

siRNA

- fremtidens lægemidler?

Små interfererende RNA-molekyler (siRNA) kan effektivt skrue ned for udtrykkelsen af specifikke gener. siRNA har et stort terapeutisk potentiale til behandling af sygdomme, som kan kureres ved at hæmme et eller flere gener, f.eks. kræft eller aids. Flere store farmaceutiske og formuleringsmæssige udfordringer skal dog løses, inden siRNA kan blive til lægemidler

Af adjunkt Camilla Foged, professor Sven Frøkjær og lektor Hanne Morck Nielsen, Institut for Farmaci og Analytisk Kemi, DFU

Alle celler i planter, dyr og mennesker har et urgammelt indbygget forsvar, som opsporer og destruerer fremmed genetisk materiale. Forsvarssystemet slår til, når det opdager dobbeltstrengt RNA i cytoplasmaet - for dét er lig med problemer. Dobbeltstrengt RNA kan f.eks. være virus, som er ved at inficere cellen.

Fænomenet, som er relativt nyopdaget, kaldes RNA-interferens (RNAi) [1]. I 2001 blev det publiceret, at mekanismen kan aktiveres kunstigt med små, syntetiske, dobbeltstrengede RNA-molekyler (siRNA) [2]. Når siRNA indføres i en celle, sker der en specifik hæmning af udtrykkelsen af et gen med en komplementær sekvens, f.eks. et kræftgen.

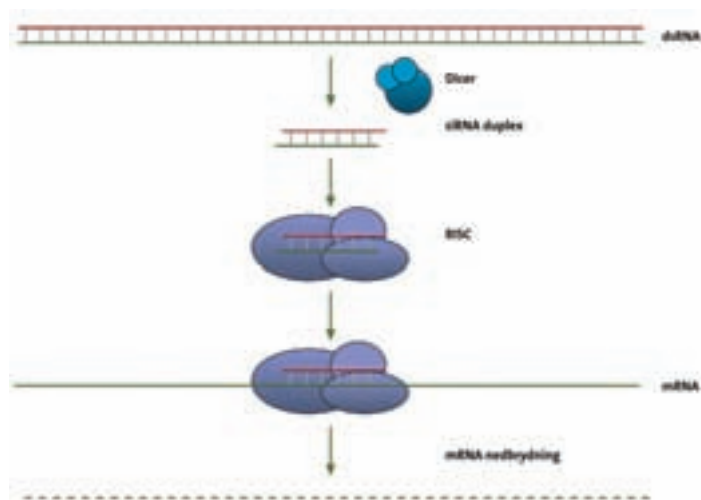
siRNA-medieret hæmning af genudtrykkelse har et stort terapeutisk potentiale. I forsøg med cellegener er utallige gener med succes blevet hæmmet vha. RNAi, og omtrent hver uge dukker nye publikationer op; publikationer der rapporterer om RNAi-medieret hæmning i dyremodeller af sygdomme som kræft [3], hjertekarsygdomme [4], influenza [5,6], aids [7] og SARS [8]. Det vidner om en enorm interesse for metoden, der for øjeblikket er under afprøvning på mennesker.

Molekylær mekanisme bag RNAi

Vi har efterhånden en god forståelse af de molekylære mekanismer bag naturlig RNA-interferens [9]: Når der er dobbeltstrengt RNA i cytoplasmaet, nedbryder et enzym RNA'et til små siRNA-molekyler. siRNA-molekylerne indbygges derpå i et proteinkompleks, der katalyserer en opsnoning til enkeltstrengt siRNA, som efterfølgende guider komplekset hen til messenger RNA (mRNA) med en komplementær sekvens. mRNA er en enkeltstrengt kopi af et gen og indeholder opskriften på det protein, som genet koder for. Under normale omstændigheder aflæses mRNA i cellernes ribosomer, som så producerer proteinet. Det forhindres imidlertid, når mRNA ind-

fanges af proteinkomplekset, som nedbryder budbringeren. På den måde hæmmes udtrykkelsen af det pågældende gen, som f.eks. kan være et gen fra et virus som HIV, der udnytter cellens maskineri til at danne sine egne proteiner.

