

5 **Rybozomy typu ‘hammerhead’, kompozycja, środek terapeutyczny je obejmujące, ich zastosowania oraz sposób hydrolizy miR21 i prekursorów miR21**

Przedmiotem wynalazku są rybozomy typu ‘hammerhead’ specyficznie i wydajnie hydrolizujące miR21 RNA i/lub jego prekursory (pri-miR21 oraz pre-miR21), kompozycja i
10 środek terapeutyczny je obejmujące, ich zastosowania do obniżania komórkowej puli miR21, w terapii guzów mózgu oraz sposób hydrolizy miR21 i/lub prekursorów miR21.

Glejaki są najczęstszymi nowotworami centralnego układu nerwowego. Glejak wielopostaciowy (GBM, ang. glioblastoma multiforme) stanowi ponad 50% wszystkich glejaków oraz jest najbardziej złośliwym (IV stopnia złośliwości biologicznej wg WHO)
15 typem pierwotnych guzów mózgu. GBM cechuje naciekający charakter wzrostu, obfite unaczynienie, gwałtowna proliferacja oraz szybki i agresywny przebieg kliniczny. Ponadto, ze względu na jego lokalizację oraz znaczną oporność na konwencjonalne terapie rokowania są bardzo złe.

Niezmiennie od wielu lat standardem w leczeniu glejaków pozostaje leczenie
20 operacyjne jedynie wspomagane radio- i chemioterapią. Maksymalna cytoredukcja (> 98% guza) przedłuża życie, nawet do 9-12 miesięcy. Poprawia również odpowiedź pacjenta na radio- i chemioterapię. Często ze względu na umiejscowienie guza oraz jego naciekowy charakter interwencja chirurgiczna nie jest możliwa. Radioterapia (RT) stosowana jest standardowo jako pierwsze leczenie uzupełniające po zabiegu chirurgicznym. Standardem
25 w chemioterapii jest temozolomid (TMZ) oraz gliadel (Westphal M et al., Neurooncol 5, 79-88 (2003); Stupp R et al., N Engl J Med. 352, 987-996 (2005)). W przypadku nawrotów choroby, w grupie pacjentów leczonych TMZ oraz RT obserwuje się szybszy i agresywny wzrost nowotworu, który dodatkowo wykazuje znaczną oporność na leczenie.

Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w poznaniu molekularnych podstaw GBM.
30 Zidentyfikowano wiele celów terapeutycznych oraz potencjalnych terapeutyków. Większość z nowych podejść terapeutycznych wykorzystuje inhibitory małowcząsteczkowe, przeciwciała monoklonalne oraz szczepionki peptydowe stosowane w celu regulacji

szlaków komórkowych kluczowych dla rozwoju nowotworu, angiogenezy, a także
zniesienia lekooporności komórek nowotworowych. Pomimo, że podejścia te rokowały
bardzo dobrze, większość została odrzucona na etapie badań klinicznych. Glejaki od wielu
lat niezmiennie pozostają jednymi z najtrudniejszych w leczeniu, najgorzej rokujących
5 nowotworów, ze średnim czasem przeżycia wynoszącym mniej niż rok.

Wobec braku skutecznych metod leczenia glejaków, ich oporności na
konwencjonalne metody leczenia, wyzwaniem są badania nad coraz to nowymi celami
terapii oraz nowymi podejściami do leczenia GBM.

MikroRNA (miRNA) są to krótkie (~22 nt) RNA niekodujące białek. Odgrywają
10 kluczową rolę w wielu procesach komórkowych, takich jak: wzrost, różnicowanie, podziały,
apoptoza, sygnalizacja komórkowa oraz ekspresja genów. Szacuje się, że regulują ekspresję
ponad 30% wszystkich genów kodujących białka, w tym wielu onkogenów oraz białek
supresorowych (Bartel DP, Cell 116, 281-297 (2004); Esquela-Kerscher A et al., Nat Rev
Cancer 6, 259-269 (2006)).

15 Szacuje się, że zmiany w profilu ekspresji miRNA leżą u podłoża ponad 390 chorób
(<http://cmbi.bjmu.edu.cn/hmdd>). Największą grupę spośród nich stanowią choroby
nowotworowe. miRNA leżą u podłoża licznych chorób neurologicznych i psychiatrycznych,
w tym guzów mózgu. Dla wielu spośród nich określono swoiste profile ekspresji miRNA,
co znacząco zwiększyło możliwości ich diagnozy i prognozowania. Wskazują też nowe,
20 potencjalne cele terapeutyczne. Profil miRNA w nowotworach glejowych jest znacząco
różny od profilu w zdrowych komórkach nerwowych. Ponadto, podobnie jak w zdrowym
mózgu podczas jego rozwoju, tak w guzie w różnych stadiach jego zaawansowania profil
miRNA ulega dynamicznym zmianom. Wytypowano miRNA, których poziom jest
znacząco zmieniony w komórkach glejaka wielopostaciowego w stosunku do komórek
25 zdrowych. Badania twórców wynalazku wskazują, że jednym z miRNA o najbardziej
podwyższonym poziomie ekspresji w komórkach nowotworów glejowych jest miR21 RNA.
Korelacja poziomu miR21 i ekspresji jego potencjalnych targetów (mRNA rozpoznawanych
przez miRNA) pozwalają wnioskować, że jest on bezpośrednio zaangażowany w rozwój
nowotworów glejowych, może stanowić dobry marker diagnostyczny oraz potencjalny cel
30 terapii tego typu guzów (Nikaki A et al., Expert Opin Investig Drugs 21, 1475-1488
(2012)).

miR21 jest pierwszym poznany miRNA ssaków (Lagos-Quintana M et al., Science 294,
853-858 (2001)). Sekwencja kodująca miR21 zlokalizowana jest w ramieniu długim
chromosomu 17 (17q23.2, 55273409–55273480), w obrębie genu kodującego białko

TMEM49 (ang. transmembrane protein 49). Gen *MIR21* znajduje się w intronie mRNA tego białka, posiada własny promotor, a jego transkrypcja odbywa się niezależnie od transkrypcji *TMEM49*. Produktem genu *MIR21* jest transkrypt pri-miR-21 o długości 3433 nt, który ulega dojrzewaniu najpierw do pre-miR-21 (72 nt), a następnie dojrzałego miR-21 (22 nt).

5 Zawartość miR-21 w materiale klinicznym z guzów glejowych mózgu oraz linii komórkowych wywodzących się z GBM jest znacząco wyższa od poziomu tego miRNA w komórkach zdrowych pochodzenia mózgowego (Conti A et al., *J Neurooncol* 93, 325-332 (2009); Chan JA et al., *Cancer Res* 65, 6029-6033 (2005); Ciafre SA et al., *Biochem Biophys Res Commun* 334, 1351-1358 (2005)). Dodatkowo jego poziom koreluje ze
10 stopniem złośliwości guza. Poziom miRNA w tkance, płynie mózgowo rdzeniowym oraz surowicy krwi jest znacząco wyższy u pacjentów ze zdiagnozowanym glejakiem złośliwym, w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną. Dodatkowo jest on znacząco wyższy u pacjentów z nowotworem stopnia III, w porównaniu z pacjentami z nowotworem stopnia II. Poziom miR21 ulega obniżeniu u pacjentów poddanych chemio- oraz radioterapii. Możliwa jest
15 precyzyjna diagnoza nowotworów glejowych, określenie stadium zaawansowania choroby, prognozowanie przeżycia pacjentów, dobór odpowiedniego leczenia oraz monitorowanie przebiegu leczenia na podstawie profilu miR21 w tkance pooperacyjnej, a także w płynie mózgowo rdzeniowym oraz surowicy krwi.

Analiza funkcjonalna miR21 dowodzi, że odgrywa on kluczową rolę w procesie
20 kancerogenezy, a ograniczenie czy hamowanie jego właściwości może zatrzymać postęp choroby oraz uwrażliwić komórki odporne na chemio- oraz radioterapię na konwencjonalną terapię. Dotychczas wytypowano ponad 170 potencjalnych targetów dla miR21, powiązanych z 9 szlakami sygnalizacji komórkowej zaangażowanych w procesy nowotworzenia. Część z zaproponowanych targetów zweryfikowano doświadczalnie.
25 Pokazano przykładowo, że miR21 obniża poziom ekspresji białek zaangażowanych w regulację apoptozy (PDCD4, MTAP, SOX5) oraz białek odpowiedzialnych za oporność na chemioterapię (LRRIP1). Z drugiej strony, dla wielu białek, których zaburzony poziom wiąże się z zachwianiem procesu apoptozy, proliferacji, i innych, i ostatecznie zainicjowaniem oraz rozwojem nowotworu, obniżenie endogennej puli miR21 skutkuje
30 wzrostem ich ekspresji. Ponadto, pokazano, że obniżenie poziomu miR21 skutkuje wzmoczoną apoptozą komórek glioblastomy, obniża oporność na doxorubicin oraz tempo proliferacji komórek. Dowiedziono, że obniżenie poziomu miR21 w liniach komórkowych skutkuje zahamowaniem proliferacji komórek, wzmoczoną apoptozą, zmniejszeniem inwazyjności komórek (Zhou X et al., *Lab Invest* 90, 144-155 (2010); Li Y et al., *Brain res*

PK/1904/AGR

1286, 13-18 (2009); Corsten MF et al., *Cancer Res* 67,8994-9000 (2007)) oraz ich uwrażliwieniem na cytostatyki (Costa PM et al., *Human mol Genet*, pub ahead of print (2012); Zhu S et All, *Cell Res* 18, 350-359 (2008)), a w mysim układzie modelowym spowalnia wzrost guza oraz zmniejsza liczbę przerzutów (Gaur AB, *Neuro Oncol* 13, 580-590 (2011)). Potwierdza to, że miR21 może być dobrym celem terapii guzów mózgu (Li Y et al., *Brain Res* 1286, 13-18 (2009)).

