

RNA-Interferenz

Effizientes *gene silencing* durch potente und serumstabile siRNA

ROMY ZIEGER¹, JULIA GEBHARDT², JACQUES ROHAYEM^{1, 2}

¹INSTITUT FÜR VIROLOGIE, MEDIZINISCHE FAKULTÄT CARL GUSTAV CARUS, TU DRESDEN

²RIBOXX GMBH, RADEBEUL

Die RNA-Interferenz durch siRNA ist eine neue Methode für *gene silencing*-Experimente sowie Therapie von Tumoren, degeneratives Erkrankungen oder Infektionen. Ein innovatives Design erhöht die Potenz sowie die Serum-Stabilität der siRNA.

RNA interference through siRNA is a new method useful for gene silencing *in vitro* or therapeutic settings against cancer, degenerative diseases or infections. A new design increases potency and serum stability of siRNA.

Seit der Charakterisierung des Phänomens der RNA-Interferenz im Jahre 1998 durch die Arbeitsgruppe von Andrew Fire und Craig Mellow [1] sind zahlreiche Erfindungen und wissenschaftliche Erkenntnisse generiert worden. Das Potenzial der RNAi-Therapie ist heute, in den Zeiten der personalisierten Medizin sowie der Entstehung von viralen Pandemien, deutlicher denn je, da sich diese Arten von Erkrankungen am besten mit RNAi-Therapien behandeln lassen. Weiterhin sind technische Probleme bei der Umsetzung der RNAi-The-

rapie erkannt worden, wie z. B. die Frage der Verabreichung von siRNA (*small interfering RNA*) in die Blutbahn und darüber hinaus der Verteilung der siRNA-Moleküle in die Zielzelle. Ein wesentlicher Punkt betrifft hier die Frage der Stabilität der siRNA, da diese im Serum und in den Körperflüssigkeiten der Verdauung durch RNasen ausgesetzt sind. Dennoch entwickeln zurzeit viele Pharmaunternehmen RNAi-Therapeutika, zwei Substanzen haben bereits die klinische Phase II erfolgreich durchgestanden. Derzeit wer-

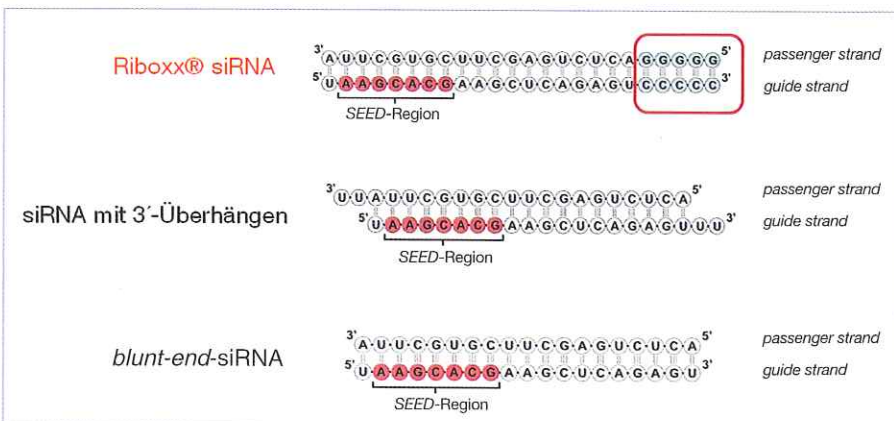
den siRNAs auf ihre Wirksamkeit bei der Behandlung von Krebs- und Viruserkrankungen sowie bei durch Fehlfunktionen des Stoffwechsels hervorgerufenen Krankheiten untersucht [2–4]. Der Vorteil des Einsatzes von siRNAs liegt in ihrer schnellen Herstellung und Optimierung. Somit können z. B. antivirale siRNA-Wirkstoffe schnell und effizient an eventuelle Veränderungen im Zielgen bzw. an neue oder resistente Virusstämme angepasst werden. Des Weiteren ist der therapeutische Einsatz von siRNAs bei Erkrankungen, die nicht durch herkömmliche Wirkstoffe behandelbar sind (*nondrugable targets*), denkbar [2].

