

Tumorspezifischer Transfer von Anti-microRNA zur Krebstherapie – pHILIP ist der Schlüssel**

Ernst Wagner*

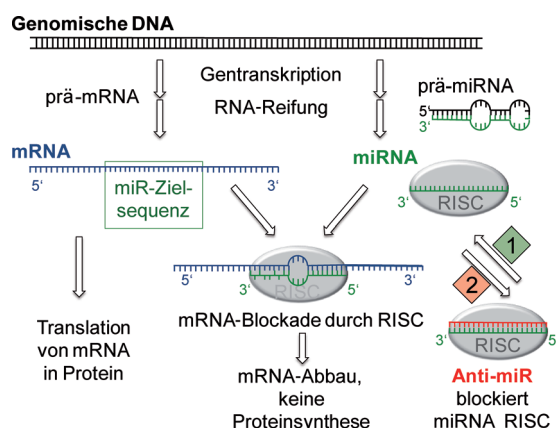
Membranen · microRNA · Peptidnucleinsäuren · RNA ·
Zielgerichteter Transfer

Ein tieferes Verständnis der RNA-Interferenz (RNAi) wird neue medizinische Möglichkeiten eröffnen. Das humane Genom codiert für über 1700 microRNAs (miRs), die gewebs- und krankheitsspezifisch exprimiert werden. Eine transkribierte miR wird einem Reifeprozess unterzogen; dazu gehört die Einlagerung des aus 21–23 Nucleotiden bestehenden Leitstrangs in den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) zusammen mit Argonautprotein. RISCs erkennen komplementäre Stränge der Messenger-RNA (mRNA) durch Watson-Crick-Basenpaarung (perfekte Übereinstimmung der ersten sieben oder acht Nucleotide des 5'-Endes des Leitstrangs) und hemmen die Translation von mRNA in ein

Protein (Schema 1). Auf diese Weise wird die Expression von Genen auf posttranskriptioneller Ebene geregelt.

Fehlregulationen der miRNA-Expression wurden mit dem Auftreten menschlicher Krankheiten in Verbindung gebracht. Bei der Krebsentwicklung führt ein Verlust von Tumorsuppressor-miRs (wie miR-34) zu aggressiveren, stärker metastasierenden und chemoresistenteren Tumorzellen. Eine therapeutische Wiedereinführung von Suppressor-miRs in Tumoren (Schema 1, Raute 1) könnte maligne Phänotypen umkehren. Ein miR-34-Mimetikum befindet sich derzeit in der klinischen Entwicklung (als lipidische Formulierung) für Patienten mit Leberkrebs oder Lebermetastasen.^[1] Im Unterschied dazu fördern andere miRs, die so genannten onco-miRs, das Wachstum und die Aggressivität von Tumoren. Solche onco-miRs können durch eine spezifische Basenpaarung mit Antisensemolekülen (8–23 Nucleotide), den so genannten miR-Antagonisten (Anti-miRs; Schema 1, Raute 2), inaktiviert werden und somit benigne Proteinexpressionsprofile wiederherstellen.^[2]

Die Zahl an miR- und andere RNAi-Therapeutika in klinischen Studien wächst stetig.^[3] Die wesentliche Hürde für weitere Fortschritte ist dabei der intrazelluläre, idealerweise gewebsspezifische Transfer. RNA wird in biologischer Umgebung abgebaut und kann als ein Polyanion von mittlerer Größe nicht passiv in Zellen hineindiffundieren. Zur Lösung dieses Problems werden derzeit verschiedene chemische Strategien entwickelt, darunter 1) chemische Modifikationen des Grundgerüsts, 2) Nanopartikelformulierungen und 3) Oligonucleotidkonjugate. Chemische Modifikationen wurden zur direkten Stabilisierung des Oligonucleotidgrundgerüsts entwickelt. Dazu gehören Peptidnucleinsäuren (PNAs), konformativ fixierte Nucleinsäuren (locked nucleic acids, LNAs) oder die tricycloDNA-Chemie.^[4] Zur Erleichterung der Aufnahme in die Zelle wurden Sequenzen in ihrer Nucleotidzahl minimiert. Dadurch entstanden sehr wirksame, einzelsträngige siRNAs oder tiny-LNAs. Alternativ dazu wurden, inspiriert von der natürlichen Virusübertragung, RNAi-Moleküle in virusähnliche Nanopartikel eingebaut. Diese nutzen die zellspezifische Bindung oder andere Transportdomänen für den zielgerichteten Transfer in Zellen. Eine dritte Strategie vereint die Vorteile der beiden vorangehenden Vorgehensweisen: Oligonucleotide mit chemisch verbesserten Grundgerüsten wurden mit kleinen Transportdomänen verbunden. Dabei handelt es sich z.B. um Liganden für die zielgerichtete Bindung an Zellrezeptoren oder um