Dotychczas analizowano możliwość zastosowania molekularnych narzędzi anty-miR21 (m.in. inhibitorów małocząsteczkowych) (Gumireddy K et al., *Angew Chem Int Ed Engl* 47, 7482-7484 (2008)). Wadami zaproponowanych narzędzi jako terapeutyków są jednak: słabo poznany mechanizm działania, niska specyficzność związków, możliwość hamowania także innych pre-miRNA oraz niski indeks terapeutyczny. Badania te nie dotyczyły bezpośrednio nowotworów glejowych.

W kontekście nowotworów glejowych próbowano zastosować antysensowne oligonukleotydy (AS-ON, ang. AntiSense-OligoNucleotide) skierowane na mi-R21 (Kurreck J, *Eur J Biochem* 270, 1628-1644 (2003). AS-ON użyte w kontekście miR21 oraz glioblastomy wykorzystano do badań podstawowych, weryfikacji oraz identyfikacji potencjalnych sekwencji docelowych dla miRNA oraz poznania efektów komórkowych będących skutkiem inhibicji miR21. Jednakże AS-ON obarczone są wieloma wadami takimi jak krótki okres półtrwania w osoczu, degradacja przez endo- i egzonukleazy (Campbell JM et al., *J Biochem Biophys Methods* 20, 259-267 (1990)), niska specyficzność AS-ON (tzw. off-target effect) mniejsza stabilność kompleksów AS-ON:RNA, utrudniony transport AS-ON przez błony komórkowe i barierę krew-mózg, konieczność stosowania nośnika, indukowanie odpowiedzi immunologicznej przez syntetyczne AS-ON zawierające niemetylowane dinukleotydy CpG, oraz fakt, że degradacja heterodupleksu AS-ON:miRNA jest zależna od endogennej maszynerii białkowej, głównie RNazy H.

Wynalazek dotyczy rybozymów typu 'hammerhead' skierowanych na miR21 oraz prekursorów miR21. Są to najmniejsze naturalne katalityczne RNA (Ferre-D'Amara AR et al. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a003574 (2010)). Swoją aktywność zawdzięczają rdzeniu katalitycznemu, specyficzność – komplementarności ramion rybozemu do jego substratu. Rybozym w kompleksie z substratem tworzy trzy odcinki helikalne (I, II i III) nazywane ramionami, które otaczają wysoce zachowawczą sekwencję rdzenia katalitycznego. Helisa I i III tworzone są przez hybrydyzację rybozemu z komplementarnymi rejonami substratu, helisa II tworzy rdzeń katalityczny.

Rybozomy katalizują sekwencyjnie-specyficzną hydrolizę RNA zawierających trójnukleotydy typu 5'-NUH-3', gdzie N oznacza dowolny nukleotyd, U urydynę natomiast H adenozyne, cytozynę lub urydynę niezwiązaną wiązaniami wodorowymi. Wydajność hydrolizy wiązań zależy głównie od sekwencji docelowego RNA (Sun LQ et al., *Pharmacol Rev* 52, 325-347 (2000)). Innymi czynnikami determinującymi ich aktywność, a równocześnie także specyficznosc jest długość oraz skład ramion rybozomu otaczających miejsce hydrolizy. Ramiona zapewniają silne związanie rybozomu z substratem i równocześnie umożliwiają jego łatwe uwolnienie od produktów hydrolizy, dzięki czemu rybozom staje się dostępny dla kolejnych cząsteczek substratu. Wydłużenie ramion rybozomu może się wiązać ze spadkiem wydajności hydrolizy, z kolei ich skrócenie ze spadkiem specyficznosci rybozomu (Hertel KJ et al., *Biochemistry* 33, 3374-3385 (1994); Kurreck J et al., *J Biol Chem* 277, 7099-7107 (2002)). Optymalna długość ramion hybrydujących to 6-10 reszt nukleotydowych (Scalon KJ, *Curr Pharma Biotech* 5, 415-420 (2004)). Twórcy niniejszego wynalazku wykazali w badaniach własnych, że wydajność hydrolizy katalizowanej przez rybozomy w znacznym stopniu zależy również od struktury RNA będącego substratem.

Z publikacji Suryawanshi H et al., *Mol BioSyst* 6, 1807-1809 (2010) znany jest rybozom typu 'hammerhead' oraz jego zmodyfikowany, oporny na nukleazy wariant komplementarny do pre-miR21 oraz miR21. Wykazano jego aktywność hydrolityczną w warunkach *in vitro* w stosunku do pre-miR21 ale nie do miR21. Obserwowano efekty zastosowania rybozomów w hodowli komórkowej: obniżenie puli endogennego miR21, zwiększenie ekspresji białka PDCD4 (białko targetowe miR21) oraz obniżenie przeżywalności komórek. Opisane w wymienionej pracy, zaprojektowane rybozomy to:

- forma dzika, o sekwencji:

25 5'-UCAGUCUCUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAUAAGCUAC-3'

- forma zmodyfikowana chemicznie: sekwencja nukleotydowa jak w przypadku formy dzikiej, wprowadzone modyfikacje chemiczne determinujące odporność na nukleazy.

Nie udowodniono jednak, że znane rybozomy hydrolizują dojrzały miR21, a jedynie pre-miR21. Na podstawie komplementarnosci sekwencji ramion rybozomu do miR21 oraz aktywnosci rybozomu względem pre-miR21 rybozomów opisanych w publikacji Suryawanshi H et al., *Mol BioSyst* 6, 1807-1809 (2010) można jedynie postulować, że rybozom ten jest aktywny również względem miR21. Również testy komórkowe nie dowodzą aktywnosci zaproponowanych rybozomów względem miR21. Obserwowane efekty komórkowe mogą być jedynie wynikiem hydrolizy pre-miR21.

W reakcjach *in vitro* wykazano aktywność rybozymów jedynie w 25 mM MgCl₂ (stężenie niefizjologiczne). Nie wykazano czy zaprojektowane rybozimy wykazują również aktywność w fizjologicznym stężeniu Mg²⁺ (tj ok. 1 mM). Ponad to, dostarczenie tak zaprojektowanego rybozimu do komórki wymaga nośnika, co może utrudniać potencjalne zastosowanie go w terapii.

Do tej pory nie przedstawiono rybozymów wykazujących wyższą aktywność względem pre-miR21 oraz miR21. Aktywność rybozymów można modulować poprzez wprowadzenie zmian w sekwencji rybozimu lub długości ramion rozpoznających substrat. Zmiany te mogą zwiększać, jak również obniżać, a nawet znosić aktywność rybozymów. Przykładowo, wprowadzenie jedynie 3 substytucji nukleotydowych w obrębie 22 nukleotydowego rdzenia katalitycznego powoduje całkowitą inaktywację rybozimu. W większości przypadków nie można w prosty sposób przewidzieć jaka zmiana sekwencji spowoduje spadek lub wzrost aktywności rybozimu. Każda nowa sekwencja wymaga eksperymentalnej oceny aktywności i wydajności (Gabryelska MM et al., Biochem J, 2013, epub ahead of print).

W świetle opisanego stanu techniki, niniejszy wynalazek ma na celu przezwyciężenie wskazanych niedogodności i dostarczenie nowych ulepszonych rybozymów typu 'hammerhead' specyficznie i wydajnie hydrolizujących miR21 i/lub jego prekursorów których właściwości zapewnią możliwość ich zastosowania do obniżania komórkowej puli miR21, w terapii guzów mózgu. Celem niniejszego wynalazku jest również dostarczenie nowych zastosowań ulepszonych rybozymów wydajnie hydrolizujących miR21 i/lub prekursorów miR21 i ich wykorzystania w terapii do leczenia chorób objawiających się zwiększeniem komórkowej zawartości miRNA dla miR21 i/lub prekursorów miR21. Celem wynalazku jest również dostarczenie kompozycji i środków terapeutycznych dla leczenia chorób objawiających się zwiększeniem komórkowej zawartości miRNA dla miR21 i/lub prekursorów miR21.