En tilsvarende proces finder sted, når syntetiske siRNA-molekyler indføres i en celle, og det kan bruges til at hæmme et hvilket som helst gen, der har en komplementær sekvens. siRNA har flere fordele sammenlignet med den beslægtede metode antisense medicin, som typisk består af korte, enkeltstrengede DNA-sekvenser, der neutraliserer mRNA fra udvalg-



Figur 1. Den molekylære mekanisme bag RNA-interferens (RNAi): Dobbeltstrengt RNA fordøjes i cytoplasmaet til siRNA-molekyler af enzymet Dicer og indbygges i proteinkomplekset RNA-induced silencing complex (RISC). RISC katalyserer opsnoningen af siRNA-dupleksen til enkeltstrengt siRNA, som efterfølgende guider RISC til homologe messenger RNA (mRNA)-molekyler, der kløves og nedbrydes. Kemisk syntetiseret siRNA kan også inkorporeres i RISC og mediere RNA-interferens.

© DFU/Jens Raadal.

te sygdomsgener. De største fordele er, at siRNA er effektiv i lave koncentrationer, at siRNA er mere stabilt, samt at siRNA har en høj specificitet. Ændring af blot en base i siRNAet kan reducere aktiviteten dramatisk. Netop den høje specificitet gør siRNA attraktivt som lægemiddelstof, fordi stoffet forventes at medføre langt færre bivirkninger end konventionel medicinsk behandling.

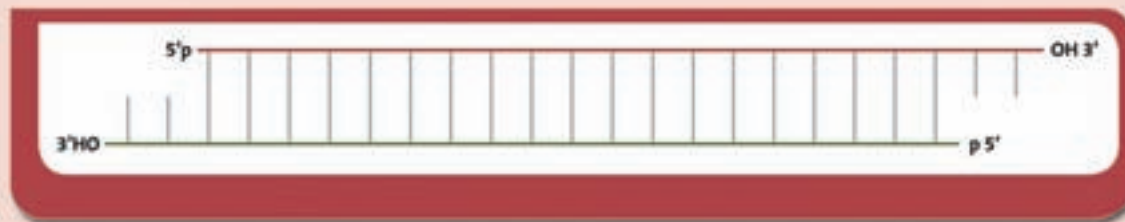
siRNA har dog også sine begrænsninger; først og fremmest

Hvad er RNA?

RNA er en forkortelse for ribonukleinsyre. RNA er en polymerkæde, der lige som DNA er opbygget af monomerer, der kaldes nukleotider. Nukleotiderne i RNA består af sukkerstoffet ribose, en fosfatgruppe, der forbinder nukleotiderne indbyrdes, samt en base. I RNA findes baserne adenin (A), guanin (G), cytosin (C) og uracil (U). Baserne kan parre indbyrdes – G med C og A med U – og danne en dobbeltstrengt struktur. RNA er involveret i aflæsning af information lagret i DNA og medvirker på flere fronter i proteinsyntesen.

Hvad er siRNA?

siRNA er en forkortelse for små, interfererende RNA-molekyler, der er dobbeltstrengede RNA-duplekser. siRNA-molekyler er mest potente, hvis de er 21-23 nukleotider lange, har 2-3 nukleotid 3'overhæng, 5'fosfat og 3'hydroxylgrupper.



Figur 2.
© DFU/Jens Raadal.

er effekten relativt kortvarig. Derfor er det nødvendigt at udvikle metoder til at forlænge virkningen, hvis siRNA skal formuleres til lægemidler.

Vejen ind i cellen

RNA-interferens finder kun sted i cytoplasmaet. For at bruge siRNA til sygdomsbehandling er det derfor nødvendigt, at siRNA transporteres ind gennem målcellernes membraner i tilstrækkeligt høje koncentrationer.

siRNA kan introduceres ind i pattedyrsceller på to måder [10]. Kemisk syntetiseret siRNA kan sendes direkte ind i cellen, eller man kan indføre DNA, som danner siRNA inde i cellen. Til det formål kan man bruge små DNA-ringe, som kaldes plasmider, eller virus. Fra et farmaceutisk synspunkt er kemisk syntetiseret siRNA at foretrække, fordi dosis nøje kan kontrolleres, og fordi man undgår en række bivirkninger og risici, der er forbundet med anvendelse af virus.

