

Uspecifikke effekter af visse RNAi-molekyler brugt til behandling af aldersrelateret maculadegeneration

Postdoc Mette Ebbesen, professor Toke Bek, professor Finn Skou Pedersen & professor Thomas G. Jensen

Aldersrelateret maculadegeneration (AMD) er den hyppigste årsag til svagsynethed og blindhed blandt ældre i den vestlige verden. AMD kan opdeles i en atrofisk (tør) form, som skyldes aldersbetinget degeneration af nethindens væv, og en ekssudativ (våd) form, som oftest skyldes indvækst af blodkar fra det koroidale karsystem. Denne karindvækst medfører destruktion af nethinden, enten på grund af blodkarrenes invasion i det neuronale væv eller på grund af ødemdannelse og blødninger, som er en følge af defekte barriereegenskaber i de prolifererende kar. Indvækst af koroidale blodkar i nethinden er afhængig af flere faktorer, herunder ændringer i pigmentepitelets basalmembran (Bruchs membran), som under normale omstændigheder udgør en barriere for karindvækst, samt tilstedeværelsen af en række vækstfaktorer, herunder *vascular endothelial growth factor* (VEGF).

Der har i de seneste år været et stort fokus på behandling af våd AMD ved at hæmme virkningen af VEGF på de koroidale kar. Kliniske studier [1-3] har vist en positiv effekt af intravitreal injektion af VEGF-hæmmere, og på baggrund af disse studier har Sundhedsstyrelsen godkendt, at behandlingen kan udføres som udviklingsfunktion til behandling af våd AMD ved nogle få centre i Danmark. Det er en ulempe ved behandlingen, at den skal gentages ofte, da det er resursekrævende og giver en kumulering af de risici, der er forbundet med intraokulær injektion. Der arbejdes derfor med at optimere behandlingen, så de VEGF-hæmmende stoffer kan gives med længere mellemrum. F.eks. arbejdes der med metoder, der er baseret på den biologiske mekanisme ribonukleinsyreinterferens (RNAi), der kontrollerer normal genekspression (Figur 1). RNAi blev første gang beskrevet i 1998 [4] og kan benyttes til specifikt at nedlukke gener på posttransskriptionelt niveau. RNAi kan anses for at være en naturlig mekanisme til beskyttelse mod mobile endogene transposable elementer og invasion af eksogene virus, der har dobbeltstrenget RNA (dsRNA) som intermediert produkt [5]. RNAi nedlukker gener posttransskriptionelt ved at kløve lange dsRNA'er ved hjælp af enzymet Dicer. Herved fremkommer 21-23 nukleotider (nt) lange RNA-duplekser, også kaldet små interfererende RNA

(siRNA). SiRNA-molekylerne indkorporeres efterfølgende i proteinet *RNA-induced silencing complex* (RISC). Dette bevirker, at RISC genkender og kløver mRNA'er, der har en komplementær sekvens til siRNA'erne, og de proteiner, der kodes af de kløvede mRNA'er, produceres dermed ikke [6].

KLINISKE FORSØG MED RIBONUKLEINSYREINTERFERENS MOD ALDERSRELATERET MACULADEGENERATION

I kliniske forsøg forsøges blodkardannelsen (angiogenesen) i AMD hæmmet ved at nedlukke signalkaskaden, der fremmer angiogenese. Den prækliniske basis for disse kliniske forsøg er bl.a. eksperimenter i mus fra 2003, som viste, at RNAi mod *vascular endothelial growth factor-A* (VEGFA) og dens receptor (VEGFR1) hæmmer laserinduceret koroidal neovaskularisering (CNV). Man designede siRNA-molekyler specifikt mod mRNA, der koder for VEGFA og VEGFR1 og injicerede disse direkte i det syge øje på mus. Dette reducerede angiogenesen. Man tolkede disse fund som en følge af, at siRNA optages i cellen og specifikt nedlukker udtrykket af VEGFA og VEGFR1, hvorved angiogenese i øjet hæmmes [7, 8]. Kliniske forsøg med RNAi-molekylerne, der fik navnet bevasiranib, til be-

STATUSARTIKEL

Aarhus Universitet, Center for Bioetik og Nanoetik, Interdisciplinært Nanoscience Center, Molekylærbiologisk Institut og Institut for Human Genetik, Århus Universitetshospital, Århus Sygehus, Øjenafdeling