Wynalazek stanowią nowe rybozimy typu 'hammerhead', które wydajnie hydrolizują miR21 i/lub prekursorów miR21, w warunkach *in vitro* w fizjologicznym stężeniu Mg²⁺, a także *in vivo*, w komórkach glejowych. Ponad to, rybozimy będące przedmiotem wynalazku, w przeciwieństwie do rozwiązań znanych ze stanu techniki, składają się jedynie z naturalnych nukleotydów, nie posiadają modyfikacji chemicznych, co pozwala wykluczyć możliwość wystąpienia odpowiedzi komórkowej na zmodyfikowane nukleotydy.

Przedmiotem wynalazku są więc rybozomy typu 'hammerhead' skierowane na sekwencję miR21 i/lub prekursorów miR21, które mają zdolność do specyficznej hydrolizy miR21 i/lub prekursorów miR21, których rdzeń katalityczny ma sekwencję SEKW ID NR 1, oraz które zawierają po obu stronach ramiona, korzystnie sześci nukleotydy, o sekwencjach komplementarnych do rejonu w obrębie miR21 i/lub prekursorów miR21.

Wynalazek dotyczy również rybozomu skierowanego na sekwencję miR21 oraz prekursorów miR21, który ma sekwencję przedstawioną na SEKW ID NR 2.

Wynalazek dotyczy też rybozomu skierowanego na sekwencję prekursorów miR21, który to rybozym ma sekwencję przedstawioną na SEKW ID NR 3.

Wynalazek dotyczy również rybozomu skierowanego na sekwencję prekursorów miR21, który to rybozym ma sekwencję przedstawioną na SEKW ID NR 4.

Wynalazek ponadto dotyczy kompozycji, która zawiera co najmniej jeden rybozym według wynalazku lub ich mieszaninę. Taka kompozycja zawierająca rybozomy według wynalazku korzystnie zawiera nośnik zwiększający trwałość kwasów nukleinowych albo ułatwiający transport rybozymów przez błony komórkowe. Kompozycja korzystnie zawiera nośnik, którym jest Lipofektamina, przykładowo Lipofektamina 2000.

Wynalazek również dotyczy środka terapeutycznego, który jako substancję czynną zawiera co najmniej jeden rybozym według wynalazku lub ich mieszaninę. Środek terapeutyczny korzystnie ponadto zawiera inny składnik hamujący rozwój komórek nowotworowych do jednoczesnego lub kolejnego zastosowania w terapii antynowotworowej. Korzystnym składnikiem hamującym rozwój komórek nowotworowych jest temozolomid lub gliadel, a nowotworem jest guz mózgu, korzystnie glejak mózgu.

Rybozomy, kompozycja jak i środek terapeutyczny według wynalazku mogą być stosowane w terapii różnych nowotworów np. guzów mózgu, szczególnie glejaków wielopostaciowych.

Wynalazek dotyczy również zastosowania rybozymów według wynalazku albo ich mieszaniny, kompozycji według wynalazku, środka terapeutycznego według wynalazku do wytwarzania leku do leczenia chorób objawiających się zwiększeniem komórkowej zawartości miRNA dla miR21 i/lub prekursorów miR21. W korzystnym zastosowaniu chorobą objawiającą się zwiększeniem komórkowej puli miRNA dla miR21 i prekursorów miR21 jest nowotwór, korzystnie nowotworem jest guz mózgu, korzystnie glejak wielopostaciowy. Takie zastosowanie umożliwi selektywne niszczenie komórek nowotworowych. Lek taki może być stosowany w celu obniżania komórkowej zawartości

miR21, w terapii guzów mózgu szczególnie glijaków wielopostaciowych oraz innych chorób objawiających się zwiększoną pulą miR21 i/lub prekursorów miR21.

Wynalazek dotyczy również sposobu selektywnej hydrolizy miR21 i/lub prekursorów miR21, który obejmuje etap tworzenia kompleksu miR21 RNA i/lub 5 prekursora miR21 z rybozymem według wynalazku lub ich mieszaniną.

Środek według wynalazku można stosować w kombinowanej terapii antynowotworowej. W tym przypadku środek według wynalazku zawiera dodatkowy znany składnik wspomagający hamowanie rozwoju nowotworów do jednoczesnego lub kolejnego zastosowania w terapii antynowotworowej.

10 Dodatkowym składnikiem wspomagającym hamowanie rozwoju nowotworów może być znany środek chemioterapeutyczny taki jak temozolomid czy gliadel lub środek radioterapeutyczny. W takiej terapii zwiększy się jej skuteczność, a ze względu na ukierunkowane działanie na komórki ze zwiększoną ilością miR21 zmniejszy się również ilość skutków ubocznych. Środek według wynalazku można stosować w kombinowanej 15 terapii antynowotworowej. Środek podaje się na ogół w postaci odpowiednich form farmaceutycznych, gdzie substancja czynna jest połączona z terapeutycznie dopuszczalnym nośnikiem. Wybór nośnika będzie zależał od drogi podania środka i konieczności zabezpieczenia go przed inaktywacją lub degradacją przed wprowadzeniem lub w trakcie wprowadzania do komórek, tkanek lub organizmu.

20 Przykładowo substancję czynną w postaci kwasów nukleinowych można wprowadzać w układach liposomowych, korzystnie takich, które rozpoznają odpowiedni typ komórek lub tkanek.

Dawkę ustala się uwzględniając drogę podania, stan wymagający leczenia lub profilaktyki, a także inne specyficzne okoliczności.

25 Strukturę drugorzędową rybozymu typu 'hammerhead' według wynalazku przedstawia **Fig. 1**. Rybozym typu 'hammerhead' według wynalazku składa się z rdzenia katalitycznego o sekwencji SEKW ID NR 1 oraz ramion komplementarnych do rejonu w obrębie miR21 i/lub prekursora miR21. Korzystnie ramiona mają długość sześciu nukleotydów. Komplementarność ramion rybozymów do substratu jest warunkiem 30 koniecznym do zaistnienia hydrolizy. Gwarantuje to wysoką aktywność, specyficzność i precyzję zaprojektowanych narzędzi w warunkach *in vitro*, w fizjologicznym stężeniu Mg^{2+} oraz w warunkach komórkowych. Długość ramion rybozymu jest kompromisem między aktywnością rybozymów i ich specyficznością.

W korzystnym rybozymie sześci nukleotydowe ramiona flankujące rybozemu są komplementarne do rejonu w obrębie sekwencji dojrzałego miR21 oraz prekursorów miR21. Korzystnym rybozymem jest miR21rz1 o sekwencji SEKW ID NR 2, zawierający rdzeń katalityczny o sekwencji SEKW ID NR 1. Rybozym ten hydrolizuje wiązanie przy
5 końcu 3' C w obrębie sekwencji AUC.

Innym korzystnym rybozymem jest miR21rz2 o sekwencji SEKW ID NR 3 zawierający rdzeń katalityczny o sekwencji SEKW ID NR 1, który hydrolizuje wiązania przy końcu 3' C, w obrębie sekwencji AUC.

Korzystnym rybozymem jest też miR21rz3 o SEKW ID NR 4, zawierający rdzeń
10 katalityczny o sekwencji SEKW ID NR 1, który hydrolizuje wiązania przy końcu 3' C, w obrębie sekwencji GUC.

Korzystnie rybozomy według wynalazku wykazują aktywność obniżającą endogenną pulę miR21 i/lub prekursorów miR21 w komórkach glejowych (Fig. 7).

Wydajność hydrolizy pre-miR21 katalizowanej przez rybozomy według wynalazku
15 zależy od stężenia Mg^{2+} i zachodzi już w fizjologicznym stężeniu 1 mM, korzystnie do 5 mM, korzystniej do 10 mM, najkorzystniej w 25 mM stężeniu Mg^{2+} (Fig 2A i 2B). Rybozomy będące stanem techniki, opisane w Suryawanshi H et al., Mol BioSyst 6, 1807-1809 (2010) w testach *in vitro* wykazują aktywność jedynie w 25 mM $MgCl_2$ (stężenie niefizjologiczne). Nie wykazano czy rybozomy te wykazują również aktywność w
20 fizjologicznym stężeniu Mg^{2+} (około 1 mM).

Wydajność hydrolizy pre-miR21 katalizowanej przez rybozomy według wynalazku, jest zależna również od stężenia rybozymów, rosnąc wraz ze stosunkiem rybozym:substrat. Hydroliza pre-miR21 zachodzi korzystnie już przy 3-krotnym nadmiarze rybozemu w stosunku do substratu, korzystniej przy 6-krotnym nadmiarze rybozemu do substratu,
25 korzystniej przy 25-krotnym nadmiarze rybozemu do substratu, najkorzystniej przy 50-krotnym nadmiarze rybozemu do substratu (Fig 2C, 2D, 4 i 5).

Hydroliza pre-miR21 katalizowana przez rybozomy według wynalazku wymaga jonów Mg^{2+} , nie zachodzi w obecności jonów jednowartościowych (Na^+ , NH_4^+ , Li^+). Jest także hamowana przez politlenki etylenu, polimery z grupy polieterów, o niskiej masie
30 cząsteczkowej (200 oraz 400). Nie zaobserwowano hamowania hydrolizy w obecności innych czynników imitujących stłoczenie wewnątrzkomórkowe (*ang. molecular crowding*): PEG3350 oraz 5% MPD (Fig. 2F). Na wydajność hydrolizy pre-miR21 katalizowanej przez

PK/1904/AGR

rybozomy według wynalazku nie wpływają znacząco warunki denaturacji/renaturacji oraz moment zainicjowania reakcji w obecności Mg^{2+} (Fig. 2E).