Desværre er det svært at få syntetisk siRNA ind gennem cellemembranen. RNA er vandopløselige og negativt ladede makromolekyler, der vanskeligt passerer en fedtholdig cellemembran med en negativt ladet overflade. Når det gælder cellekulturer, findes der dog en del kemiske og fysiske teknikker, som kan løse opgaven. De fysiske metoder anvender tryk, strøm eller ultralyd til at tvinge molekylerne ind i cellen. De kemiske metoder er baseret på positivt ladede molekyler som lipider eller polymerer, der kan kompleksbinde de negativt ladede siRNA-molekyler i partikler. Partikler med en positiv nettoladning kan binde til cellemembranen. Derpå kan partiklerne optages via små indsnøringer af cellemembranen ved en proces, der kaldes endocytose.

siRNA-partikler skal frigives fra indsnøringerne til cytoplasmaet for at have en terapeutisk effekt, og det er tilsyneladende en flaskehals for denne nye form for lægemiddelstof. Især gælder det om at undgå sammensmeltning med specifikke organeller i cellen; disse kaldes lysosomer, og nedbryder siRNA. Problemet kan sandsynligvis løses ved at koble siRNA sammen med bestemte peptider eller polymerer, som i forsøg har vist en positiv effekt på frigivelsen af siRNA til cytoplasmaet.

siRNA i forsøgsdyr

Der er efterhånden talrige eksempler på effektiv hæmning af udvalgte gener med siRNA i cellekulturer. Men de anvendte fysiske og kemiske metoder til at få siRNA ind i cellerne er dog oftest uegnede til brug i større organismer. Når det gælder dyreforsøg, har man i de første studier brugt virussystemer og hydrodynamisk injektion, hvor siRNA indgives i en vene sammen med en større mængde væske.

Vha. disse teknikker er det lykkedes at inducere RNAi i mus, hvilket giver store forhåbninger til anvendelsen af siRNA i mennesker. Men virale transportsystemer og hydrodynamisk injektion kan ikke accepteres til applikation i mennesker. Inden for det seneste år er der rapporteret om succesfuld induktion af RNAi i dyr vha. en række siRNA-transportssystemer. Som eksempler kan nævnes stabiliserede polymer-nanopartikler rettet mod tumorer [3], kolesterol-siRNA-konjugater [4] og anvendelse af lungesurfaktant til transport af siRNA til lungevæv [11]. Hvis siRNAs store potentiale som lægemiddelstof skal udnyttes, er det derfor vigtigt at fortsætte udviklingen af klinisk acceptable delivery-systemer, som effektivt, og enten via blodet eller lokal applikation, kan bringe siRNA hen til målcellerne og ind gennem cellemembranerne.

Forskning i siRNA-transportssystemer på DFU

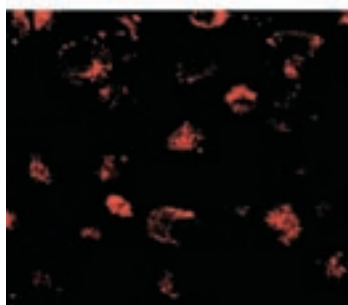
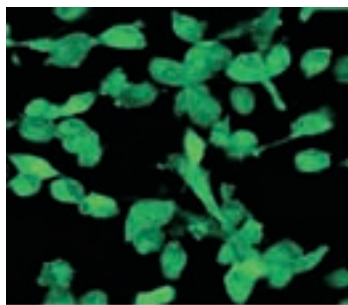
I biomakromolekylegruppen på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi arbejder vi på at fremstille og karakterisere transportsystemer til siRNA baseret på lipider og polymerer, der kan målrette siRNA til specifikke væv og celler og sikre opnåelsen af terapeutiske koncentrationer af siRNA i cytoplasmaet i målcellen.

Forskningen koncentrerer sig bl.a. om transportsystemer, der skal testes i dyr til behandling af leddegigt (rheumatoid arthritis). Leddegigt er en sygdom, der rammer omkring 1% af verdens befolkning. Sygdommen er karakteriseret ved inflammation (en betændelsestilstand, der ikke er opstået som følge af infektion) i led, der kan føre til ødelæggelse af brusk og knogler. De molekylære mekanismer bag udviklingen af leddegigt er ikke klar-

Outsource dine leverandørbrugsanvisninger!

