

# MikroRNA vstupují do klinického testování

## MicroRNAs Enter the Clinical Trials

Slabý O.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup> Středoevropský technologický institut, skupina Molekulární onkologie II – solidní nádory, Brno

MikroRNA (miRNA) tvoří početnou skupinu endogenních krátkých nekódujících RNA, přibližně 18–25 nukleotidů dlouhých, které tlumí translaci vazbou na cílové mRNA. Počet miRNA neustále narůstá, poslední verze databáze miR-Base (verze 18 z listopadu 2011) zahrnuje více než 1 000 anotovaných miRNA v lidském genomu a předpokládá se, že toto číslo se ještě významně navýší, protože mnoho miRNA stále čeká na svou experimentální validaci. Na základě bioinformatických predikcí se předpokládá, že miRNA mají potenciál regulovat až polovinu kódujících genů v lidském genomu a každá miRNA může regulovat řádově stovky cílových mRNA [1]. Sekvence miRNA jsou vysoce sekvenčně konzervované i napříč ne zcela příbuznými organizmy, což naznačuje jejich podíl na esenciálních biologických procesech. Dnes už je obecně akceptováno, že miRNA hrají zásadní role v procesech, jako jsou vývoj, diferenciaci, proliferace či apoptóza, a podílejí se na regulaci kmenových vlastností buněk, imunitního systému nebo nádorové transformaci. MiRNA byly objeveny před 17 lety týmem Victora Ambrose. Tato výzkumná skupina popsala, že *lin-4*, známý gen podílející se na vývoji hlístice *Caenorhabditis elegans* nekóduje protein, ale místo toho vede ke vzniku 22 nukleotidů dlouhé RNA, která, jak se následně ukázalo, interaguje s mRNA genu pro *lin-14* a tlumí jeho translaci [2]. Tato fascinující forma regulace genové exprese, kdy se malá RNA váže na jinou RNA, byla přehlížena více než 30 let. MiRNA zůstávaly nedetekovány, pravděpodobně proto, že snahy „lovců genů“ se soustředily především

na dlouhé mRNA, krátké RNA z tohoto hlediska nepředstavovaly zajímavý cíl. Protože funkce miRNA nebyla známa, byly tyto krátké RNA původně považovány za odpadní RNA. Od původní práce popisující funkci *lin-4* u hlístice již bylo nabyto mnoho nových poznatků o fungování robustní post-transkripční regulační sítě miRNA, až v roce 2006 získali Andrew Z. Fire a Craig C. Mello Nobelovu cenu za fyziologii nebo medicínu za popis jevu RNA interference a způsobu, jak miRNA regulují genovou expresi [3].

Enormní zájem odborné veřejnosti o tuto problematiku nejlépe demonstruje nárůst počtu nových prací indexovaných každoročně v databázi PubMed v průběhu posledních 10 let. Přibližně třetina těchto prací je vždy věnována studiu miRNA u nádorových onemocnění (obr. 1). Těchto v součtu přibližně

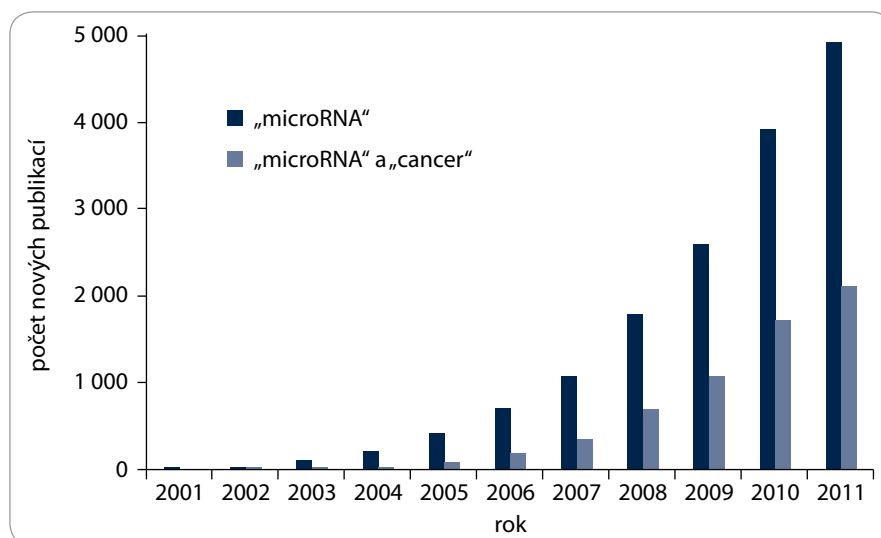


RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.