Wydajność hydrolizy miR21 katalizowanej przez rybozomy według wynalazku, korzystnie rybozym o sekwencji SEKW ID NR 2, zależy od stężenia Mg^{2+} i zachodzi przy 5 10-krotnym nadmiarze rybozomu do substratu w stężeniu do 5 mM, korzystnie do 10 mM, najkorzystniej w 25 mM stężeniu Mg^{2+} (Fig. 3A i 3B).

Wydajność hydrolizy miR21 katalizowanej przez rybozym według wynalazku, zależy od stężenia rybozomu, rosnąc wraz ze stosunkiem rybozym:substrat. Hydroliza miR21 zachodzi korzystnie już przy 1.5-krotnym nadmiarze rybozomu do substratu, 10 korzystniej przy 3-krotnym nadmiarze rybozomu w stosunku do substratu, korzystniej przy 6-krotnym nadmiarze rybozomu do substratu, korzystniej przy 25-krotnym nadmiarze rybozomu do substratu, najkorzystniej przy 50-krotnym nadmiarze rybozomu do substratu (Fig. 3A i 3B).

Rybozomy według wynalazku charakteryzują się wysoką aktywnością w stosunku 15 do miR21. Wydajność hydrolizy miR21 katalizowanej przez rybozym według wynalazku, zależy od czasu trwania reakcji i zachodzi wydajnie już w czasie do pół godziny, korzystnie do 1 godziny, korzystniej do 2 godzin, korzystniej do 3 godzin, najkorzystniej do 5 godzin (Fig 3A i 3B).

Na wydajność hydrolizy miR21 katalizowanej przez rybozym według wynalazku nie 20 wpływają znacząco warunki denaturacji/renaturacji oraz moment zainicjowania reakcji w obecności Mg^{2+} (Fig. 3C).

W stanie techniki nie opisano aktywności rybozymów względem dojrzałego miR21. Postulowano jedynie, na podstawie komplementarności ramion rybozymów do miR21, że 25 mogą one wykazywać taką aktywność (Suryawanshi H et al., Mol BioSyst 6, 1807-1809 (2010)).

Twórcy wynalazku wykazali, że rybozomy są również aktywne w komórkach linii HeLa oraz linii T98G wyprowadzonej z glioblastomy. Wydajność hydrolizy pre-miRNA, w systemie reporterowym opartym na białku EGFP, katalizowanej przez rybozomy, według wynalazku, zależy od rodzaju i stężenia rybozymów, rosnąc wraz ze stężeniem rybozymów. 30 Hydroliza pre-miR21 zachodzi korzystnie już przy 31.25 nM, korzystniej przy 62.5 nM, korzystniej przy 125 nM, najkorzystniej przy 250 nM stężeniu rybozymów w pożywce hodowlanej. Wydajność hydrolizy pre-miR21, w systemie reporterowym, katalizowanej przez rybozomy według wynalazku jest zbliżona dla wszystkich zaprojektowanych

rybozymów. Zachodzi korzystnie z użyciem rybozymu miR21rz1 oraz miR21rz3, najkorzystniej z użyciem rybozymu miR21rz2 (**Fig. 4 i 5**).

Rybozomy anty-miR21, w przeciwieństwie do rybozymu kontrolnego (TARrz), efektywnie obniżają również endogenną zawartość miR21 oraz prekursorów miR21 w komórkach linii T98G wyprowadzonej z glejaka. Poziom wyciszenia pre-miR21 z użyciem 5 wszystkich zastosowanych rybozymów anty-miR21 względem kontroli jest zbliżony i wynosi prawie 60%. Wyciszenie miR21 względem kontroli zachodzi korzystnie po zastosowaniu 250 nM miR21rz2, na poziomie 21.2%, korzystniej po zastosowaniu 250 nM miR21rz2, na poziomie 31.1%, najkorzystniej po zastosowaniu 250 nM miR21rz1, na 10 poziomie 65.3%. Postuluje się, że obserwowany poziom wyciszenia miR21, po zastosowaniu miR21rz1 jest sumarycznym efektem hydrolizy miR21 oraz prekursorów miR21. Wskazuje to na przewagę narzędzi anty-miRNA według wynalazku, które jednocześnie hydrolizują dojrzały miRNA (miR21) oraz jego prekursor (**Fig. 7**).

Rybozomy będące stanem techniki, opisane w Suryawanshi H et al., *Mol BioSyst* 6, 15 1807-1809 (2010), w stężeniu 1 μ M powodują spadek poziomu miR21 w linii MCF-7 (linia wyprowadzona z ludzkich komórek raka piersi, charakteryzuje się wysoką ekspresją miR21) na poziomie 40% oraz 60% po użyciu odpowiednio rybozymu dzikiego oraz rybozymu zmodyfikowanego. Nie wykazano w stanie techniki wpływu rybozymów na endogenną pulę miR21.

20 Rybozomy mogą być nietrwałe i ulegać szybkiej hydrolizie w warunkach fizjologicznych. Twórcy wykazali, że trwałość rybozymów według wynalazku, w surowicy krwi oraz w komórkach linii wyprowadzonej z glioblastomy, jest znacząco zwiększona w obecności nośnika zwiększającego trwałość kwasów nukleinowych, korzystnie Lipofektaminy 2000 (**Fig. 8A i 8B**).

25 Dodatkowo twórcy wynalazku wykazali, że hydroliza rybozymów w surowicy krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz preparacie białkowym z guza mózgu zachodzi najwydajniej w obrębie ramion rybozymu. Rdzeń katalityczny rybozymu tworzy strukturę drugorzędową typu spinka do włosów, która jest odporna na hydrolizę. Utworzenie kompleksu rybozym:substrat może chronić również ramiona rybozymu przed nukleazami.

30 Cytowane w opisie publikacje oraz podane w nich odniesienia są również niniejszym włączone jako referencje.

Dla lepszego zrozumienia wynalazku, został on zilustrowany w przykładach wykonania oraz na załączonych figurach rysunku, na których:

Figura 1 przedstawia strukturę II-rzędową rybozemu typu 'hammerhead' według wynalazku oraz miejsca hydrolizy pre-miR21 oraz miR21 z użyciem rybozymów skierowanych na pre-miR21/miR21.

(A). Miejsca w obrębie pre-miR21 oraz miR21 znajdujące się w rdzeniu katalitycznym rybozymów zaznaczono liniami, miejsca hydrolizy strzałkami (B). N oznacza dowolny nukleotyd, R – purynę, U – urydynę, A – adeninę, C – cytozynę, G – guaninę.

Figura 2 przedstawia wyniki hydrolizy pre-miR21 z użyciem rybozymów miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3 (patrz **Przykład 2**).

A i B. Reakcje prowadzone przy stałym stężeniu rybozemu (miR21rz1/miR21rz2/miR21rz3) (250 nM) (25-krotny nadmiar rybozemu względem substratu) oraz różnych stężeniach Mg^{2+} (0, 1, 5, 10, 25, 50 mM).

C i D. Reakcje prowadzone w stałym stężeniu jonów Mg^{2+} (10 mM), różnych stężeniach rybozymów (miR21rz1/miR21rz2/miR21rz3) (0, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 nM) (odpowiednio 1.5625-, 3.125-, 6.25-, 12.5-, 25-krotny nadmiar rybozemu względem substratu).

E. Reakcje prowadzone w różnych warunkach denaturacji/renaturacji oraz inicjacji.

F. Reakcje prowadzone w obecności jonów jednowartościowych lub czynników imitujących stłoczenie wewnątrzkomórkowe.

C - kontrola reakcji; L – OH ladder (50mM NaOH, 10mM EDTA, 95°, 2 min); T1 – hydroliza z użyciem RNAzy T1 (20nM CH_3COONa pH 4.5, 7M mocznik, 1mM EDTA, 0.025u/ μ l RNAse T1, 55°C, 20 min), V1 – hydroliza z użyciem RNazy V1 (50mM TrisHCl pH 7.5, 200mM NaCl, 20mM $MgCl_2$, 0.0002u/ μ l RNAza V1, 25°C, 15min), S1 – hydroliza z użyciem nukleazy S1 (150mM CH_3COONa pH 8.0, 1M NaCl, 15mM $ZnSO_4$, 0.0095u/ μ l nuclease S1, 37°C, 30min)., S72 – substrat o długości 72nt (pre-miR21), P56, P16 – produkty hydrolizy, odpowiednio o długości 56 i 16 nt, G45, G44, G35, G32, G28, G25, G22, G18 – produkty hydrolizy pre-miR21 z użyciem nukleazy T1, podana nazwa wskazuje długość produktu hydrolizy.

Figura 3 przedstawia wyniki hydrolizy miR21 z użyciem rybozemu miR21rz1 (patrz **Przykład 2**).