Se hvordan på www.trotters.dk

trotters
- sikkerhed for mennesker og miljø!



Figur 3. Et optisk snit af HeLa-celler optaget ved konfokalmikroskopi. HeLa-cellerne er stabilt transfekteret med proteinet Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), der er et grønt fluorescerende protein (vist ved den grønne farve). Cellerne øverst er ubehandlede. Cellerne nederst er behandlet med komplekser af kationiske liposomer og siRNA, der er mærket med en rød farve. Det ses, at behandling med siRNA fører til optagelse af siRNA i cellerne og hæmning af udtrykkelsen af EGFP (den grønne farve er knap synlig på billedet til højre).

bilitet, så nanopartikler kan passere endotelet og trænge ind i det betændte væv, hvor der sker en ophobning af liposomer og dermed også af det indkapslede siRNA. Det er netop her de uønskede cytokin-producerende celler findes.

Det er dog ikke tilstrækkeligt, at siRNAet transporteres til det betændte væv. siRNAet skal også frigives fra liposomerne og finde vej til cytoplasmaet i de cytokin-producerende celler.

Tidligere forskning på instituttet har koncentreret sig om en særlig type af Stealth-liposomer, der nedbrydes af et enzym, phospholipase A2 [13]. Phospholipase A2 er et membrannedbrydende enzym, der findes i forøgede mængder i vævsområder med betændelse. Enzymet nedbryder lipider i liposomerne til bl.a. lysolipider, der kan virke destabiliserende på nærliggende membraner.

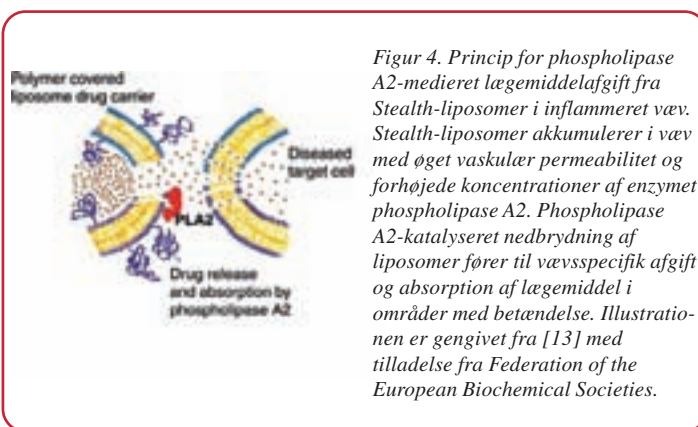
Vores hypotese er, at vi ved anvendelse af denne type liposomer får en ophobning i det betændte væv af siRNA indkapslet i liposomer pga. den forøgede karpermeabilitet. Liposomerne nedbrydes derefter i vævet af phospholipase A2 under dannelse af membrandestabiliserende lipider, der kan forøge optagelsen af siRNA over cellemembranen til cytoplasmaet, hvor RNAi foregår. Målet er, ved at indkapsle siRNA i Stealth-liposomer, at forlænge effekten af siRNA og at reducere siRNA-dosis, og dermed også muligheden for bivirkninger. Det sker via en passiv transport til betændt væv, hvor der foregår en specifik enzymatisk proces, der frigiver siRNA og kan forøge optaget i cellerne.

Transportsystemerne afprøves både i cellegener og i musemodeller, hvor vi undersøger siRNA-effekten. Desuden undersøger vi frit siRNA og siRNA-transporters stabilitet i biologisk relevante medier samt i mus. Undersøgelserne vil forhåbentlig kunne vise, om siRNA i fremtiden kan blive et nyt lægemiddelpincip.

lagt, men det vides, at proinflammatoriske cytokiner spiller en vigtig rolle for sygdommens forløb. Forsøg med andre typer af lægemidler har vist, at neutralisering af disse proinflammatoriske cytokiner er helt central, hvis leddegigt skal kontrolleres. Her kan siRNA blive et meget vigtigt redskab: Forsøg i cellegener viser, at produktionen af cytokiner i makrofager, som er de celler, der bl.a. laver proinflammatoriske cytokiner i led, kan normaliseres vha. siRNA.

