{M}$  i wyższe).

\*\* Wyniki National Cancer Institute (NCI) Cancer Screen.

współdziałanie między inhibitorem PI3-K i onkonazą w indukowaniu śmierci komórek *mesothelioma* [44,45].

Ramos-Nino i wsp. [44] badali działanie onkonazy w połączeniu z rosiglitazonem (nowy lek przeciwcukrzycowy), inhibitorem szlaku PI3-K/AKT, przeciw kilku liniom komórek nowotworowych. Wykazano synergistyczne działanie tych leków ze zmniejszeniem żywotności i wzrostem apoptozy komórek nowotworowych, z towarzyszącym obniżeniem ekspresji białek Fra-1 i surwiwiny.

Najnowsze doświadczenia z użyciem linii komórkowych różnych nowotworów, udowodniły synergizm działania onkonazy i cefarantyny, alkaloidu otrzymanego z *Stephania cepharantha hayata* [20]. Małe dawki zarówno onkonazy jak i cefarantyny spowalniały wzrost komórek białaczki promielocytowej HL-60, chłoniaka U937, szpiczaka mnogiego RPMI-8228, raka prostaty DU 145 oraz gruczolakoraka LNCaP, jednak bez wpływu na zdolność proliferacji komórek nowotworowych. Całkowite zahamowanie wzrostu komórek wszystkich linii nowotworowych nastąpiło po połączeniu obydwu leków. Zwiększeniu ulegał też efekt proapoptotyczny. Mechanizm synergizmu działania przeciwnowotworowego onkonazy i cefarantyny nie jest w pełni poznany, chociaż wiadomo, że obydwa leki działają hamująco na czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa\text{B}$  [20].

Istnieją doniesienia, że łagodna hipertermia zwiększa działanie onkonazy, predysponując komórki nowotworowe do apoptozy. Halicka i wsp. [14] badali wpływ łagodnej hipertermii na aktywność przeciwnowotworową onkonazy. Komórki ludzkiego TK6 *lymphoblastoid* poddano działaniu

2 lub 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  onkonazy w temperaturze 40°C przez 24 lub 48 godzin, zwiększając w ten sposób apoptozę tych komórek o 64–200% w porównaniu z hodowlami w 37,5°C. Zwiększeniu apoptozy towarzyszyła aktywna kaspaza 3. W hodowlach kontrolnych (bez leku) w temperaturze 40 i 37,5°C indeks apoptozy był podobny.

#### BADANIA PRZEDKLINICZNE *IN VIVO* NA MODELACH ZWIERZĘCYCH

Mikulski i wsp. [34] badali aktywność przeciwnowotworową onkonazy u myszy z implantowanymi dootrzewnowo komórkami M109 raka płuca. Lek podawano w dawkach 6–80  $\mu\text{g}$ , codziennie lub według sześciu różnych rozkładów tygodniowych. Czas przeżycia i pojawienia się wodobrusza był statystycznie znacząco dłuższy u myszy leczonych onkonazą niż w grupie kontrolnej. Większy efekt przeciwnowotworowy i wyraźnie dłuższe przeżycie (również długoterminowe) obserwowano u zwierząt, u których onkonazę podawano raz w tygodniu.

Przeprowadzili również badania na myszach z wszczepionymi komórkami A-253 ludzkiego raka płaskonabłonkowego ślinianki. Działanie onkonazy porównywano z działaniem obojętnego roztworu soli. Onkonazę w dawce 16  $\mu\text{g}$  podawano śródtrzewnowo przez 8 lub 16 dni. Wśród transfekowanych myszy leczonych przez 16 dni wystąpiła większa, przeważnie odwracalna, toksyczność. Zaobserwowano znaczące wydłużenie czasu przeżycia grupy badanej, w porównaniu z czasem przeżycia w grupie kontrolnej [8,38,46].

Onkonaza była także podawana dootrzewnowo w różnych dawkach, w czterech grupach myszy transfekowanych



komórkami raka jajnika OVCAR-3 [38,46]. Onkonaza opóźniała narastanie związanego z nowotworem wodobrzusza, ale nie miała znaczącego wpływu na wydłużenie czasu przeżycia.