A i B. Reakcje prowadzone w stałym stężeniu miR21 w obecności [^{32}P]miR21 RNA, w różnych stężeniach rybozemu lub $MgCl_2$.

PK/1904/AGR

1-6. Reakcje prowadzono w stałym stężeniu rybozymu (100 nM) (10-krotny nadmiar rybozymu względem substratu). Próby suplementowano różnymi stężeniami Mg^{2+} (0, 1, 5, 10, 25, 50 mM), po czym dalej inkubowano w 37°C przez 1 godzinę.

7-12. Reakcje prowadzono w stałym stężeniu rybozymu (100 nM) (10-krotny nadmiar względem substratu) i Mg^{2+} (10 mM), przez 0.5, 1, 2, 3, 5 godzin.

13-18. Reakcje prowadzono w różnych stężeniach rybozymu (0, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 nM) (odpowiednio 1.5625-, 3.125-, 6.25-, 12.5-, 25-krotny nadmiar rybozymu względem substratu). Próby suplementowano 10 mM Mg^{2+} , po czym dalej inkubowano w 37°C przez 1 godzinę.

10 C. Reakcje prowadzone w różnych warunkach denaturacji/renaturacji oraz inicjacji.

C - kontrola reakcji; L – OH ladder (50mM NaOH, 10mM EDTA, 95°, 2 min); T – hydroliza z użyciem RNAzy T1 (20nM CH_3COONa pH 4.5, 7M mocznik, 1mM EDTA, 0.025u/ μ l RNAse T1, 55°C, 20 min), S22 – substrat o długości 22nt (miR21), P9 – produkt hydrolizy o długości 9nt, G21, G18, G15, G11, G3 - produkty hydrolizy miR21 z użyciem nukleazy T1, podana nazwa wskazuje długość produktu hydrolizy.

Figura 4 przedstawia wpływ rybozymów anti-miR21 na stopień hydrolizy pre-miR21 w systemie reporterowym opartym na białku EGFP, w linii komórkowej HeLa (patrz **Przykład 3**).

20 A. Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego Leica komórek linii HeLa po 24 godzinach od transfekcji plazmidem pEGFP-N3 zawierającym sekwencję kodującą pre-miR21 oraz różnymi stężeniami katalitycznych kwasów nukleinowych.

B. Diagram obrazujący zależność poziomu białka EGFP od stężenia poszczególnych katalitycznych kwasów nukleinowych.

25 C. Analiza Western blot wskazująca zależność ekspresji białka EGFP od stężenia i rodzaju zastosowanego katalitycznego kwasu nukleinowego.

C – kontrola (komórki traktowane jedynie Lipofektaminą 2000, CR – rybozym kontrolny (TARrz).

30 **Figura 5** przedstawia wpływ rybozymów anti-miR21 na stopień hydrolizy pre-miR21 w systemie reporterowym opartym na białku EGFP, w linii komórkowej T98G wyprowadzonej z glioblastomy (patrz **Przykład 3**).

A. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego Leica komórek linii T98G po 24 godzinach od transfekcji plazmidem pEGFP-N3 zawierającym sekwencję kodującą pre-miR21 oraz różnymi stężeniami katalitycznych kwasów nukleinowych.

B. Diagram obrazujący zależność poziomu białka EGFP od stężenia poszczególnych katalitycznych kwasów nukleinowych.

C. Analiza Western blot wskazująca zależność ekspresji białka EGFP od stężenia i rodzaju zastosowanego katalitycznego kwasu nukleinowego.

C – kontrola (komórki traktowane jedynie Lipofektaminą 2000, CR – rybozym kontrolny (TARrz).

10 **Figura 6** przedstawia porównanie wydajności transfekcji komórek linii HeLa oraz T98G z użyciem znakowanego fluorescencyjnie dsRNA (patrz **Przykład 3**).

Figura 7 przedstawia wpływ rybozomów anty-miR21 na endogenną pulę miR21 oraz prekursorów miR21 w linii komórkowej T98G (patrz **Przykład 4**).

15 **Figura 8** przedstawia wyniki analizy stabilności rybozomu miR21rz3 w surowicy ludzkiej (A) oraz w linii komórkowej T98G (B) (patrz **Przykład 5**).

Poniższe przykłady zostały umieszczone jedynie w celu zilustrowania wynalazku, a nie w celu jego ograniczenia i nie powinny być utożsamiane z całym jego zakresem, który zdefiniowano w załączonych zastrzeżeniach.

PRZYKŁADY

20 **PRZYKŁAD 1**

Wytworzenie rybozomów miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3

Zaprojektowano rybozomy typu ‘hammerhead’ miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3 skierowane na sekwencję miR21 i/lub prekursorów miR21. 34 nt sekwencja rybozomów obejmuje 22 nt rdzeń katalityczny o sekwencji SEKW ID NR1 oraz zlokalizowane po obu stronach ramiona, korzystnie sześci nukleotydy, o sekwencjach komplementarnych do rejonu w obrębie miR21 i/lub prekursorów miR21. Rybozym miR21rz1 ma sekwencję SEKW ID NR 2, miR21rz2 sekwencję SEKW ID NR 3, miR21rz3 sekwencję SEKW ID NR 4. Sekwencję rdzenia katalitycznego rybozomów wybrano w oparciu o badania własne Zgłaszającego (Fedoruk-Wyszomirska A et al., J Biochem 145, 451-459 (2009)). Długość ramion rybozomu jest kompromisem między aktywnością rybozomów a ich specyficznością (Kurreck J et al., J Biol Chem 277, 7099-7107 (2000)). Rybozomy miR21rz1 i miR21rz2 zaprojektowano tak aby hydrolizowały wiązania na końcu 3’ C w obrębie sekwencji AUC,

PK/1904/AGR

miR21rz3 w obrębie sekwencji GUC. Obecność tych sekwencji w obrębie substratu oraz komplementarność ramion rybozymów do substratu są warunkami koniecznymi do zaistnienia hydrolizy. Gwarantuje to wysoką aktywność, specyficzność i precyzję zaprojektowanych narzędzi w warunkach *in vitro*, w fizjologicznym stężeniu Mg^{2+} oraz w warunkach komórkowych.

Strukturę II-rzędową rybozymu typu 'hammerhead' oraz miejsca hydrolizy pre-miR21 oraz miR21 z udziałem zaprojektowanych rybozymów przedstawiono na **Fig. 1**.

Rybozymy zostały zsyntetyzowane zgodnie ze standardową procedurą syntezy oligonukleotydów RNA przez firmę IBA.

10 PRZYKŁAD 2

Aktywność rybozymów skierowanych na miR21 w warunkach in vitro

Określono wydajność hydrolizy miR21 i/lub pre-miR21 z użyciem rybozymów według wynalazku w różnych stężeniach jonów Mg^{2+} (0, 1, 5, 10, 25, 50 mM), przy różnych stosunkach substratu do rybozymu oraz w różnym czasie (**Fig. 2 i 3**). pre-miR21 oraz miR21 inkubowano w nadmiarze (stężenia: 0, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 nM = odpowiednio 1.5625-, 3.125-, 6.25-, 12.5-, 25-krotny nadmiar rybozymu względem substratu) poszczególnych rybozymów miR21rz1/miR21rz2/miR21rz3, w 10 μ l, 50 mM Tris/HCl, pH 7.5. Reakcje prowadzono w obecności znakowanego na końcu 5' substratu, odpowiednio [^{32}P]pre-miR21 i [^{32}P]miR21. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 85°C przez 3 min. w celu denaturacji RNA, następnie wolno schładzano do 37°C (~0.5°C/min). Po osiągnięciu 37°C mieszaninę reakcyjną suplementowano $MgCl_2$ w celu zainicjowania reakcji i dalej inkubowano w tej samej temperaturze, 0 – 16 godzin. Reakcje zatrzymywano przez dodanie mieszaniny zawierającej 7M mocznik, 20 mM EDTA oraz barwniki (0.1% błękit bromofenolowy oraz 0.1% cyjanol ksylonowy). Próby analizowano w 20% żelu poliakrylamidowym z dodatkiem 7M mocznika. Wydajność reakcji określano na podstawie stosunku ilościowego substratu do produktu.

W warunkach *in vitro* rybozymy miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3 hydrolizują pre-miR21 z różną wydajnością. Najaktywniejszym z zaprojektowanych rybozymów jest miR21rz3. W 25-krotnym nadmiarze w stosunku do substratu, w 25 mM Mg^{2+} po 15 godzinach reakcji hydrolizuje on pre-miR21 na poziomie 12.5 % - prawie 5.5-krotnie wyższym niż miR21rz1. W żadnych z zastosowanych warunków *in vitro*, rybozym miR21rz2 nie wykazuje aktywności hydrolitycznej względem pre-miR21 natomiast wykazuje taką aktywność w warunkach *in vivo*. Wydajność reakcji katalizowanej przez ww. rybozymy zależy od

stężenia Mg^{2+} i zachodzi najwydajniej w 25 mM stężeniu tego jonu, przy czym wydajna hydroliza zachodzi już w 1 mM Mg^{2+} . Rybozomy będące stanem techniki, opisane w Suryawanshi H et al., Mol BioSyst 6, 1807-1809 (2010) w testach *in vitro* wykazują aktywność jedynie w 25 mM $MgCl_2$ (stężenie нефизjologiczne). Nie wykazano czy rybozomy te wykazują również aktywność w fizjologicznym stężeniu Mg^{2+} (1 mM).