Dennoch sind bis dato wesentliche Hürden zur breiten Anwendung der siRNA als Therapeutika vorhanden. Diese liegen unter anderem (1) in der niedrigen Selektivität der siRNA-Moleküle, das heißt an dem Verhältnis zwischen Potenz und Toxizität; und (2) in der niedrigen Stabilität der siRNA-Moleküle sowie deren Verfügbarkeit in dem betroffenen Gewebe [5].

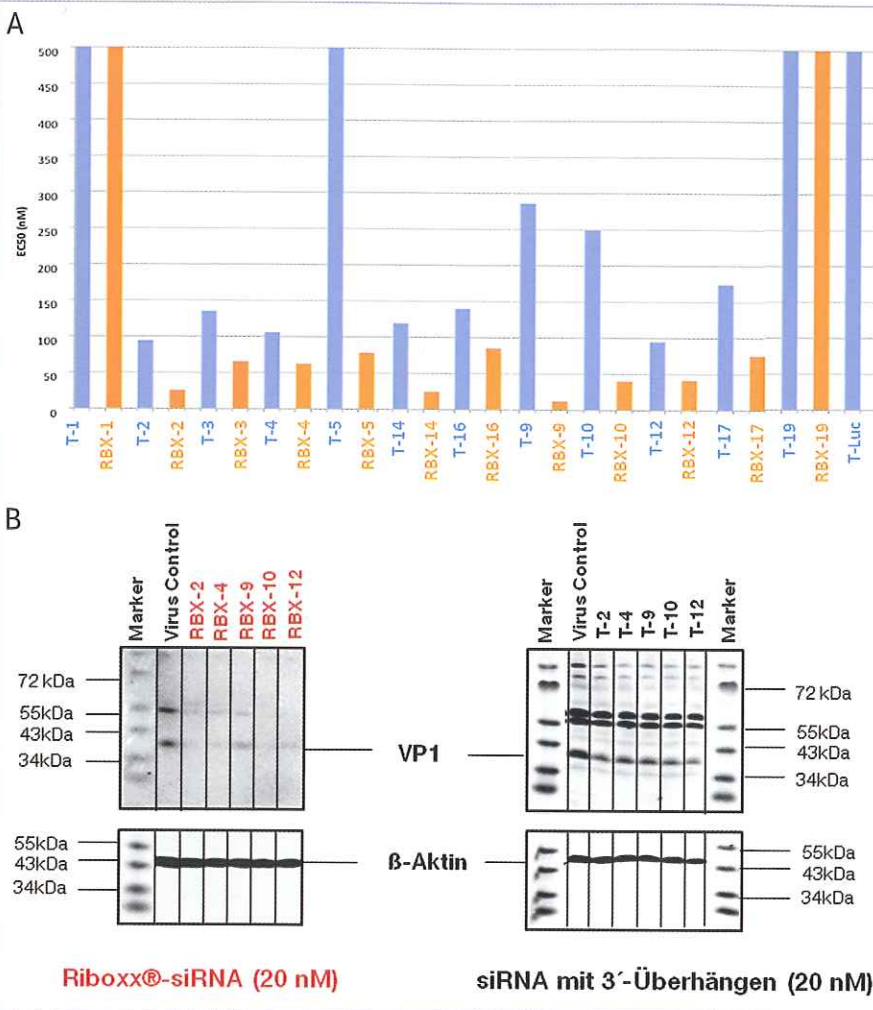
Ungeachtet dessen ist in näherer Zukunft die Vermarktung von zwei RNAi-Therapeutika zu erwarten. Beide Substanzen sind für die lokale Applikation angedacht, sodass in diesem Fall die Problematik der Verabreichung in die Blutbahn nicht aufkommt.