Efektywność terapeutyczną onkonazy podanej samodzielnie lub w połączeniu z cisplatyną lub karboplatyną obserwowano zarówno w modelu *in vivo* jak i *in vitro* ludzkiego raka niedrobnokomórkowego płuc A549 [27]. Onkonaza hamowała wzrost komórek nowotworowych ( $IC_{50}=1 \mu\text{g/ml}$ ). Podczas jednoczesnego podania cisplatyny i onkonazy przez 24 godziny obserwowano wzrost skuteczności działania cisplatyny. Podobnie w przypadku podania cisplatyny przed onkonazą. Efektywność cisplatyny zmniejszała się natomiast gdy lek był podawany po onkonazie. Podobne wyniki dawała terapia skojarzona z karboplatyną. Onkonaza w dawce  $10 \mu\text{g/ml}$  opóźniała wzrost komórek A549 o 15 dni. Ciplatyna w dawce  $5 \text{ mg/kg}$  zwalniała rozrost o 7 dni w porównaniu z grupą kontrolną. Skojarzenie obydwu leków opóźniało wzrost guza o 25 dni. Zaobserwowano spadek masy ciała o 10–15%, powrót do poziomów wyjściowych następował po 7 dniach od zakończenia leczenia. W trakcie badania monitorowano wpływ onkonazy na perfuzję nerek i guza wykorzystując metodę rezonansu magnetycznego (MR) z kontrastem (Gd-DPTA). Czas relaksacji T1 w rdzeniu i korze nerek był obniżony 1–2 dni po leczeniu i wracał do wartości prawidłowych po 4–8 dniach od zakończenia leczenia [27].

Lee i wsp. [25,30] w swoich doświadczeniach *in vitro* i *in vivo* porównywali działanie różnych dawek onkonazy na komórki raka płuca A549. W koloniach komórkowych rapirnazą hamowała wzrost nowotworu, nie powodując uszkodzenia komórek nienowotworowych (HLF-1 fibroblastów płucnych). Małe dawki onkonazy znacząco wydłużały okres opóźnienia wzrostu komórek nowotworowych A549, zwiększały również *in vivo* apoptozę komórek z  $0,5\pm 0,3\%$  do  $70,1\pm 1,1\%$ . Małe dawki rapirnaz były bardziej skuteczne niż jednorazowe podanie dużej dawki dla zahamowania wzrostu guza, wywołując znamienne mniej działań niepożądanych [25,30].

Badania przeprowadzone przez Rybaka i wsp. [47] *in vitro* i *in vivo* na myszach z wszczepionymi komórkami raka okrężnicy HT-29 wykazały synergistyczne działanie przeciwnowotworowe onkonazy i winkrystyny, przeciw komórkom HT-29 wykazującym ekspresję genu MDR-1, odpowiedzialnego za oporność wielolekową. Leczenie to zwiększało istotnie czas przeżycia myszy. Zahamowanie wzrostu komórek i cytotoksyczność terapii skojarzonej w tych komórkach były zbliżone do działania samej winkrystyny na komórki guza wrażliwe na chemioterapię (MDR-1). Mechanizm, dzięki któremu onkonaza pokonuje oporność związaną z występowaniem genu MDR-1 w komórkach linii HT-29 nie jest jeszcze znany.