Klinika komplexní onkologické péče  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: on.slaby@gmail.com

Obdrženo/Submitted: 2. 4. 2012

šest tisíc prací poukázalo nejen na zcela zásadní význam miRNA v molekulární patologii nádorových onemocnění, ale i na jejich možné využití v klinické praxi, a to jak v diagnostice, tak v terapii [4,5]. Získané poznatky vedly k vytvoření biotechnologických společností zaměřených na diagnostiku založenou výhradně na detekci miRNA, jako je například Rosetta Genomics



Obr. 1. Počet nových publikací v databázi medicínských informací PubMed při zadání klíčového slova „microRNA“ nebo kombinace „microRNA“ a „cancer“.

Tab. 1. Přehled nejvýznamnějších farmaceutických společností zabývajících se vývojem léčiv cílených na miRNA.

Společnost	Zaměření a pipeline
<b>Santaris Pharma</b> <a href="http://www.santaris.com/">(http://www.santaris.com/)</a> Aliance Pfizer, GlaxoSmithKline	vývoj léčiv založených na bázi jednořetězcových oligonukleotidů s patentovanou LNA (Lock Nucleic Acid) modifikací, především miRNA antagonistů (anti-miR terapie), u metabolických, infekčních, nádorových onemocnění a vzácných genetických chorob
<b>Regulus Therapeutics</b> <a href="http://www.regulusrx.com/">(http://www.regulusrx.com/)</a> Aliance GlaxoSmithKline, Sanofi	vývoj léčiv založených na bázi jednořetězcových oligonukleotidů s patentovanými chemickými modifikacemi (cET, MOE), především miRNA antagonistů (anti-miR terapie), u metabolických, fibrotických, infekčních a nádorových onemocnění
<b>Mirna Therapeutics</b> <a href="http://www.mirnatherapeutics.com/">(http://www.mirnatherapeutics.com/)</a>	vývoj protinádorové terapie cílící miRNA, především substitučního charakteru, tzv. miRNA replacement therapy, za použití chemicky modifikovaných dvouřetězcových oligonukleotidů označovaných jako miRNA mimics
<b>Miragen Therapeutics</b> <a href="http://www.miragentherapeutics.com/">(http://www.miragentherapeutics.com/)</a> Aliance Servier, Santaris Pharma	vývoj léčiv založených na použití jednořetězcových inhibičních oligonukleotidů označovaných AntimiRs a dvouřetězcových substitučních oligonukleotidů označovaných jako ProMirs především u kardiovaskulárních onemocnění; využívá lipozomální formulaci SMARTICLES licencovanou společností Marina Biotech

(<http://www.rosettagenomics.com/>), ale také farmaceutických společností vyvíjejících nové léky cílící miRNA (tab. 1). K nejvýznamnějšímu momentu v této oblasti došlo v září roku 2010, kdy první lék na bázi miRNA vstoupil do fáze 2 klinického hodnocení [5].

V závislosti na funkci miRNA a jejím stavu v nádorové tkáni existují dvě základní strategie, jak cílit miRNA v terapii nádorových onemocnění: inhibiční (využití antagonistů – anti-miRs) a substituční (využití miRNA mimics).

Antagonisté miRNA (anti-miRs) jsou vytvářeny s cílem tlumit endogenní miRNA, u kterých došlo v nádorové tkáni k patologické aktivaci. Tento přístup je koncepčně podobný jiným inhibičním lékům, které cílí produkt jednoho genu, jako jsou například malé interferující RNA (siRNA) nebo nízkomolekulární inhibitory, a zahrnuje identifikaci miRNA specifické pro dané onemocnění (terapeutický cíl) a vývoj nové molekuly s dostatečnou specificitou a inhibiční aktivitou. Během tohoto procesu může tato miRNA sloužit jako biomarker farmakokinetických a farmakodynamických vlastností vyvíjeného antagonisty. Nejvíce užívaná strategie k tlumení miRNA je založena na použití jednořetězcových oligonukleotidů s komplementární sekvencí k cílové miRNA. Cukrofosfátová páteř těchto antagonistů je chemicky modifikovaná tak, aby zvýšila