gene silencing durch innovative siRNA mit erhöhter Potenz

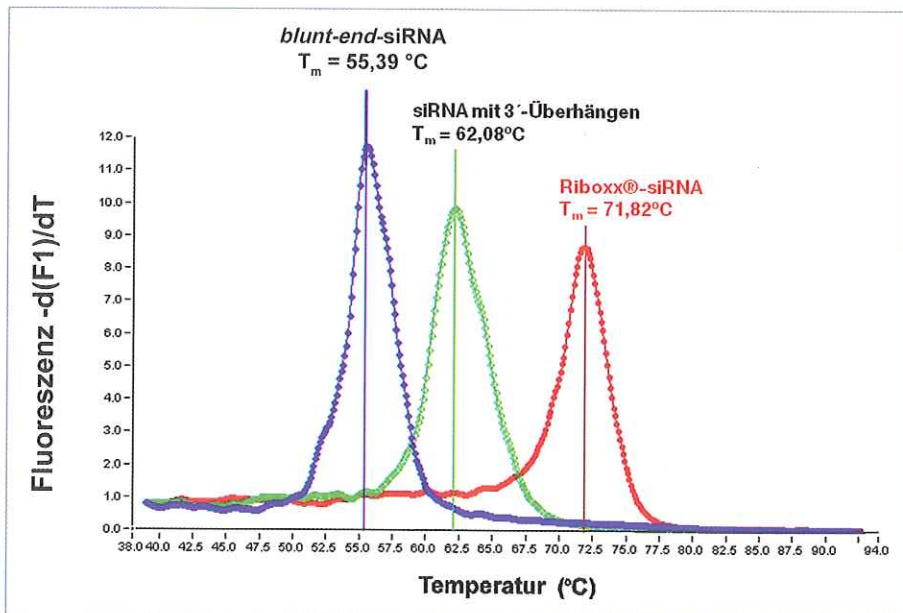
Die Potenz des *gene silencing* durch eine siRNA spiegelt sich in deren Selektivität wider. Die Selektivität wird durch den Ratio CC_{50}/EC_{50} ausgedrückt. EC_{50} (mittlere effektive Konzentration) misst die Konzentration an siRNA, bei der ein halbmaximaler *gene silencing*-Effekt beobachtet wird, und ist maßgebend für die Selektivität einer Substanz. Je niedriger der EC_{50} -Wert, also je weniger Substanz notwendig ist, um ein *gene silencing* zu erzeugen, desto höher die Potenz und dadurch die Selektivität für vergleichbare CC_{50} -Werte. Somit besitzt ein Molekül mit einem niedrigen EC_{50} -Wert eine hohe Selektivität. CC_{50} (mittlere zytotoxische Konzentration) misst



▲ **Abb. 1:** Darstellung der Ribosxx®-siRNA im Vergleich zur siRNA mit 3'-Überhängen oder ohne Überhänge. Sie besitzt verglichen mit siRNA mit 3'-Überhängen oder ohne Überhänge eine G/C-reiche Sequenz (Ribosxx®-Sequenzmotiv; roter Kasten), die sich gegenüber der SEED-Region befindet, und hat keine Überhänge.



◀ **Abb. 2:** Vergleich der Effizienz von Riboxx@-siRNA und siRNA mit 3'-Überhängen. **A**, Bestimmung der EC₅₀-Werte von siRNA mithilfe eines Zell-Proliferations-Assays. Die EC₅₀-Werte der Riboxx@-siRNA (RBX) sind orange, die der korrespondierenden siRNA mit 3'-Überhängen (T) blau dargestellt. Aus 12 ausgesuchten siRNAs zeigten fünf Riboxx@-siRNAs einen EC₅₀-Wert kleiner als 50 nM. Im Vergleich dazu zeigten die in der SEED-Region ähnlichen siRNAs mit 3'-Überhängen zwar auch eine Effizienz, der EC₅₀-Wert ist aber durchschnittlich fünf- bis achtfach höher als derjenige der Riboxx@-siRNA. Als Negativkontrolle dient eine gegen Luciferase gerichtete siRNA (siLuciferase, T-Luc). **B**, Vergleich der Effizienz des *gene silencing* der Riboxx@-siRNA und der siRNA mit 3'-Überhängen mittels Western Blot. Fünf der mithilfe des Zell-Proliferations-Assays ausgesuchten siRNAs zeigten im Western Blot ein komplettes *gene silencing* des VP1 (Virion-Protein 1) des HRV-1B bei einer Konzentration von 20 nM. Im Vergleich dazu zeigten die in der SEED-Region ähnlichen siRNAs mit 3'-Überhängen keine Wirksamkeit bei der gleichen Konzentration (20 nM). Als Negativkontrolle dienen die infizierten Zellen ohne Zusatz von siRNA (Virus Control) sowie der Nachweis der Expression von β-Aktin in den Zellen. Als Modell diente die Infektion von HeLa-Zellen mit dem Rhinovirus HRV-1B.