Schema 1. microRNA-Interferenz. Die Raute zeigt Optionen für therapeutische Eingriffe (Einbringen 1. von synthetischen prä-microRNA- oder miR-Mimetika, um RNAi zu induzieren, oder 2. von Anti-miRs wie PNA oder LNA, um die RNA-Interferenz zu inhibieren und den RISC-Strang zu hemmen).

[*] Prof. Dr. E. Wagner

Department für Pharmazie, Center for NanoScience (CeNS)
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
und
Nanosystems Initiative Munich (NIM)
Schellingstraße 4, 80799 München (Deutschland)
E-Mail: ernst.wagner@cup.uni-muenchen.de

[**] Dem DFG SFB1032 (Projekt B4) wird für die finanzielle Unterstützung gedankt. Wir danken Katharina Müller, Doktorandin der LMU (AK Wagner), für die deutsche Übersetzung.

zellgängige Peptide, um Zelloberflächen oder endosomale Membranen zu überwinden.^[5] Diese Konjugate können an spezifische Stellen binden, und dank ihrer geringeren Größe ist zu erwarten, dass sie eher in das Zielgewebe diffundieren als größere Nanopartikel. Die subkutane Injektion einer solchen konjugierten siRNA führte z. B. zu sehr vielversprechendem Gen-Stummschalten in Mäusen^[6] und Menschen.^[3] Diese siRNA war an einen synthetischen trimeren *N*-Acetylgalactosamin-Liganden, der an den Asialoglycoprotein-Rezeptor auf Leberzellen bindet, konjugiert. Für viele auf RNAi basierende Transferkonzepte stellte sich die Leber als das zugänglichste Zielorgan heraus. Der produktivste Mechanismus für den Zelleintritt (durch direkte Penetration der Zellmembran oder durch Endozytose in Vesikel und anschließenden Austritt ins Zytosol) wird derzeit noch diskutiert.

Die kürzlich veröffentlichte Arbeit von Cheng et al.^[7] zeigt das Potenzial von Anti-miR-Peptidkonjugaten zur Krebstherapie auf. Diese Anti-miR-Mittel basierten auf PNAs, die über Disulfidbindung mit einem membrantranslozierenden Peptid verbunden waren. Diese Anti-miR-Konjugate wurden in verschiedenen Tumormodellen, darunter streuende Lymphome, die sich spontan in transgenen Mäusen entwickeln, angewendet (Abbildung 1). Die Arbeit kann als