jejich afinitu k cílové miRNA a zlepšila jejich farmakokinetické vlastnosti, především je chránila před degradačním účinkem nukleáz (2-O-methylace, LNA – Lock Nucleic Acids, fosforothioatová vazba a další). Výsledná molekula většinou kombinuje více typů modifikací. Dle typu modifikací pak byly tyto oligonukleotidy historicky označovány jako antagomiRs, anti-miRs apod., dnes je pro antagonisty obecně používán termín anti-miR. Vývojem antagonistů miRNA se zabývají především společnosti Santaris Pharma, Regulus Therapeutics a miRagen Therapeutics. Produkt dánské společnosti Santaris Pharma miravirsen (SPC3649) úspěšně ukončil fázi 2a klinického hodnocení v léčbě hepatitidy typu C (HCV). Miravirsen je LNA-antimiR™ oligonukleotid cílící *miR-122*, která je specifická pro jaterní buňky a je nezbytná k replikaci HCV. Vzhledem k tomu, že miravirsen na rozdíl od konvenčních antivirotik působí na hostitele, a nikoliv virus samotný, je pravděpodobnost vzniku rezistence nízká. Oligonukleotidy nejsou metabolizovány přes CYP450, nýbrž nukleázami, což významně eliminuje problém s lékovými interakcemi [5,7]. V oblasti využití antagonistů miRNA v protinádorové terapii je doposud nejdále společnost Regulus Therapeutics, která úspěšně ukončuje preklinické testování anti-*miR-21* v léčbě multiformního glioblastomu a hepatocelulárního karcinomu [8,9].

*MiR-21* je jednou z nejvíce studovaných onkogenních miRNA, která byla poprvé popsána právě na modelu multiformního glioblastomu. Regulus Therapeutics má patentované dvě vlastní chemické modifikace – 2'-methoxyethyl (MOE) a 2', 4'-constrained 2'O-ethyl (cEt), které významně vylepšují farmakokinetický profil jejich anti-miRs. Na využití antagonistů miRNA v terapii kardiovaskulárních onemocnění se zaměřuje společnost miRagen Therapeutics (tab. 2).

Vzhledem k tomu, že u nádorových onemocnění pozorujeme globální snížení hladin miRNA, je pro terapii nádorových onemocnění podstatně zajímavější druhá, substituční strategie, cílící miRNA, jejichž hladiny jsou v poškozené tkáni sniženy. Tato strategie představuje možnost terapeuticky substituovat funkci nádorové supresorových miRNA. Z tohoto hlediska může tento typ terapie upomínat na klasickou genovou terapii, ale nízká molekulová hmotnost miRNA umožňuje jejich podání v podobě krátkých dvouřetězcových oligonukleotidů bez nutnosti použití virových vektorů známých z genové terapie. Tyto dvouřetězcové oligonukleotidy (miRNA mimics) sdílí stejnou sekvenci s endogenní miRNA, a předpokládá se proto, že budou regulovat zcela identický soubor cílových genů. Předpokladem jejich účinku je funkční komplex miRISC (microRNA Induced Silencing Com-

Tab. 2. Přehled miRNA sloužících jako terapeutické cíle.

miRNA	Indikace	Společnost	Validace cíle	Optimalizace vůdčí struktury	Preklinické testování	Fáze 1	Fáze 2
<b>Inhibiční miRNA terapie (anti-miRs)</b>							
miR-122*	hepatitida typu C	Santaris Pharma	+	+	+	+	+
miR-21	multiformní glioblastom	Regulus Therapeutics	+	+	+		
miR-21	hepatocelulární karcinom	Regulus Therapeutics	+	+	+		
miR-21	renální fibróza	Regulus Therapeutics	+	+	+		
miR-33a/b	ateroskleróza	Regulus Therapeutics	+	+	+		
miR-208/miR-499	chronické srdeční selhání	miRagen Therapeutics	+	+	+		
miR-15/miR-195	remodelace po infarktu myokardu	miRagen Therapeutics	+	+	+		
miR-451	polycythemia vera	miRagen Therapeutics	+	+	+		
<b>Substituční miRNA terapie (miRNA mimics)</b>							
miR-34	hepatocelulární karcinom fáze 1 – první čtvrtletí 2013	miRNA therapeutics	+	+	+		
miR-34	nemalobuněčný karcinom plic	miRNA therapeutics	+	+	+		
miR-34	karcinom prostaty	miRNA therapeutics	+	+	+		
let-7	nemalobuněčný karcinom plic	miRNA therapeutics	+	+	+		
miR-29	srdeční fibróza	mirage Therapeutics	+	+			

\*Mezinárodní nechráněný název léčivé látky je miravirsen (SPC3649).