Wydajność hydrolizy pre-miR21 jest zależna również od stężenia rybozymów. Wzrasta wraz ze wzrostem stosunku rybozym:substrat i osiąga w 10 mM Mg^{2+} , przy 3-krotnym nadmiarze rybozimu 2% i 3% wydajność hydrolizy pre-miR21, przy 50-krotnym nadmiarze rybozimu 9% i 20%, odpowiednio dla rybozimu miR21rz1 oraz miR21rz3 (**Fig. 2**).

10 W celu oceny przebiegu reakcji w obecności jonów jednowartościowych lub czynników imitujących stłoczenie wewnątrzkomórkowe (ang. molecular crowding) (**Fig. 2F**), reakcje prowadzono w stałym stężeniu pre-miR21 (10 nM), w obecności 30 000 cpm [^{32}P]pre-miR21 RNA, stałym stężeniu rybozimu miR21rz3 (250 nM), w 50 mM TrisHCl, pH 7.5 (1-13), 10 mM $MgCl_2$ (2-8, 13), 10 mM NaCl (10), 10 mM NH_4Cl (11), 10 mM LiCl (12),
 15 16% PEG200 (3), 16% PEG400 (4), 16% PEG 3350 (5), PEG4000 (6), 40 mM spermina (7), 40 mM spermidyna (8), 5% MPD, 20 mM kakodylanie sodu, pH 5.5, 10 mM LiCl, 20 mM $MgCl_2$, 10 mM heksaamina kobaltu (14), 5% MPD, 20 mM kakodylan sodu, pH 5.5, 20 mM LiCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM heksaamina kobaltu (15), 5% MPD, 20 mM kakodylanie sodu, pH 5.5, 30 mM LiCl, 10 mM heksaamina kobaltu (16). Mieszaninę reakcyjną
 20 inkubowano w 85°C przez 3 min, następnie powoli schładzano (~0.5°C na 1 min) do 37°C i inkubowano przez 15 godzin. Reakcje bez jonów Mg^{2+} traktowano jako reakcje kontrolne.

Produkty reakcji analizowano w 20% żelu poliakrylamidowym z 7M mocznikiem.

Wykazano, że hydroliza nie zachodzi w obecności jonów jednowartościowych (Na^+ , NH_4^+ , Li^+), co więcej jest hamowana przez politlenki etylenu, polimery z grupy polieterów, o niskiej masie cząsteczkowej (200 oraz 400). Nie zaobserwowano hamowania hydrolizy w obecności innych czynników imitujących stłoczenie wewnątrzkomórkowe: 16% PEG3350 oraz 5% MPD (**Fig. 2F**).

W celu oceny czy na wydajność hydrolizy wpływają zmiany warunków denaturacji/renaturacji lub moment zainicjowania reakcji przez dodanie Mg^{2+} Wydajność hydrolizy nie zależy od warunków denaturacji/renaturacji próby oraz momentu zainicjowania reakcji przez dodanie Mg^{2+} prowadzono reakcje w stałym stężeniu rybozimu miR21rz1 (250 nM), pre-miR21 (10nM) w obecności 30 000 cpm [^{32}P]pre-miR21, stałym stężeniu Mg^{2+} (10 mM), 50 mM TrisHCl, pH 7.5, w 37°C przez 15 godzin. 1 – pre-miR21 i rybozym denaturowano (85°C, 3 min) oddzielnie, połączono po schłodzeniu do 37°C,

PK/1904/AGR

następnie suplementowano $MgCl_2$; 2 - pre-miR21 i rybozym denaturowano ($85^\circ C$, 3 min) łącznie, schłodzono do $37^\circ C$, następnie suplementowano $MgCl_2$; 3 - pre-miR21 i rybozym denaturowano ($85^\circ C$, 3 min) oddzielnie w obecności Mg^{2+} , po schłodzeniu do $37^\circ C$ próby połączono i inkubowano dalej w $37^\circ C$; 4 - pre-miR21 oraz rybozym denaturowano ($85^\circ C$, 3 min) łącznie w obecności $MgCl_2$, następnie schłodzono do $37^\circ C$; 5 i 6 – próby niedenaturowane, suplementowane (5) bądź niesuplementowane (6) $MgCl_2$; 7 - pre-miR21 oraz rybozym denaturowane ($85^\circ C$, 3 min) łącznie, niesuplementowane $MgCl_2$; 8 - pre-miR21 (bez dodatku rybozym) denaturowany ($85^\circ C$, 3 min), po schłodzeniu do $37^\circ C$ suplementowany $MgCl_2$. Produkty reakcji analizowano w 20% żelu poliakrylamidowym z 7M mocznikiem.

Wykazano, że we wszystkich przetestowanych warunkach hydroliza zachodzi na zbliżonym poziomie (**Fig. 2E**).

Rybozym miR21rz1 zaprojektowano tak aby oprócz prekursorów miR21 rozpoznawał i hydrolizował dojrzały miR21. W celu analizy hydrolizy miR21 prowadzono reakcje w stałym stężeniu miR21 w obecności [^{32}P]miR21 RNA, w różnych stężeniach rybozomu, lub $MgCl_2$, w 50 mM TrisHCl, pH 7.5, w objętości 10 μ l. Próby inkubowano w $85^\circ C$ przez 3 min, następnie powoli schładzano ($\sim 0.5^\circ C/min$), po osiągnięciu $37^\circ C$ suplementowano Mg^{2+} . Produkty reakcji analizowano w 20% żelu poliakrylamidowym z 7M mocznikiem (**Fig. 3A i B**).

W warunkach *in vitro* miR21rz1 wykazuje znacznie wyższą aktywność w stosunku do miR21 niż do jego prekursora (pre-miR21). W 10-krotnym nadmiarze rybozomu w stosunku do substratu oraz 10 mM Mg^{2+} już po 30 min. prawie 60 % miR21 ulega hydrolizie, tymczasem w przypadku pre-miR21 taki poziom hydrolizy nie jest osiągalny nawet po 15 godzinnej inkubacji z miR21rz1. Wydłużenie czasu inkubacji daje ~ 80 % i ponad 90% zhydrolizowanego substratu odpowiednio po 1 i 2 godzinach. Ponadto hydroliza miR21 z użyciem miR21rz1 zachodzi w niższych stężeniach Mg^{2+} niż ma to miejsce w przypadku pre-miR21. W 10-krotnym nadmiarze rybozomu do substratu, po 1 godzinie w 5 mM Mg^{2+} 70% miR21 ulega hydrolizie, w 10 mM Mg^{2+} - ponad 90 %. Co więcej już 1.5-krotnym nadmiarze miR21rz1 w stosunku do miR21, w 10 mM Mg^{2+} , po 1 godzinie wydajność hydrolizy sięga 80%, w 3-krotnym nadmiarze prawie 90%. Dalsze zwiększanie nadmiaru rybozomu jedynie nieznacznie zwiększa wydajność hydrolizy substratu.

W stanie techniki nie opisano aktywności rybozymów względem dojrzałego miRNA. Postulowano jedynie, na podstawie komplementarności ramion rybozymów do miR21, że

mogą one wykazywać taką aktywność (Suryawanshi H et al., Mol BioSyst 6, 1807-1809 (2010).

W celu oceny wpływu zmiennych warunków denaturacji/renaturacji lub inicjacji (**Fig. 3C**), prowadzono reakcje w stałym stężeniu rybozemu miR21rz1 (100 nM), miR21 (10nM) w
5 obecności 30 000 cpm [³²P]miR21, stałym stężeniu Mg²⁺ (10 mM), 50 mM TrisHCl, pH 7.5, w 37°C przez 5 godzin. 1 – miR21 i rybozemu denaturowano (85°C, 3 min) oddzielnie, połączono po schłodzeniu do 37°C, następnie suplementowano MgCl₂; 2 - pre-miR21 i rybozemu denaturowano (85°C, 3 min) łącznie, schłodzono do 37°C, następnie suplementowano MgCl₂; 3 - miR21 i rybozemu denaturowano (85°C, 3 min) oddzielnie w
10 obecności Mg²⁺, po schłodzeniu do 37°C próby połączono i inkubowano dalej w 37°C; 4 - miR21 oraz rybozemu denaturowano (85°C, 3 min) łącznie w obecności MgCl₂, następnie schłodzono do 37°C; 5 i 6 – próby niedenaturowane, suplementowane (5) bądź niesuplementowane (6) MgCl₂; 7 - pre-miR21 oraz rybozemu denaturowane (85°C, 3 min) łącznie, niesuplementowane MgCl₂; 8 - miR21 (bez dodatku rybozemu) denaturowany
15 (85°C, 3 min), po schłodzeniu do 37°C suplementowano MgCl₂.