Mikulski i wsp. [33] przeprowadzili doświadczenia *in vivo* na dwóch modelach badawczych: pierwszym – po wszczepieniu myszom podskórnie komórek raka piersi MDA-MB-231 i drugim – po dożylnym podaniu myszom komórek raka piersi MDA-MB-231. Stwierdzono synergizm działania onkonazy i doksorubicyny [33]. W obydwu modelach podawano onkonazę w dawce  $2,5 \text{ mg/kg}$  śródtrzewnowo dwa razy w tygodniu przez 3 tygodnie. Doksorubicyna ( $5 \text{ mg/kg}$ ) była podawana dożylnie w tych samych dniach. Terapia skojarzona w obu modelach hamowała wzrost nowotworu

w znacznie większym stopniu niż leki podawane osobno. Czas przeżycia w przypadku chemioterapii łączonej wydłużył się znacząco. Mediana przeżycia, w porównaniu z grupą kontrolną (58 dni) dla onkonazy wynosiła 72 dni, dla doksorubicyny natomiast 76 dni. W przypadku jednoczesnego podania obu leków mediana przeżycia wynosiła 187 dni. Przeżycie długoterminowe wynosiło 30%.

Newton i wsp. [41] przeprowadzili badania *in vitro* i *in vivo* wskazujące na przeciwnowotworową aktywność onkonazy kowalencyjnie związanej z przeciwciałem anti-CD22 (LL2). W warunkach *in vitro* LL2 zwiększało aktywność i swoistość onkonazy przeciw komórkom chłoniaka Daudi Burkitt, równocześnie zmniejszając ogólnoustrojową cytotoksyczność leku. Ekspozycja komórek Daudi na LL2-onkonazę przez 1 godzinę powodowała śmierć kolonii komórkowych. Aktywność przeciwnowotworowa została potwierdzona w doświadczeniach na myszach z wszczepionymi komórkami chłoniaka Daudi. Po podaniu śródtrzewnowym  $100 \text{ mg}$  LL2-onkonazy w 5-dniowej kuracji, czas przeżycia z chorobą resztkową uległ wydłużeniu o 200%. Długość przeżycia myszy z rozsianym chłoniakiem (z postacią białaczkową) wydłużyła się o 135%.

Badano także *in vitro* i *in vivo* wpływ onkonazy na wrażliwość komórek raka płuca A549 na radioterapię [22,26,51]. Znaczący wzrost efektywności radioterapii obserwowano u myszy, którym podawano onkonazę na dwie godziny przed rozpoczęciem napromieniania. Wielkość guza ulegała o 50% większej redukcji w stosunku do myszy poddawanych tylko radioterapii. Onkonaza zwiększa wrażliwość na radioterapię poprzez kilka mechanizmów komórkowych. Prawdopodobnie hamuje ona naprawę subletalnych uszkodzeń (SLDR) w komórkach nowotworowych, zwiększa utlenowanie w krwi przepływającej przez guz, zwiększa przepływ krwi, hamuje wykorzystanie tlenu przez komórki nowotworowe oraz indukuje apoptozę komórek guza [22,24,26,28,51].

#### BADANIA KLINICZNE Z ONKONAZĄ

Onkonaza, jako pierwsza rybonukleaza, została dopuszczona do badań klinicznych u pacjentów onkologicznych [6,12]. Badania kliniczne były prowadzone u pacjentów chorych na raka nerki, niedrobnokomórkowego raka płuc, trzustki, piersi oraz *mesothelioma* [6,7,12,46].

W badaniach klinicznych I fazy u pacjentów chorych na *mesothelioma* [36], określono maksymalną dobrze tolerowaną dawkę onkonazy na  $960 \mu\text{g/m}^2$  (zakres dawek  $60\text{--}960 \mu\text{g/m}^2$ ), przy tej dawce nie występowały objawy niepożądane. Toksycznymi objawami, które występowały po przekroczeniu dawki maksymalnej, były: proteinuria z lub bez azotemii, obrzęki, osłabienie. Rzadziej występowały objawy, takie jak: zawroty głowy, zaczerwienienie twarzy, brak apetytu, bóle mięśni. Onkonaza nie wykazywała natomiast działania mielosupresyjnego, kardiotoksycznego, hepatotoksycznego. Nie powodowała również łysienia, zapalenia błon śluzowych, koagulopatii, czy innych objawów metabolicznych. Onkonaza była zazwyczaj dobrze tolerowana przez pacjentów i wykazywała niewielkie, odwracalne działania niepożądane [12,36].