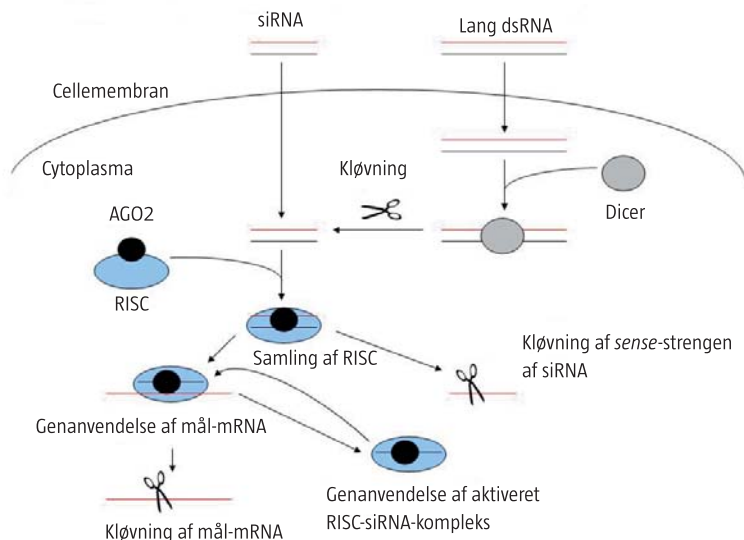


FORKORTELSER

AGO2 = argonaute 2-proteinet
AMD = aldersrelateret maculadegeneration
dsRNA = dobbeltstrenget RNA
I-κB = suppressorprotein
IFNγ = interferon-γ
IL-12 = Interleukin-12
Luc = luciferase
NF-κB = transskriptionsfaktor
nt = nukleotider
RISC = *RNA-induced silencing complex*
RNA = ribonukleinsyre
RNAi = ribonukleinsyreinterferens
siRNA = små interfererende RNA
TLR3 = *toll-like receptor 3*
TRIF = adaptorprotein
VEGF = *vascular endothelial growth factor*
VEGFA = *vascular endothelial growth factor-A*
VEGFR1 = receptor for *vascular endothelial growth factor-A*

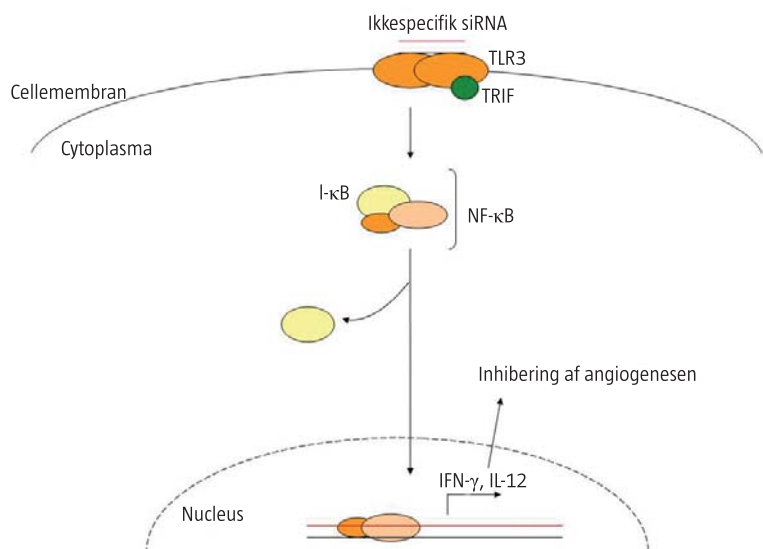
FIGUR 1

Mekanismen bag ribonukleinsyreinterferens. Lange dobbeltstrengede RNA-molekyler (dsRNA) optages af cellen. I cytoplasma kløves dsRNA til små interfererende RNA (siRNA) af enzymet Dicer (siRNA kan også introduceres direkte). SiRNA inkorporeres da i proteinet *RNA-induced silencing complex* (RISC). Dette resulterer i kløvning af *sense*-strengen af proteinet argonaute 2 (AGO2). Aktiveret RISC-siRNA-kompleks binder og nedbryder derefter mRNA, der er komplementær til siRNA. Dette medfører nedlukning af målgenet. Det aktiverede RISC-siRNA-kompleks kan derefter genanvendes (Figuren er inspireret af [11, Figur 1]).