◀ **Abb. 3:** Bestimmung des Schmelzpunktes von siRNA ohne Überhänge (*blunt-end-siRNA*), mit 3'-Überhängen und mit dem Riboxx-Sequenzmotiv (Riboxx@-siRNA). Die Bestimmung des Schmelzpunktes (T_m) erfolgte mithilfe des LightCyclers (Roche) nach Färbung mit SYBR-Green. Das Riboxx@-Sequenzmotiv ermöglicht die Erhöhung des Schmelzpunktes der siRNA auf 71,82 °C, mit einem Gewinn von 9,8 °C an Stabilität im Vergleich zur siRNA mit 3'-Überhängen (T_m = 62,08 °C) und 16,3 °C im Vergleich zur siRNA ohne Überhänge (T_m = 55,39 °C).

die Konzentration an siRNA, bei der eine halbmaximale Zytotoxizität beobachtet wird. Bei siRNA spiegelt sich die Toxizität in dem sogenannten *off-target*-Effekt wider.

Das Problem der *off-target*-Effekte macht die Entwicklung innovativer siRNA mit einer erhöhten Selektivität notwendig. Riboxx hat ein neues Sequenzmotiv (Riboxx@-Sequenz-

motiv, [6]) für die siRNA entwickelt und patentiert. Die Riboxx@-siRNA besitzt im Vergleich zur siRNA mit 3'-Überhängen oder ohne Überhänge (*blunt-end-siRNA*) eine G/C-reiche Sequenz, die sich gegenüber der sogenannten SEED-Region befindet (Abb. 1).

Die Riboxx@-siRNA bietet den Vorteil der höheren Potenz im Vergleich zum her-

kömmlichen Design, wo die siRNA am 3'-Ende beider Stränge einen Überhang von zwei Nukleotiden aufweist. Die erhöhte Potenz lässt sich durch eine präferenzielle Beladung des *guide strand* auf dem RISC-Komplex im Vergleich zum *passenger strand* erklären. Somit wird im Verhältnis und für dieselbe siRNA-Menge ein größerer Teil des

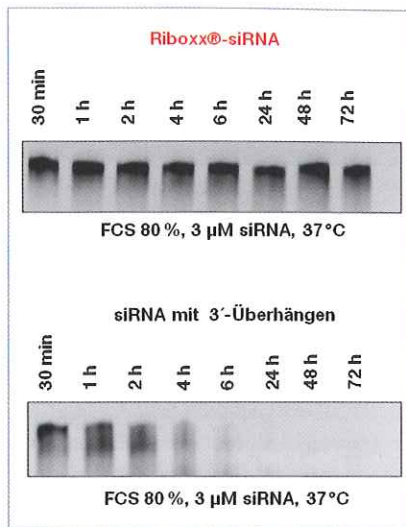
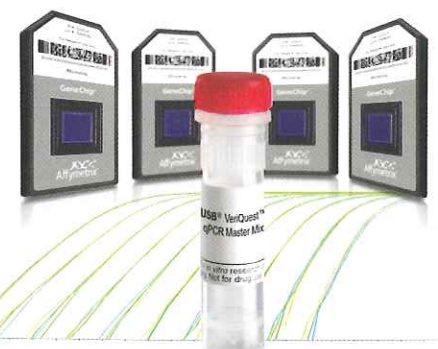
Our qPCR solution is backed by a trusted source.

Introducing USB® VeriQuest™ Master Mixes for all your qPCR needs.