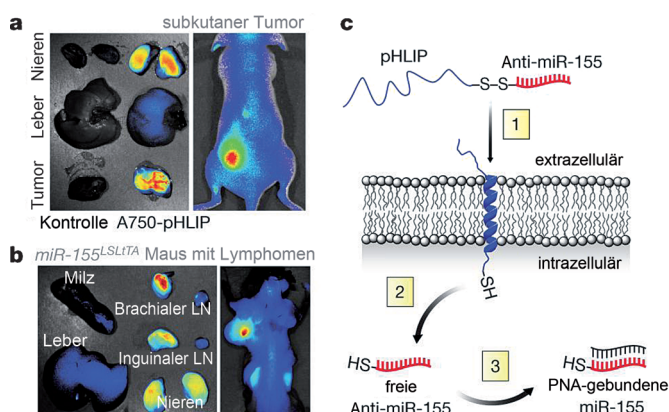


Abbildung 1. Zielgerichtete Behandlung von miR-155-abhängigen Lymphomen durch pHLIP. Zielgerichtete Verteilung von pHLIP, das mit Alexa Fluor 750 (A750) markiert wurde, 36 h nach der systemischen Applikation in a) nackten Mäusen mit miR-155-Tumoren in der Flanke und b) einer miR-155-Maus mit Lymphadenopathie. Kontrolle: A750-Cystein. LN: Lymphknoten. c) Schema der PNA-Anti-miR-155-Aufnahme durch pHLIP. 1) Bei $\text{pH} < 7$ integriert sich der C-Terminus von pHLIP quer durch Lipiddoppelschichten, was den Transfer der angehängten miR-155-PNA erleichtert. 2) Die Disulfidbrücke zwischen pHLIP und Anti-miR-155 wird im Zytosol reduziert. 3) Intrazelluläre Anti-miR-155-PNA liegt frei vor, um an miR-155 zu binden und diese zu inhibieren. Adaptiert aus Lit. [7] mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group (2015).

ein Meisterstück interdisziplinärer Arbeit zwischen Membranbiophysik, Nucleinsäurechemie, Transfer und microRNA-Tumorbiologie angesehen werden. Mehr als zwei Jahrzehnte an wichtigen Entdeckungen wurden zusammengefasst und führten zu einem signifikanten Durchbruch. Ungeladene Polyamid-PNAs wurden 1991 das erste Mal von Nielsen et al.

beschrieben.^[8] In den späten 1990ern zeigten Engelman und Mitarbeiter, dass sich transmembranäre Peptide wie die C-Helix des Bakteriorhodopsins pH-abhängig spontan in Lipiddoppelschichten einlagern können. Später entwickelten sie ein verwandtes Peptid mit dem Namen pHLIP: das pH- („low“-)-Insertionspeptid. pHLIP ist ein 38 Aminosäuren langes, hydrophobes und negativ geladenes Peptid, das sich im leicht sauren pH-Bereich (um $\text{pH} 6.5$) als eine Helix in Zellmembranen integriert. Zu transportierende Moleküle werden durch die Plasmamembran hindurch in die lebenden Zellen verlagert, wenn sie am C-Terminus von pHLIP angebracht werden. Sind die Moleküle über eine Disulfidbrücke angeknüpft, werden sie in der reduzierenden intrazellulären Umgebung freigesetzt (Abbildung 1 c). Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Transfermöglichkeit auf niedermolekulare, ungeladene Verbindungen beschränkt war. Der Transport eines 20 Basen langen Oligonucleotids gelang nicht; dagegen konnten PNAs erfolgreich in das Zytosol transferiert werden.^[9] Diese direkte Durchquerung von Zellmembranen unterscheidet sich bemerkenswert von der Mehrheit der Transferwege. Bei letztgenannten werden Partikel gewöhnlich zuerst in Endosomen aufgenommen und durchqueren anschließend die Membran.