Dette giver forhåbninger om, at leddegigt også kan kontrolleres i forsøgsdyr via RNAi. Til dette formål arbejder vi med en bestemt type af nanotransportører, liposomer, der administreres til blodbanen [12]. Liposomer er små, kugleformede lipidmembraner, hvori siRNA kan indkapsles. Liposomerne er stabiliserede ved at indbygge polymerlipider i membranen, så de ikke så nemt nedbrydes i blodet (Stealth-liposomer).

Normalt kan liposomer ikke passere endotelceller, der beklæder indersiden af karvæggen, og de cirkulerer derfor i blodet, til de nedbrydes. Ved betændelsestilstande ændres karvæggens permea-



Figur 4. Princip for phospholipase A2-medieret lægemiddelfrigivelse fra Stealth-liposomer i inflammatorisk væv. Stealth-liposomer akkumulerer i væv med øget vaskulær permeabilitet og forhøjede koncentrationer af enzymet phospholipase A2. Phospholipase A2-katalyseret nedbrydning af liposomer fører til vævsspecifik afgift og absorption af lægemiddel i områder med betændelse. Illustrationen er gengivet fra [13] med tilladelse fra Federation of the European Biochemical Societies.

Projektet er en del af en større centerbevilling fra Forskningsrådet for Teknologi og Produktion, der involverer grupper på DFU, Aarhus Universitet og Utrecht Universitet samt firmaerne Pipeline Biotech A/S og Lundbeck A/S. Mere information kan findes på centrets hjemmeside: www.sirna.dk.

Artiklen er baseret på en artikel i *Lægemiddelforskning* 2004, s. 14-15 fra Danmarks Farmaceutiske Universitet

E-mail-adresse
Camilla Foged: cfo@dfuni.dk

Referencer

1. A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811 (1998).
2. S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498 (2001).
3. R. M. Schifflers, A. Ansari, J. Xu, Q. Zhou, Q. Tang, G. Storm, G. Molema, P. Y. Lu, P. V. Scaria, and M. C. Woodle. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res.* 32: e149-(2004).
4. J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Kotliansky, S. Limmer, M. Manoharan, and H. P. Vornlocher. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178 (2004).
5. S. M. Tompkins, C. Y. Lo, T. M. Tumpey, and S. L. Epstein. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101: 8682-8686 (2004).
6. Q. Ge, L. Filip, A. Bai, T. Nguyen, H. N. Eisen, and J. Chen. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8676-8681 (2004).
7. E. Song, P. Zhu, S. K. Lee, D. Chowdhury, S. Kussman, D. M. Dykxhoorn, Y. Feng, D. Palliser, D. B. Weiner, P. Shankar, W. A. Marasco, and J. Lieberman. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat. Biotechnol.* 23: 709-717 (2005).
8. B. J. Li, Q. Tang, D. Cheng, C. Qin, F. Y. Xie, Q. Wei, J. Xu, Y. Liu, B. J. Zheng, M. C. Woodle, N. Zhong, and P. Y. Lu. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat. Med.* (2005).
9. D. M. Dykxhoorn and J. Lieberman. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu. Rev. Med.* 56: 401-423 (2005).
10. M. Schifflers, M. C. Woodle, and P. Scaria. Pharmaceutical prospects for RNA interference. *Pharm. Res.* 21: 1-7 (2004).
11. D. Massaro, G. D. Massaro, and L. B. Clerch. Noninvasive delivery of small inhibiting RNA and other reagents to pulmonary alveoli in mice. *Am. J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 287: L1066-L1070 (2004).
12. D. J. Crommelin, G. Storm, W. Jiskoot, R. Steneker, E. Mastrobattista, and W. E. Hennink. Nanotechnological approaches for the delivery of macromolecules. *J Control Release* 87: 81-88 (2003).
13. K. Jorgensen, J. Davidsen, and O. G. Mouritsen. Biophysical mechanisms of phospholipase A2 activation and their use in liposome-based drug delivery. *FEBS Lett.* 531: 23-27 (2002).