FIGUR 2

Potentiel siRNA-interaktion via receptoren TLR3. *Kleinman et al* [9] viste, at uspecifikke siRNA-molekyler binder direkte til receptoren TLR3. Dette resulterer i dimerisering af TLR3 og dermed aktivering af en intracellulær *pathway*, der involverer adaptorproteinet TRIF. Samtidig nedbrydes komplekset mellem suppressorproteinet I- κ B og *subunits* fra transkriptionsfaktoren NF- κ B. NF- κ B aktiverer derefter gener, der koder for interferon- γ (IFN- γ) og interleukin-12 (IL-12), hvilket hæmmer angiogenesis (Figuren er inspireret af [14, Figur 1]).



handling af AMD startede i 2004, og dette var første gang, at RNAi-terapeutika blev anvendt i mennesker [10, 11].

NYE FUND SÅR TVIVL OM DEN PRÆKLINISKE BASIS FOR KLINISKE FORSØG

Kleinman et al satte sig for at undersøge, om nedlukningen af udtrykket af VEGFA og VEGFR1 og dermed hæmningen af angiogenesis i øjet sker specifikt ved hjælp af RNAi [9]. Gruppen injicerede derfor forskellige ikkespecifikke siRNA-molekyler direkte i øjet (i glaslegemet) på forsøgsmus med CNV, hvilket resulterede i en dosisafhængig hæmning af CNV. Derudover testede *Kleinman et al* siRNA'er med en tilfældig (*random*) sekvens og siRNA-molekyler med kemiske modifikationer, der hindrer inkorporering i *RNA-induced silencing complex* (RISC) [7]. Begge disse typer af siRNA-molekyler hæmmede også CNV.

Dernæst undersøgte *Kleinman et al* mekanismen bag den siRNA-medierede hæmning af angiogenesis i mus. Gruppens tese var, at siRNA-molekyler aktiverer overfladereceptoren *toll-like receptor 3* (TLR3) (der normalt fungerer som dobbeltstrengt viral RNA-sensor), og at denne aktivering af TLR3 medfører hæmning af CNV (Figur 2). Tesen blev understøttet af eksperimenter, der viste, at uspecifikke siRNA'er ikke nedlukker CNV i mus, der ikke udtrykker TLR3 (Tlr3-/-mus) [9]. Derudover viste gruppen, at CNV-reduktion i mus ved hjælp af siRNA mod markørgenet, der koder for luciferase (Luc), kunne hæmmes ved at tilsætte TLR3 i opløsning. Dette gjaldt dog ikke, hvis der tilsattes TLR4 i opløsning eller denatureret TLR3. Dette tyder på, at TLR3 i opløsning konkurrerer med TLR3-sensoren, og dermed at der er en direkte interaktion mellem siRNA og TLR3. *Kleinman et al* viste også, at CNV reduktion ved hjælp af siRNA mod Luc forhindres ved at tilsætte antistof mod TLR3 (dvs. at TLR3 blokeres). Tilsammen tyder disse eksperimenter på, at siRNA aktiverer TLR3, som hæmmer angiogenesis [9].

Kleinman et al undersøgte også, hvilken længde af siRNA, der er optimal for at aktivere TLR3. De fandt, at 21 og 23 nt siRNA-molekyler hæmmer CNV, mens dette ikke er tilfældet for hverken 7, 13, 16 eller 19 nt siRNA. Derudover viste de, at lange siRNA'er på 1.000 nt også hæmmer angiogenesis. Dette viser, at siRNA'er skal være mindst 21 nt lange for at aktivere TLR3 og dermed hæmme angiogenesis.

Ved ovenstående forsøg mener *Kleinman et al* [9] således at have vist, at hæmningen af CNV ikke sker ved hjælp af RNAi, som man troede, men ved aktivering af TLR3. Der har tidligere været eksempler på, at effekter, der i første omgang blev tilskrevet RNAi, viste sig at skyldes en mere uspecifik aktivering af cel-

lernes innate immunforsvar. Dette gælder bl.a. for benyttelse af siRNA mod virusinfektioner, hvor den antivirale effekt i nogle tilfælde har måttet tilskrives en uspecifik aktivering af interferonsystemet [12].

MULIGE KONSEKVENSER

Baseret på de nye fund blev det diskuteret, om man burde fortsætte de kliniske forsøg, der benytter RNAi mod VEGFA og VEGFR1, fordi grundlaget for studierne og for patienternes informerede samtykke var ændret. Det blev fremført, at de nye fund er et tilbageslag for terapeutiske anvendelser af RNAi, og at resultaterne illustrerer vigtigheden af at inkludere egnede kontroller i prækliniske forsøg [13]. Desuden blev der påpeget betydningen af, at siRNA, som anvendes i terapeutisk øjemed, pakkes ind eller skærmes, så de ikke kommer i kontakt med immunreceptorer [13]. Firmaet OPKO Health, Inc., der stod for behandlingen, annoncerede i marts 2009, at et fase III-forsøg med RNAi-molekylerne blev standset.