W badaniach II fazy u pacjentów ze zdiagnozowaną nieoperacyjną i progresywną postacią *mesothelioma*, oceniano

działanie różnych dawek onkonazy w monoterapii [35]. Pierwszorzędnym punktem końcowym był czas przeżycia, drugorzędowym punktem końcowym była odpowiedź guza na leczenie i czas do progresji choroby. Do badań zostało włączonych 105 pacjentów. Używając kryteriów prognostycznych *The Cancer and Leukemia Group B* (CALGB) [17], określono grupy pacjentów jako TTG (treatment target group) i ITT (intent-to-treat), analizując czas przeżycia w obu grupach. Zaobserwowano średni czas przeżycia 6 miesięcy w grupie ITT i 8,3 miesiąca u pacjentów należących do grupy TTG. Wśród pacjentów należących do ITT roczny i dwuletni okres przeżycia obserwowano w odpowiednio: 34,3 i 21,6% chorych. W grupie TTG okres przeżycia rocznego i dwuletniego wynosił odpowiednio: 42 i 26,8% pacjentów. U 81 pacjentów stwierdzono odpowiedź guza na leczenie, u czterech częściową odpowiedź, dwóch miało stwierdzoną minimalną odpowiedź na leczenie. U 35 chorych stwierdzono stabilizację wcześniej progresywnej choroby. Pacjenci ze stwierdzoną regresją bądź stabilizacją choroby, mieli istotnie przedłużony czas przeżycia. Onkonaza była dobrze tolerowana przez większość chorych. Podczas badań nie stwierdzono zgonów związanych z toksycznością leku [35].

W II fazie badań klinicznych oceniano również działanie onkonazy u chorych z przerzutowym, zaawansowanym rakiem nerki [55]. W badaniach uczestniczyło 14 pacjentów, wszyscy byli wcześniej poddawani immunoterapii, trzech otrzymywało wcześniej chemioterapię. W trakcie badań chorym podawano onkonazę w dawce 480 µg/m<sup>2</sup>/tydzień. Średni czas przeżycia pacjentów wynosił 16 miesięcy. W tym czasie nie zaobserwowano odpowiedzi na leczenie. Stwierdzono minimalny wpływ tej dawki onkonazy na komórki raka nerki [10,55].

Najbardziej zaawansowane próby kliniczne z onkonazą u chorych z międzybłoniakiem płucnej, opornych na wcześniejsze linie leczenia, to zakończone niedawno randomizowane badanie III fazy [7,56]. Prowadzone jest także badanie I/II fazy u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuc.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Ardel B., Ardel W., Darzynkiewicz Z.: Cytotoxic ribonucleases and RNA interference (RNAi). *Cell Cycle*, 2003; 2: 22–24
- [2] Ardel B., Juan G., Burfeind P., Salomon T., Wu J.M., Hsieh T., Deptala A., Mikulski S., Shogen K., Ardel W., Darzynkiewicz Z.: Suppression of intracellular oxidative stress by onconase. Fifth International Meeting on Ribonucleases, Warrenton, USA, 1999
- [3] Ardel B., Juan G., Burfeind P., Salomon T., Wu J.M., Hsieh T.C., Li X., Sperry R., Pozarowski P., Shogen K., Ardel W., Darzynkiewicz Z.: Onconase, an anti-tumor ribonuclease suppresses intracellular oxidative stress. *Int. J. Oncol.*, 2007; 31: 663–669
- [4] Ardel W., Mikulski S.M., Shogen K.: Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 245–251
- [5] Bauer K.D., Dethlefsen L.A.: Control of cellular proliferation in HeLa-S3 suspension cultures. Characterization of cultures utilizing acridine orange staining procedures. *J. Cell. Physiol.*, 1979; 108: 99–112
- [6] Beck A.K., Pass H.I., Carbone M., Yang H.: Ranpirnase as a potential antitumor ribonuclease treatment for mesothelioma and other malignancies. *Future Oncol.*, 2008; 4: 341–349
- [7] Costanzi J., Sidransky D., Navon A., Goldsweig H.: Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirnase. *Cancer Invest.*, 2005; 23: 643–650
- [8] Darzynkiewicz Z., Carter S.P., Mikulski S.M., Ardel W.J., Shogen K.: Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent. *Cell Tissue Kinet.*, 1988; 21: 169–182