Affymetrix® GeneChip® technology gives you confidence for your whole-genome microarray studies. Now our USB VeriQuest qPCR Master Mixes give you validation results you can trust. Replace your current qPCR master mix easily and confidently with the new one-tube VeriQuest Master Mix.

Discover why you should replace your current qPCR Master Mix with USB VeriQuest.

Visit usb.affymetrix.com/veriquest



▲ **Abb. 4:** Vergleich der Serumstabilität von Riboxx-siRNA und siRNA mit 3'-Überhängen. Die siRNAs wurden in fetalem Käberserum (FCS, 80 %) mit einer Konzentration von 3 µM bei 37 °C inkubiert und nach den dargestellten Zeitpunkten jeweils mittels nativem PAGE und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen. Die siRNA mit dem Riboxx®-Sequenzmotiv bleibt nach 72 Stunden Inkubation stabil. Dagegen wird die siRNA mit 3'-Überhängen nach zwei Stunden bereits verdaut und nach sechs Stunden vollständig abgebaut.

guide strand mit einer erhöhten Potenz der siRNA beladen.

Diese erhöhte Potenz (EC_{50}) wurde *in vitro* sowohl mithilfe eines Proliferations-Assays (MTS-Assay, **Abb. 2A**) als auch mittels Western Blot validiert (**Abb. 2B**).

siRNA mit erhöhter Serumstabilität verglichen mit herkömmlicher siRNA

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die siRNA mit dem Riboxx®-Sequenzmotiv eine erhöhte Stabilität im Vergleich zu siRNA mit dem herkömmlichen 3'-Überhang-Design aufweist. Ein Ausdruck dessen ist die Erhöhung des Schmelzpunktes der Riboxx®-siRNA im Vergleich zu herkömmlichen siRNAs (**Abb. 3**).

Die erhöhte Stabilität der Riboxx®-siRNA führt wiederum zur erhöhten Resistenz gegen Abbau durch Serum-Exonukleasen bzw. -RNAsen (**Abb. 4**). Diese erhöhte Serumstabilität stellt einen erheblichen Vorteil bei der Anwendung der siRNA für therapeutische Zwecke dar, da bei der Riboxx®-siRNA keine chemischen Modifikationen der siRNA notwendig sind,

um eine Serumstabilität zu erreichen. Dies wiederum bedeutet, dass nach Identifizierung einer wirksamen siRNA *in vitro* dieselbe siRNA ohne Zusatz von chemischen Modifikationen verwendet werden kann.

Ausblick

Mit der Entwicklung und Validierung der Riboxx®-siRNA mit erhöhter Potenz und Stabilität rückt die Anwendung von siRNA als neue Klasse von Therapeutika etwas näher, obwohl die Frage der systemischen Verabreichung der siRNA immer noch unbeantwortet bleibt. Dennoch bietet die siRNA-Therapie für lokale Applikationen, wie z. B. der intravitrealen Injektion oder der Verabreichung in die Lunge durch Aerosol, eine echte Alternative zu herkömmlichen *small molecules*. Daher ist die Zulassung durch die FDA von zwei siRNA-Therapeutika, die eine für die Behandlung der akuten Makuladegenereszenz und die andere für die Behandlung von Lungeninfektionen mit dem RS-Virus in den nächsten zwei Jahren zu erwarten.

Literatur

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 6669:806-811
- [2] Bumcrot D, Manoharan M, Koteliansky V et al. (2006) RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. Nat Chem Biol 12:711-719
- [3] Kurreck J (2009) RNA interference: from basic research to therapeutic applications. Angew Chem Int Ed Engl 8:1378-1398
- [4] Soutschek J, Akinc A, Bramlage B et al. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. Nature 7014:173-178
- [5] De Paula D, Bentley MV, Mahato RI (2007) Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. RNA 4:431-456
- [6] Rohayem, J. Improved design of small interfering RNA. PCT/EP2010/052348



Romy Zieger, Julia Gebhardt und Jacques Rohayem (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

PD Dr. habil. Jacques Rohayem
Riboxx GmbH
Pharmapark Radebeul
Meissner Straße 191
D-01445 Radebeul
Tel.: 0351-8336010
Fax: 0351-83360139
info@riboxx.com