Det skal præciseres, at uspecifik binding af siRNA til TLR3 kun er påvist for siRNA-molekyler, der består af 21 eller flere nukleotider. Et lignende siRNA-lægemiddel, der aktuelt i Danmark er under fase II-klinisk afprøvning til behandling af diabetisk maculaødem, er et 19-nukleotider langt RNA-molekyle, som er vist at kunne nedregulere signaleringen fra sit targetgen RTP801 uden at aktivere TLR3 [15].

Behandling af patologisk angiogenese med VEGF-hæmmer er den første kendte interventionsmulighed mod eksudativ AMD, som er specifikt rettet mod at hæmme et led i sygdommens udvikling. Den aktuelt anvendte behandling kræver hyppige, ofte månedlige, injektioner i corpus vitreum af stoffer, som binder VEGF, og dermed hæmmer virkningen af stoffet på receptorniveau. Dette er omkostningskrævende, både for patienterne og sundhedsvæsenet. Det vil derfor have stor betydning at kunne udvikle nye metoder til at hæmme den angiogenesefremmende virkning af VEGF, herunder hæmning af VEGF-syntesen med RNAi.

Som det fremgår af artiklen, er det muligt at opnå en specifik effekt af RNAi, hvis siRNA-molekylerne indkapsles, så de ikke reagerer med uspecifikke receptorer på vejen fra indføringsstedet til de celler, hvor de skal virke. Øjet er et oplagt målorgan for udviklingen af sådanne nye administrationsmåder, for det første fordi stoffer, der er indgivet i corpus vitreum kun vil have mulighed for at interagere med nogle få og velkendte celletyper i øjets nethinde og pigmentepitel, og for det andet fordi injektionen og dens konsekvenser kan observeres direkte gennem øjets optik in vivo. Dog ikke mindst, fordi en mulig effekt vil have direkte implikationer for behandlingen



FAKTABOKS

Små interfererende ribonukleinsyre (siRNA)-medieret nedregulation af *vascular endothelial growth factor* (VEGF) eller dennes receptor afprøves til behandling af patienter med aldersrelateret maculadegeneration (AMD).

Resultater fra dyreforsøg tyder på uspecifikke ekstracellulære effekter af visse typer af ribonukleinsyreinterferens (RNAi)-molekyler.

Mekanismen ser ud til at inkludere binding til *toll-like*-receptorer (TLR3).

af alvorlig synstruende øjenssygdom, herunder særligt eksudativ aldersrelateret maculadegeneration.

KORRESPONDANCE: Thomas G. Jensen, Institut for Human Genetik, Aarhus Universitet, 8000 Århus. E-mail: thomas@humgen.au.dk

ANTAGET: 31. august 2009

FØRST PÅ NETTET: 15. februar 2010

INTERESSEKONFLIKTER: Ingen

LITTERATUR

1. Brown DM, Michels M, Kaiser PK et al. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology* 2009;116:57-65.e5.
2. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS et al. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;355:1419-31.
3. Regillo CD, Brown DM, Abraham P et al. Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER Study year 1. *Am J Ophthalmol* 2008;145:239-48.
4. Fire A, Xu S, Montgomery MK et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
5. Tuschl T. RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem* 2001;2:239-45.
6. Ma Y, Chan C, He M. RNA interference and antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007;13:5169-79.
7. Reich SJ. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis* 2003;9:210-6.
8. Shen J, Samul R, Silva RL et al. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* 2006;13:225-34.
9. Kleinman ME, Yamada K, Takeda A et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 2008;452:591-7.
10. <http://www.genomeweb.com/rnai/landmark-step-acuity-first-firm-begin-rnai-based-drug-study-humans> (19. oktober 2009).
11. Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:129-38.
12. Schyth BD, Lorenzen N, Pedersen FS. A high throughput in vivo model for testing delivery and antiviral effects of siRNAs in vertebrates. *Mol Ther* 2007;15:1366-72.
13. Community Corner. *Nature Medicine* 2008;14:6.
14. Kalluri R, Kanasaki K. RNA interference: Generic block on angiogenesis. *Nature* 2008;452:543-5.
15. www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00701181?term=04523655 (19. oktober 2009).