## FARMAKOKINETYKA ONKONAZY

Vasandani i wsp. [54] badali molekularne podstawy różnic w farmakokinetyce rybonukleaz A. Biodystrybucja pięciu związków należących do superrodziny trzustkowych rybonukleaz A: onkonazy, ludzkiej trzustkowej RNAzy A, rekombinowanej ludzkiej angiogeniny (rhAng), ludzkiej eozynofilowej neurotoksyny (EDN) oraz bydłowej RNAzy była oceniana u myszy BALB/c. Klirens osoczowy wszystkich pięciu RNAz był podobny, znaczne różnice występowały w przypadku dystrybucji narządowej. Przeciętne wartości okresu półtrwania ranpirnazy, dla wczesnej i późnej fazy kinetyki osoczowej wynosiły  $T_{1/2\alpha}=2,3$  minuty,  $T_{1/2\beta}=36,5$  minuty. Onkonaza, RNAza o największej toksyczności przeciwnowotworowej wykazywała najdłuższą retencję w nerkach; po 180 minutach w nerkach znajdowało się jeszcze 50% podanej dawki. Po tym samym czasie w nerkach znajdowało się 1% lub mniej z podanej dawki innych RNAz. Wolniejsza eliminacja onkonazy może być związana z większym stopniem wiązania związku w nerkach lub z opornością na degradację proteolityczną. Około 2,5% całkowitej podanej dawki leku znaleziono w guzie.

## PODSUMOWANIE

Onkonaza jest lekiem wykazującym złożoną aktywność przeciwnowotworową. Potwierdzono jej skuteczność w wielu liniach ludzkich komórek nowotworowych. Wykazuje dużą aktywność cytotoksyczną, przy braku lub minimalnych działaniach niepożądanych. Szczególnie zachęcające są wyniki badań w nowotworach wykazujących pierwotną oporność na chemioterapię. Ważną cechą onkonazy jest również synergizm wykazywany w działaniu z wieloma innymi chemioterapeutykami. Onkonaza jako pierwsza wśród rybonukleaz została dopuszczona do badań klinicznych u pacjentów onkologicznych. Badania kliniczne II-III fazy dostarczają bardzo obiecujących wyników, zwłaszcza dotyczących *mesothelioma*.

- [9] Deptala A., Halicka H.D., Ardel B., Ardel W., Mikulski S.M., Shogen K., Darzynkiewicz Z.: Potentiation of tumor necrosis factor induced apoptosis by onconase. *Int. J. Oncol.*, 1998; 13: 11–16
- [10] Dumas M.C., Stadler W., Mikulski S., Vogelzang N.J.: Phase II clinical trial of intravenous onconase (ONC) in patients (PTS) with metastatic renal cell carcinoma (RCC). (Abstract 1272) ASCO Proceedings, 1998
- [11] Easty D.M., Ledoux L., Ambrose E.J.: The action of ribonuclease on neoplastic growth. III. Studies by interference microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1956; 20: 528–537
- [12] Favaretto A.: Overview on ongoing or planned clinical trials in Europe. *Lung Cancer*, 2005; 49(Suppl.1): S117–S121
- [13] Grabarek J., Ardel B., Du L., Darzynkiewicz Z.: Activation of caspases and serine proteases during apoptosis induced by onconase (ranpirnase). *Exp. Cell Res.*, 2002; 278: 61–71
- [14] Halicka H.D., Ardel B., Shogen K., Darzynkiewicz Z.: Mild hyperthermia predisposes tumor cells to undergo apoptosis upon treatment with onconase. *Int. J. Oncol.*, 2007; 30: 841–847
- [15] Halicka H.D., Juan G., Ardel B., Mittelman A., Ardel W., Mikulski S.M., Shogen K., Darzynkiewicz Z.: Induction of differentiation and apoptosis of U937 and HL-60 cells by onconase: potentiation by inhibitors of protein kinases. (Abstract 18) ASCO Proceedings, 1996
- [16] Halicka H.D., Murakami T., Papageorgio C.N., Mittelman A., Mikulski S.M., Shogen K., Darzynkiewicz Z.: Induction of differentiation of leukaemic (HL-60) or prostate cancer (LNCaP, JCA-1) cells potentiates apoptosis triggered by onconase. *Cell Prolif.*, 2000; 33: 407–417