Produkty reakcji analizowano w 20% żelu poliakrylamidowym z 7M mocznikiem.

Hydroliza miR21 z użyciem miR21rz1, podobnie jak w przypadku pre-miR21, nie zależy od warunków denaturacji/renaturacji mieszaniny reakcyjnej oraz momentu jej suplementacji z użyciem Mg²⁺ (**Fig. 3C**).

20

PRZYKŁAD 3

Aktywność rybozymów anty-miR21 w warunkach in vivo w linii komórkowej HeLa oraz linii T98G wyprowadzonej z glioblastomy w systemie reporterowym opartym na białku EGFP

Do określenia wydajności hydrolizy pre-miR21 z użyciem zaprojektowanych
25 rybozymów, w liniach komórkowych, wykorzystano system reporterowy oparty na białku zielonej fluorescencji (GFP). Do wektora pEGFP-N3 (BD Biosciences Clontech), pod promotorem cytomegalowirusa (CMV), w ramce odczytu dla białka EGFP wklonowano sekwencję kodującą pre-miR21. Linie komórkowe transfekowano równocześnie plazmidem pEGFP-N3 zawierającym sekwencję kodującą pre-miR21 oraz poszczególnymi
30 rybozymami, w obecności Lipofektaminy 2000 (Invitrogen) zgodnie z instrukcją producenta. Stopień hydrolizy transkryptu zawierającego sekwencję pre-miR21 oraz mRNA białka EGFP oceniano po 24 godzinach od momentu transfekcji na podstawie pomiaru fluorescencji oraz poziomu białka EGFP. Hydroliza mRNA w obrębie sekwencji pre-miR21

PK/1904/AGR

uniemożliwia syntezę białka EGFP. W efekcie obserwujemy obniżony poziom tego białka oraz spadek fluorescencji w komórkach traktowanych rybozymbem w stosunku do kontroli bez rybozymbu.

Hodowlę linii komórkowej HeLa lub T98G prowadzono na szalkach 24 dołkowych, w 5
pożywce odpowiednio RPMI-1640 (Sigma) lub EMEM (ATCC) suplementowanej 10%
FBS (Gibco), 1% witaminami i 1% antybiotykami (Sigma), w 37°C, w 5% CO₂. Po
osiągnięciu 70% konfluencji linię transfekowano plazmidem pEGFP-N3 zawierającym
sekwencję pre-miR21 (0.8 µg/dolek) oraz katalitycznymi kwasami nukleinowymi, w
ilościach dających ich 31.25, 62.5, 125, 250 nM stężenia w pożywce. Kwasy nukleinowe
10 wprowadzane były do komórek z wykorzystaniem odczynnika Lipofectamine 2000
(Invitrogen), zgodnie z protokołem producenta. Przed transfekcją komórki przemywano
buforem PBS oraz dostarczono świeżej niesuplementowanej pożywki. Wydajność hydrolizy
transkryptów zawierających sekwencję pre-miR21 oraz mRNA białka EGFP z użyciem
katalitycznych kwasów nukleinowych oceniono 24 godziny od transfekcji na podstawie
15 obserwacji linii komórkowej z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Leica (**Fig. 4A**),
pomiaru fluorescencji białka EGFP z użyciem Multi-mode Microplate Reader BioTek
Synergy2 (**Fig. 4B**) oraz poziomu białka EGFP na podstawie analizy Western blot (**Fig.**
4C). Przy analizie Western blot 30 µg białka rozdzielano na 18% SDS-PAGE w obecności
markera wielkości, a następnie przenoszono na membranę PVDF (1h, 350 mM, 100V). Po
20 zablokowaniu niespecyficznego miejsca wiązania przeciwciał 10% roztworem
odtłuszczonego mleka i przepłukaniu membrany buforem PBS oraz PBS z 0.1% Tween 20
inkubowano ją przez 2 godziny najpierw w obecności przeciwciała I-rzędowego dla GFP
lub GAPDH, rozcieńczonych w buforze PBS z 0.1% Tween 20 oraz 3% BSA w stosunku
1:500, a następnie w obecności przeciwciała II-rzędowego skoniugowanego z biotyną, w
25 stosunku 1:1000. Kolejne etapy obejmowały inkubację ze streptawidyną skoniugowaną z
alkaliczną fosfatazą (10µl streptawidyny/ 5 ml buforu PBS, 15 min.) oraz immunodetekcję
z użyciem roztworu Sigma Fast BCIP/NBT (Sigma). Każdy etap poprzedzało 3-krotne
przepłukanie membrany, kolejno w buforze PBS, PBS + 0.1% Tween 20 oraz PBS.

Komórki transfekowane jedynie plazmidem, a także traktowane równocześnie plazmidem i
30 rybozymbem nie wykazującym komplementarności do pre-miR21 traktowano jako kontrole.

Wszystkie zastosowane rybozymby (miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3) wykazują zbliżoną
aktywność w liniach komórkowych (**Tab. 3, Fig. 4 i 5**), przy czym w linii T98G jest ona
nieznacznie wyższa, w porównaniu z linią HeLa.

Tab. 3. Wartości IC₅₀ dla rybozymów miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3 w liniach T98G oraz HeLa.

Wartości otrzymano na podstawie pomiaru fluorescencji komórek po 24 h od transfekcji plazmidem pEGFP-N3 zawierającym sekwencję kodującą pre-miR21. Kalkulację IC₅₀ oraz obliczenia statystyczne wykonano w programie GraphPrism.

	miR21rz1	miR21rz2	miR21rz3
IC ₅₀ (T98G)	115.5 nM	91.2 nM	99,2 nM
IC ₅₀ (HeLa)	60.2 nM	53.0 nM	69.2 nM

W celu sprawdzenia czy różnice te nie wynikają z różnic w podatności tych linii na transfekcję, hodowlę linii komórkowej HeLa oraz T98G prowadzono na szalkach 24 dołkowych, odpowiednio w pożywce RPMI-1640 (Sigma) suplementowanej 10% FBS (Gibco), 1% witaminami i 1% antybiotykami (Sigma) oraz pożywce EMEM (ATCC) suplementowanej 10% FBS (Gibco), 1% witaminami i 1% antybiotykami (ATCC), w 37°C, w 5% CO₂. Po osiągnięciu 70% konfluencji komórki transfekowano z użyciem 300 nM (w 200 µl pożywki) znakowanego fluorescencyjnie dsRNA (Validated Stealth RNAi Duplex2, Invitrogen). Kwasy nukleinowe wprowadzane były do komórek z wykorzystaniem odczynnika Lipofectamine 2000 (Invitrogen), zgodnie z protokołem producenta. Przed transfekcją komórki przemywano buforem PBS oraz dostarczono świeżej niesuplementowanej pożywki. Wydajność transfekcji oceniono po 24 godzinach na podstawie obserwacji linii komórkowej z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Leica (A) oraz pomiaru fluorescencji z użyciem Multi-mode Microplate Reader BioTek Synergy2 (B). Oceniono wydajność transfekcji komórek w obecności oraz bez Lipofektaminy 2000.

Wydajność transfekcji obu linii z użyciem znakowanego fluorescencyjnie dsRNA jest zbliżona (~45%), z niewielką (2%) przewagą na korzyść T98G (Fig. 6). W obu liniach najwyższą aktywność wykazuje miR21rz2, IC₅₀ = 91.2 nM oraz 53 nM, odpowiednio dla linii T98G i HeLa. W zastosowanych warunkach maksymalny stopień wyciszenia ekspresji EGFP jest zbliżony dla wszystkich rybozymów, wynosi 76% oraz 69%, odpowiednio w linii HeLa i T98G. Postuluje się, że różnice w aktywności rybozymów w różnych liniach mogą wynikać z różnego poziomu endogennej puli miR21 oraz pre-miR21 w tych liniach. Linie T98G cechuje znacznie wyższy poziom endogennego pre-miR21 oraz miR21 niż linię HeLa. Niewątpliwie część z dostarczonych do komórek rybozymów zaangażowana jest w

PK/1904/AGR

hydrolizę endogennych pre-miR21 oraz miR21. Przy wysokim endogennym poziomie miR21 oraz pre-miR21 spadek fluorescencji oraz poziomu białka EGFP nie odzwierciedla w pełni stopnia hydrolizy pre-miR21 w komórkach, a jedynie stopień hydrolizy transkryptów zawierających sekwencję pre-miR21 skoniugowaną z mRNA białka EGFP.