Um den Tumor *in vivo* spezifisch zu treffen, nutzten Cheng et al.^[7] die Acidose (unter $\text{pH} 7$), durch die solide Tumoren und eine Vielzahl anderer pathologischer Zustände (z. B. Entzündungen oder Infektionen) gekennzeichnet sind. Die Autoren zeigten, dass die zelluläre Aufnahme und der funktionelle pHLIP-PNA-Anti-miR-Transfer *in vitro* bei extrazellulärem $\text{pH} 6.2$, jedoch nicht bei physiologischem $\text{pH} 7.4$ stattfinden. Die *In-vivo*-Untersuchungen konzentrierten sich größtenteils auf die onco-miR-155 und Lymphome. Die Überexpression von miR-155 tritt in vielen Krebsarten auf und kann die Entwicklung von Lymphomen induzieren.^[10] Slack und seine Mitarbeiter entwickelten ein Tet-Off-basiertes, transgenes Mausmodell, in dem miR-155 in hämatopoetischem Gewebe exprimiert wird. Im Alter von zwei bis drei Monaten entwickeln diese Mäuse spontan ein streuendes Lymphom. Die Autoren demonstrierten einen zielgerichteten Transport von intravenös injiziertem und fluoreszenzmarkiertem pHLIP in subkutanen (Abbildung 1 a) und spontan streuendes Lymphom (Abbildung 1 b). Wichtig ist, dass das Material nicht in der Leber, einem wesentlichen Sammelbecken für Nanoagentien, akkumulierte. Als eine positive Überraschung reduzierte die pHLIP-Konjugation die Leberakkumulation von pHLIP-Anti-miR um ein Zehnfaches gegenüber jener der unmodifizierten PNA. Außerdem wurde ein Transfer (wahrscheinlich aufgrund der Acidität der Nierentubuli) in die Niere, die pHLIP ausscheidet, gefunden. Bei der höchsten untersuchten Dosis zeigten toxikologische Studien in Mäusen keinerlei Anzeichen von Toxizität (Körpergewicht, Blutbild, Leberenzyme, Nierenfunktion und Morphologie) infolge der Behandlung. Zwei intravenöse Injektionen einer geringen Dosis (1 mg kg^{-1}) pHLIP-Anti-miR-155 führten zu einer signifikanten Retardation des Wachstums der subkutanen Lymphome. Dies konnte in Kontrollgruppen, bei denen Anti-miR-Sequenzen ohne Zielgen oder Anti-miR-155 PNA ohne pHLIP verwendet wurden, nicht beobachtet werden. Bei einer geringfügig höheren Dosis

wurde ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber dem Einsatz von Anti-miR-155-LNA nachgewiesen. Die Ausbreitung von lymphatischen Metastasen in andere Organe wurde blockiert. Bemerkenswerterweise konnten therapeutische Effekte im klinisch relevantesten, spontan streuenden Lymphommodell aufgezeigt werden. Hier reduzierte sich die Tumorlast in Milz, Lymphknoten und Leber. Der tumorspezifische Transport mithilfe von pHLIP und die Anti-miR-155-PNA-Therapie erwiesen sich auch bei anderen Krebstypen als wirksam. Dies verspricht eine glänzende Zukunft für Arzneimittel auf Basis von Anti-miR-Konjugaten.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 5824–5826
Angew. Chem. **2015**, 127, 5918–5920

-
- [1] A. Bouchie, *Nat. Biotechnol.* **2013**, 31, 577.
[2] a) J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, 438, 685–689; b) J. J. Elmén, M. Lindow, S. Schütz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjärn, H. F. Hansen, U. Berger, S. Gullans, P. Kearney, P. Sarnow, E. M. Straarup, S. Kauppinen, *Nature* **2008**, 452, 896–899.

- [3] D. Haussecker, *J. Controlled Release* **2014**, 195, 49–54.
[4] E. Wagner, *Biomater. Sci.* **2013**, 1, 804–809.
[5] T. Lehto, E. Wagner, *Nanomedicine* **2014**, 9, 2843–2859.
[6] J. K. Nair, J. L. Willoughby, A. Chan, K. Charisse, M. R. Alam, Q. Wang, M. Hoekstra, P. Kandasamy, A. V. Kel'in, S. Milstein, N. Taneja, J. O'Shea, S. Shaikh, L. Zhang, R. J. van der Sluis, M. E. Jung, A. Akinc, R. Hutabarat, S. Kuchimanchi, K. Fitzgerald, T. Zimmermann, T. J. van Berkel, M. A. Maier, K. G. Rajeev, M. Manoharan, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 16958–16961.
[7] C. J. Cheng, R. Bahal, I. A. Babar, Z. Pincus, F. Barrera, C. Liu, A. Svoronos, D. T. Braddock, P. M. Glazer, D. M. Engelman, W. M. Saltzman, F. J. Slack, *Nature* **2015**, 518, 107–110.
[8] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497–1500.
[9] Y. K. Reshetnyak, O. A. Andreev, U. Lehnert, D. M. Engelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 6460–6465.
[10] S. Costinean, N. Zanesi, Y. Pekarsky, E. Tili, S. Volinia, N. Heerema, C. M. Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 7024–7029.

Eingegangen am 6. März 2015
Online veröffentlicht am 20. April 2015