- [17] Herndon J.E., Green M.R., Chahinian A.P., Corson J.M., Suzuki Y., Vogelzang N.J.: Factors predictive of survival among 337 patients with mesothelioma treated between 1984 and 1994 by the Cancer and Leukemia Group B. *Chest*, 1998; 113: 723–731
- [18] Hsieh T., Tsai S.Y., Ardel B., Mikulski S.M., Shogen K., Ardel W., Darzynkiewicz Z., Wu J.M.: Gene responses to onconase in cultured Jurkat T cells. Abstract submitted to the 5<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 3<sup>rd</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Knossos Royal Village, Hersonissos, Crete, Greece, October 19–21, 2000
- [19] Jordanov M.S., Ryabinina O.P., Wong J., Dinh T.H., Newton D.L., Rybak S.M., Magun B.E.: Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis. *Cancer Res.*, 2000; 60: 1983–1994
- [20] Ita M., Halicka H.D., Tanaka T., Kurose A., Ardel B., Shogen K., Darzynkiewicz Z.: Remarkable enhancement of cytotoxicity of onconase and cepharanthine when used in combination on various tumor cell lines. *Cancer Biol. Ther.*, 2008; 7: 1104–1108
- [21] Juan G., Ardel B., Li X., Mikulski S.M., Shogen K., Ardel W., Mittelman A., Darzynkiewicz Z.: G1 arrest of U937 cells by onconase is associated with suppression of cyclin D3 expression, induction of p16INK4, p21WAF1/CIP1 and p27KIP and decreased pRb phosphorylation. *Leukemia*, 1998; 12: 1241–1248
- [22] Kim D.H., Kim E.J., Kalota A., Gewirtz A.M., Glickson J., Shogen K., Lee I.: Possible mechanisms of improved radiation response by cytotoxic RNase, onconase, on A549 human lung cancer xenografts of nude mice. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007; 599: 53–59
- [23] Kurzock R., Talpaz M., Gutterman J.U.: Interferons- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ : basic principles and preclinical studies. In: *Biologic Therapy of Cancer*. Devita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds.) J.B. Lippincott Co., 1991: 247–274
- [24] Lee I.: Ranpirnase (onconase), a cytotoxic amphibian ribonuclease, manipulates tumour physiological parameters as a selective killer and a potential enhancer for chemotherapy and radiation in cancer therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2008; 8: 813–827
- [25] Lee I., Kalota A., Gewirtz A.M., Shogen K.: Antitumor efficacy of the cytotoxic RNase, ranpirnase, on A549 human lung cancer xenografts of nude mice. *Anticancer Res.*, 2007; 27: 299–307
- [26] Lee I., Kim D., Glickson J., Shogen K.: Enhanced radiation response in A549 human lung tumors by the RNase onconase. Presented at the Annual American Association for Cancer Research (Special Conference for Lung Cancer) Feb. 24, 2005
- [27] Lee I., Kim D., Kim E., Shogen K., Glickson J.: Physiological mechanisms of the enhanced efficacy of cisplatin and carboplatin by onconase. Presented at the Annual American Association for Cancer Research (Abstract 4951) April 16–20, 2005
- [28] Lee I., Kim D.H., Sunar U., Magnitsky S., Shogen K.: The therapeutic mechanisms of ranpirnase-induced enhancement of radiation response on A549 human lung cancer. *In Vivo*, 2007; 21: 721–728
- [29] Lee I., Lee Y.H., Mikulski S.M., Lee J., Shogen K.: Enhanced cellular radiation sensitivity of androgen-independent human prostate tumor cells by onconase. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 1037–1040