5

PRZYKŁAD 4

Aktywność rybozymów anty-miR21 w warunkach in vivo w linii komórkowej HeLa oraz linii T98G wyprowadzonej z glioblastomy – wpływ rybozymów na endogenną pulę miR21 oraz prekursorów miR21

- 10 Określono wpływ rybozymów na poziom endogennej puli miR21 oraz prekursorów miR21 w komórkach T98G. Pomiar ilościowy miR21, prekursorów miR21 oraz R18S RNA jako referencji wykonano z użyciem techniki Real-time PCR. Komórki linii T98G traktowano rybozymami anty-miR21 (250nM), rybozymem kontrolnym (250nM) lub jedynie Lipofektaminą 2000 (kontrola).
- 15 Hodowlę linii komórkowej T98G prowadzono na szalkach 24 dołkowych w pożywce EMEM (ATCC) suplementowanej 10% FBS (Gibco), 1% witaminami i 1% antybiotykami (ATCC), w 37°C, w 5% CO₂. Po osiągnięciu 70% konfluencji komórki transfekowano z użyciem 250 nM (w 200 µl pożywki) rybozymów. Kwasy nukleinowe wprowadzane były do komórek z wykorzystaniem odczynnika Lipofectamine 2000 (Invitrogen), zgodnie z
- 20 protokołem producenta. Przed transfekcją komórki przemywano buforem PBS oraz dostarczono świeżej niesuplementowanej pożywki EMEM.
- Po 24 godzinach od transfekcji izolowano RNA z użyciem TRI Reagent® (Molecular Research Center). Próby traktowano DNA-free™ Kit (Applied Biosystems) w celu usunięcia DNA oraz jonów dwuwartościowych. Stężenie oraz czystość otrzymanego RNA
- 25 oceniono przy pomocy NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), jakość w 10% żelu poliakrylamidowym z 7M mocznikiem. Przeprowadzono poliadenylacji miRNA oraz odwrotną transkrypcję z wykorzystaniem miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Stratagene). Otrzymany materiał użyto w reakcji Real-Time PCR. Reakcje przeprowadzono w obecności oligonukleotydu komplementarnego do ogona poliadenylowego (Universal
- 30 Reverse Primer) oraz startera unikalnego dla miR21 (miRNA-21 Forward Primer, Agilent Technologies) oraz DyNAmo* HS SYBR* Green qPCR Kit (ThermoScientific), zgodnie z protokołem: denaturacja (95°C, 10 min.), następnie 40 cykli (95°C, 30 sek.; 55°C, 30 sek.; 72°C, 30 sek.) oraz cykl kończący (95°C, 60 sek.; 55°C, 30 sek., 95°C, 30 sek.). Na

podstawie otrzymanych wyników określono relatywny poziom pre-miR21 oraz miR21 w komórkach traktowanych rybozymami miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3 oraz rybozymem kontrolnym TARz, w odniesieniu do poziomu tych RNA w komórkach traktowanych jedynie Lipofektaminą 2000. Próby znormalizowano względem poziomu 18S rRNA.

- 5 Wyniki dowodzą, że rybozimy anti-miR21, w przeciwieństwie do rybozymu kontrolnego, efektywnie obniżają endogenną pulę miR21 oraz prekursorów miR21 w komórkach. Poziom wyciszenia prekursorów miR21 z użyciem wszystkich zastosowanych rybozymów anti-miR21 względem kontroli jest porównywalny i wynosi 56%, 56.5% oraz 59.5% odpowiednio dla miR21rz1, miR21rz2 oraz miR21rz3. Najwyższy poziom wyciszenia
- 10 miR21 względem kontroli osiągnięto po zastosowaniu miR21rz1, wynosi on 65.3%. Dla miR21rz2 i miR21rz3 jest on znacząco niższy i przyjmuje wartość odpowiednio 21.2% i 31.1%. Postuluje się, że obserwowany poziom wyciszenia miR21, po zastosowaniu miR21rz1 jest sumarycznym efektem hydrolizy miR21 oraz prekursorów miR21. Wskazuje to na przewagę narzędzi anti-miRNA, które jednocześnie hydrolizują dojrzały miRNA oraz
- 15 jego prekursory (**Fig. 7**).

Rybozimy będące stanem techniki, opisane w Suryawanshi H et al., Mol BioSyst 6, 1807-1809 (2010) w testach komórkowych, w stężeniu 1 μ M powodują spadek poziomu miRNA na poziomie 40% oraz 60% po użyciu odpowiednio rybozymu dzikiego oraz rybozymu zmodyfikowanego.

20

PRZYKŁAD 5

Stabilność rybozymów 'hammerhead' skierowanych na miR21 oraz prekursory miR21 w surowicy ludzkiej oraz hodowli komórkowej T98G.

- Zaprojektowanie narzędzia katalityczne skierowane na miR21 oraz prekursory
- 25 miR21 z założenia mają mieć zastosowanie w terapii GBM. Zasadne było zatem określenie ich trwałości w środowisku oddającym warunki panujące w organizmie. W warunkach *in vitro* wykorzystano do tego celu surowicę ludzką, ekstrakt z guza oraz płyn mózgowo-rdzeniowy, w warunkach *in vivo* linię komórkową wyprowadzoną z glioblastomy, T98G (**Fig. 8A i B**).

- 30 W celu analizy trwałości w surowicy krwi 100nM miR21rz3 w obecności 30000 cpm [³²P]miR21rz3 inkubowano w surowicy krwi przez 1 lub 10 min., w 37°C. Reakcję prowadzono w 10 μ l opcjonalnie: bez dodatku Lipofektaminy 2000 bądź z dodatkiem 1 μ l Lipofektaminy 2000 (Invitrogen) (przed dodaniem surowicy kwasy nukleinowe zmieszano z

PK/1904/AGR

Lipofektaminą 2000). Reakcje zatrzymywano przez dodanie mieszaniny zawierającej 7M mocznik, 20 mM EDTA oraz barwniki (0.1% błękit bromofenolowy oraz 0.1% cyjanol ksylonowy). Próby analizowano w 20% żelu poliakrylamidowym z dodatkiem 7M mocznika.

- 5 W celu oceny trwałości w hodowli komórkowej glioblastomy hodowlę linii komórkowej T98G prowadzono na szalkach 24 dołkowych, w pożywce EMEM (ATCC) suplementowanej 10% FBS (Gibco), 1% witaminami i 1% antybiotykami (ATCC), w 37°C, w 5% CO₂. Po osiągnięciu 70% konfluencji komórki transfekowano z użyciem 250 nM miR21rz3 w obecności 60000 cpm [³²P]miR21rz3 (w 200 µl pożywki). Kwasy nukleinowe
- 10 wprowadzane były do komórek z wykorzystaniem odczynnika Lipofectamine 2000 (Invitrogen), zgodnie z protokołem producenta. Przed transfekcją komórki przemywano buforem PBS oraz dostarczono świeżej niesuplementowanej pożywki. Po 1, 5 lub 16 godzinach od transfekcji komórki przemyto buforem PBS, a następnie izolowano z nich RNA z użyciem TRI Reagent® (Molecular Research Center). Do prób dodano mieszaninę
- 15 zawierającą 7M mocznik, 20 mM EDTA oraz barwniki (0.1% błękit bromofenolowy oraz 0.1% cyjanol ksylonowy), a następnie analizowano w 20% żelu poliakrylamidowym z dodatkiem 7M mocznika.

Rybozym miR21rz3 jest nietrwały w surowicy krwi. Po 1 min. inkubacji w surowicy ulega niemal 100% hydrolizie. Dodatek Lipofektaminy 2000 znacząco zwiększa trwałość

20 miR21rz3. W obecności tego nośnika nie obserwujemy degradacji rybozymu w surowicy nawet po 10 min. inkubacji. W warunkach komórkowych (linia T98G) nie zaobserwowano znaczącego ubytku rybozymu. Niewątpliwie, również w tym przypadku trwałość zastosowanych kwasów nukleinowych w znacznej mierze zależy od obecności Lipofektaminy 2000 (Fig. 8).

25 **Opis wykazu sekwencji**

SEKW ID NR 1 – sekwencja rdzenia katalitycznego rybozymów według wynalazku

5'- CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA-3'

SEKW ID NR 2 - Rybozym miR21rz1

30 5'-CAGUCUCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAUAAGC-3'

SEKW ID NR 3 - Rybozym miR21rz2

5'-CCAUGACUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAAUUCA-3'

35 **SEKW ID NR 4** - Rybozym miR21rz3

5'-CCCAUCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACUGGU-3'

PK/1904/AGR

WYKAZ SEKWENCJI

<110> Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

- 5 <120> Rybozomy typu 'hammerhead'
<130> PK/1904/AGR
- 10 <160> 4
<170> PatentIn version 3.5
- 15 <210> 1
<211> 22
<212> RNA
<213> artificial
- 20 <220>
<223> CORE of miR21hammerhead
<400> 1
cugaugagggc cgaaaggccg aa 22
- 25 <210> 2
<211> 34
<212> RNA
<213> artificial
- 30 <220>
<223> miR21rz1
<400> 2
cagucucuga ugaggccgaa aggccgaaau aagc 34
- 35 <210> 3
<211> 34
<212> RNA
40 <213> artificial
- <220>
<223> miR21rz2
- 45 <400> 3
ccaugacuga ugaggccgaa aggccgaaau ucaa 34
- 50 <210> 4
<211> 34
<212> RNA
<213> artificial
- 55 <220>
<223> miR21rz3
<400> 4
cccauccuga ugaggccgaa aggccgaaac uggu 34
- 60