plex), který je multiproteinovým efektorovým komplexem zodpovědným za realizaci funkce miRNA. MiRISC inkorporuje vedoucí řetězec z dvouřetězcové miRNA mimic a tlumí translaci cílových mRNA, zatímco druhý řetězec je degradován. V tomto případě jsou terapeutickou látkou vlastní miRNA a východisko jejich terapeutického užití je založeno spíše na jejich pozmeněné hladině v nádorové tkáni než na vybraných cílových genech, které regulují. Cílem substituční terapie není ovlivňovat konkrétní patologickou signální dráhu, ale pouze navodit fyziologický stav ve smyslu zvýšení hladin dané miRNA. Uchopit celou šíři regulačních efektů dané miRNA není totiž dost dobře možné, avšak vzhledem k tomu, že stav, který navozujeme, je fyziologický, nevede tato substituce k významným vedlejším účinkům. Informace o signálních drahách a konkrétních genech regulovaných danou miRNA mají samozřejmě svou hodnotu z důvodu lepšího pochopení mechanismu účinku, nepřímého monitorování aktivity dané miRNA a designování klinických studií. Pěkným příkladem využití miRNA

v tomto kontextu je *let-7*, nádorově supresorová miRNA, jejíž snížené hladiny byly pozorovány u mnoha solidních nádorů. Nejlépe popsanou cílovou molekulou *let-7* je onkogen KRAS [10]. Dalo by se tedy předpokládat, že nádorově supresorová funkce *let-7* spočívá právě v regulaci onkogenu KRAS. Při utlumení onkogenu KRAS pomocí siRNA v nádorových buňkách dojde k výraznému snížení jejich růstu, nicméně obnovení hladin *let-7* vede k mnohonásobně vyššímu protinádorovému účinku [11]. To znamená, že k dosažení tohoto efektu muselo dojít pomocí regulace dalších, v této chvíli neznámých cílových genů. Na vývoj miRNA mimics v terapii nádorových onemocnění se zaměřuje společnost Mirna Therapeutics, která využívá exkluzivní licenci společnosti Marina Biotech na SMARTICLES® lipozomální formulaci terapeutických oligonukleotidů. Mirna Therapeutics v současné době úspěšně ukončuje preklinické testování substituce nádorově supresorové *miR-34*, mezi jejíž cílové geny patří například onkogeny BCL2, MET a CDK4, navíc je transkripčně regulována nádorovým

supresorem p53 a podílí se na realizaci jím indukované buněčné smrti. *MiR-34* mimic je preklinicky testován u nemalobuněčného karcinomu plic [12], karcinomu prostaty [13] a hepatocelulárního karcinomu. U hepatocelulárního karcinomu je plánován vstup do klinického hodnocení na první čtvrtletí roku 2013. U nemalobuněčného karcinomu plic Mirna Therapeutics preklinicky testuje také *let-7* mimic.

Přestože existuje řada výzev, které je třeba v oblasti terapie cílicí miRNA řešit, například specifické doručení léku do tkáně či jeho účinné prostupování buněčnou membránou, došlo během posledních tří let v oblasti vývoje léčiv na cílených miRNA k významnému rozvoji. Byly založeny nové farmaceutické společnosti, již existující uzavíraly významné alianční dohody s velkými farmaceutickými společnostmi (Pfizer, GSK, Sanofi), které do nich investovaly významné finanční obnosy. První klinická studie fáze 2 s použitím antagonisty miRNA byla úspěšně provedena u hepatitidy typu C, další klinické hodnocení fáze 1 je plánováno na začátek roku 2013,

kdy bude testován *miR-34* mimic u pacientů s hepatocelulárním karcinomem. Problematika miRNA se tak významně posouvá od laboratorního stolu k lůžku pacienta a je potřeba ji v tomto kontextu také vnímat.

#### Literatura

- Slaby O (ed). MicroRNAs in Solid Cancer: From Biomarkers to Therapeutic Targets. New York: Nova Science Publishers 2012.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843–854.
- Slaby O, Svoboda O, Michalek J et al. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer* 2009; 8: 102.
- Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012; 4(3): 143–159.
- Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(10): 775–789.
- Bader AG, Brown D, Stoudemire J et al. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther* 2011; 18(12): 1121–1126.
- Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010; 327(5962): 198–201.
- Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 2010; 467(7311): 86–90.
- Moore LM, Zhang W. Targeting miR-21 in glioma: a small RNA with big potential. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14(11): 1247–1257.
- Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF et al. The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* 2008; 7(6): 759–764.
- Yu F, Yao H, Zhu P et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007; 131(6): 1109–1123.
- Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K et al. Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res* 2010; 70(14): 5923–5930.
- Liu C, Kelnar K, Liu B et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* 2011; 17(2): 211–215.

## Informace z České onkologické společnosti

**Zápis z schůzí výboru České onkologické společnosti konané dne 6. 3. 2012 ve Fakultní nemocnici Motol v Praze a 3. 4. 2012 na Masarykově onkologickém ústavu v Brně naleznete na [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz).**