- [30] Lee I., Shogen K.: Mechanisms of enhanced tumoricidal efficacy of multiple small dosages of ranpirnase, the novel cytotoxic ribonuclease, on lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2008; 62: 337–346
- [31] Lee I., Shui C., Shogen K., Mikulski S.M., Nunno M., Wallner P.E.: Changes in radiation response and physiological parameters in various tumors by onconase. (Poster No. P06-95) The Annual Meeting of Radiation Research Society Proceedings, 1996
- [32] Michaelis M., Cinatl J., Anand P., Rothweiler F., Kotchetkov R., von Deimling A., Doerr H.W., Shogen K., Cinatl J.Jr.: Onconase induces caspase-independent cell death in chemoresistant neuroblastoma cells. *Cancer Lett.*, 2007; 250: 107–116
- [33] Mikulski S., Newton D., Wiltrout R., Rybak S.: Onconase and doxorubicin synergy in prolonging survival of MDA-MB-231 human breast cancer bearing nude mice. AACR Meeting, 1999
- [34] Mikulski S.M., Ardel W., Shogen K., Bernstein E.H., Menduke H.: Striking increase of survival of mice bearing M109 Madison carcinoma treated with a novel protein from amphibian embryos. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990; 82: 151–153
- [35] Mikulski S.M., Costanzi J.J., Vogelzang N.J., McCachren S., Taub R.N., Chun H., Mittelman A., Panella T., Puccio C., Fine R., Shogen K.: Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirnase in patients with unresectable malignant mesothelioma. *J. Clin. Oncol.*, 2002; 20: 274–281
- [36] Mikulski S.M., Grossman A.M., Carter P.W., Shogen K., Costanzi J.J.: Phase I human clinical trial of onconase (P-30 Protein) administered intravenously on a weekly schedule in cancer patients with solid tumors. *Int. J. Oncol.*, 1993; 3: 57–64
- [37] Mikulski S.M., Viera A., Ardel W., Menduke H., Shogen K.: Tamoxifen and trifluoroperazine (stelazine) potentiate cytostatic/cytotoxic effects of P-30 protein, a novel protein possessing anti-tumor activity. *Cell Tissue Kinet.*, 1990; 23: 237–246
- [38] Mikulski S.M., Viera A., Shogen K.: *In vitro* synergism between a novel amphibian oocytic ribonuclease (onconase) and tamoxifen, lovastatin and cisplatin in human OVCAR-3 ovarian carcinoma cell line. *Int. J. Oncol.*, 1992; 1: 779–785
- [39] Mosimann S.C., Ardel W., James M.N.: Refined 1.7 Å X-ray crystallographic structure of P-30 protein, an amphibian ribonuclease with anti-tumor activity. *J. Mol. Biol.*, 1994; 236: 1141–1153
- [40] Mosimann S.C., Johns K.L., Ardel W., Mikulski S.M., Shogen K., James M.N.: Comparative molecular modeling and crystallization of P-30 protein: a novel anti-tumor protein of *Rana pipiens* oocytes and early embryos. *Proteins*, 1992; 14: 392–400
- [41] Newton D.L., Hansen H.J., Mikulski S.M., Goldenberg D.M., Rybak S.M.: 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
- [42] Nitta K., Ozaki K., Ishikawa M., Furusawa S., Hosono M., Kawauchi H., Sasaki K., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S.: Inhibition of cell proliferation by *Rana catesbeiana* and *Rana japonica* lectins belonging to the ribonuclease superfamily. *Cancer Res.*, 1994; 54: 920–927
- [43] Nitta K., Ozaki K., Tsukamoto Y., Furusawa S., Ohkubo Y., Takimoto H., Murata R., Hosono M., Hikichi N., Sasaki K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S.: Characterization of a *Rana catesbeiana* lectin-resistant mutant of leukemia P388 cells. *Cancer Res.*, 1994; 54: 928–934
- [44] Ramos-Nino M.E., Littenberg B.: A novel combination: ranpirnase and rosiglitazone induce a synergistic apoptotic effect by down-regulating Fra-1 and Survivin in cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 2008; 7: 1871–1879
- [45] Ramos-Nino M.E., Vianale G., Sabo-Attwood T., Mutti L., Porta C., Heintz N., Mossman B.T.: Human mesothelioma cells exhibit tumor cell-specific differences in phosphatidylinositol 3-kinase/AKT activity that predict the efficacy of onconase. *Mol. Cancer Ther.*, 2005; 4: 835–842
- [46] Ranpirnase: amphibian ribonuclease A, P-30 protein-alfacell. *Drugs R D*, 2007; 8: 120–124
- [47] Rybak S.M., Pearson J.W., Fogler W.E., Volker K., Spence S.E., Newton D.L., Mikulski S.M., Ardel W., Riggs C.W., Kung H.F., Longo D.L.: Enhancement of vincristine cytotoxicity in drug-resistant cells by simultaneous treatment with onconase, an antitumor ribonuclease. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996; 88: 747–753
- [48] Saxena S., Mikulski S.M., Shogen K., Youle R.: Onconase specificity for tRNA. Presented at the 88th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Abstract 3760) Proc AACR, 1997; 38: 560
- [49] Stanners C.P., Adams M.E., Harkins J.L., Pollard J.W.: Transformed cells have lost control of ribosome number through their growth cycle. *J. Cell. Physiol.*, 1979; 100: 127–138
- [50] Suhasini A.N., Sirdeshmukh R.: Transfer RNA cleavages by onconase reveal unusual cleavage sites. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 12201–12209
- [51] Sunar U., Zhou C., Durduran T., Yu G., Yodh A.G., Lee I.: Ranpirnase enhances efficacy of radiation on A549 human lung cancer xenografts of nude mice assessed by diffuse optical spectroscopies. OSA Topical Meeting, 2005; 6: 1–3
- [52] Tsai S.Y., Ardel B., Hsieh T.C., Darzynkiewicz Z., Shogen K., Wu J.M.: Treatment of Jurkat acute T-lymphocytic leukemia cells by onconase (ranpirnase) is accompanied by an altered nucleocytoplasmic distribution and reduced expression of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Int. J. Oncol.*, 2004; 25: 1745–1752
- [53] Vasandani V.M., Castelli J.C., Hott J.S., Saxena S., Mikulski S.M., Youle R.J.: Interferon enhances the activity of the anticancer ribonuclease, onconase. *J. Interferon Cytokine Res.*, 1999; 19: 447–454
- [54] Vasandani V.M., Wu Y.N., Mikulski S.M., Youle R.J., Sung C.: Molecular determinants in the plasma clearance and tissue distribution of ribonucleases of the ribonuclease A superfamily. *Cancer Res.*, 1996; 56: 4180–4186



- [55] Vogelzang N.J., Aklilu M., Stadler W.M., Dumas M.C., Mikulski S.M.: A phase II trial of weekly intravenous ranpirnase (onconase), a novel ribonuclease in patients with metastatic kidney cancer. *Invest New Drugs*, 2001; 19: 255–260
- [56] Vogelzang N.J., Taub R.N., Shin D., Costanzi J., Pass H., Gutheil J., Georgiadis M., McAndrew P., Kelly K., Chun H., Mittelman A., McCachren S., Shogen K., Mikulski S.M.: Phase III randomized trial of onconase (ONC) vs. doxorubicin (DOX) in patients (PTS) with unresectable malignant mesothelioma (UMM): analysis of survival. (Abstract 2274) *ASCO Proceedings* 2000
- [57] Wu Y., Mikulski S.M., Ardelt W., Rybak S.M., Youle R.J.: A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 10686–10693
- [58] Youle R.J., D'Alessio G.: Antitumor RNases. In: *Ribonucleases: Structures and Functions*. D'Alessio G., Riordan J.F. (eds.) Academic Press, 1997: 491–514

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

