RNA İnterferans ve Güncel Klinik Uygulamaları

RNA Interference and Current Clinical Applications: Review

Onur BENDER,[a]
Evrim ÇELEBİ,[a]
Arzu ATALAY[a]

[a]Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara

Geliş Tarihi/*Received:* 17.12.2015
Kabul Tarihi/*Accepted:* 04.03.2016

Yazışma Adresi/*Correspondence:*
Arzu ATALAY
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, TÜRKİYE/TURKEY
arzu.atalay@ankara.edu.tr

ÖZET Modern biyolojinin teknolojik devrimlerden birisi olan RNA interferans (RNAi), hem ökaryotlarda gen fonksiyonlarının analizinde önemli bir araç haline gelmiş hem de terapötik olarak gen susturulması çalışmalarında umut vaad ederek sıkça kullanılır olmuştur. Hemen hemen tüm ökaryot organizmalarda tanımlanan bu mekanizmanın önemi, 2006 Nobel Tıp ödülünün RNA interferans mekanizmasını keşifleri ile Craig Mello ve Andrew Fire'a verilmesi ile vurgulanmıştır. Hem mikroRNA'lar hem de siRNA'lar işlenmek ve fonksiyonel olmak için RNAi yolağını kullanmaktadır, böylece nihai hedef olan mRNA proteine çevrilememekte ve gen sessizleştirilmektedir. Son 15 yılda RNAi mekanizması, hücre içindeki işleyişi, stabil siRNA için modifikasyonlar ve nanotaşıyıcı sistemler ile ilgili deneyim ve bilgi birikimi sonucu, siRNA terapötikleri özellikle başka ilaç uygulanamayan bazı kanser ve diğer hastalık gruplarının tedavisi için umut veren moleküller olarak karşımıza çıkmaktadır. Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü'nün kayıtlı verilerine göre bugün itibariyle onlarca RNAi bazlı ilacın faz çalışmaları devam etmektedir. Mevcut klinik çalışmalar kanser, enfeksiyon hastalıkları, oküler hastalıklar, kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar, genetik hastalıklar ve diğer bazı hastalıklar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu hastalıklarda belirlenen hedef genlere özgü ilaçlar, özel taşıma sistemleriyle hastalara uygulanarak, ilacın hedef dokuya en yüksek verimle ulaşması ve optimal etkinliğinin sağlanması amaçlanmıştır. Sonuç olarak RNAi temelli ilaçlar, güncel klinik uygulamaları aktif olarak devam eden ve yakın gelecekte rutin olarak kullanılması beklenen etkin bir tedavi yöntemi olacaktır. Bu derlemede siRNA terapötikleri ile gerçekleştirilen mevcut klinik faz çalışmalarının bir kısmı özetlenmektedir.

Anahtar Kelimeler: RNA interferans; RNA;terapötik tedavide kullanım

ABSTRACT RNA interference (RNAi), which is one of the technological breakthroughs of modern biology not only became an important tool for gene function analysis in eucaryotes, but also being used as a promising technology for therapeutic gene silencing studies. The importance of this mechanism, which was described in almost all eukaryotic organisms, is reflected by the fact that the 2006 Nobel prize for medicine was awarded for the discovery of RNA interference by Craig Mello and Andrew Fire. Both microRNAs and siRNAs use RNAi machinery in order to be processed and being functional resulting in gene silencing via degraded or translationally repressed mRNA and no protein synthesis. During the last 15 years, a greater understanding of RNAi mechanism, the intracellular actioning, modifications for stable siRNAs and nanocarrier systems for delivery, presents siRNA therapeutics as an attractive newclass of therapeutics, especially against undruggable targets for the treatment of cancer and other diseases. According to American National Health Institute, there are many ongoing clinical trials with RNAi drugs. Current clinical studies are focused on developing therapies for the treatment of cancer, infection diseases, ocular conditions, cardiovascular and metabolic diseases, genetic diseases and a few other diseases. The drugs for the disease genes are designed in a way to reach to spesific tissue with high yield using carrier systems in order to achieve optimal efficiency. Thus, RNAi based drugs are expected to be an effective therapy system in near future, with ongoing active clinical applications. In this review, some of the ongoing clinical phase studies with siRNA therapeutics are summarized.

Key Words: RNA interference; RNA, small interfering; therapeutic use

doi: 10.5336/medsci.2015-49055

Copyright © 2016 by Türkiye Klinikleri

Turkiye Klinikleri J Med Sci 2016;36(1):53-60

İnterferans kelimesi biyoloji ve tıpta farklı alanlarda kullanıma sahiptir. Temel olarak etkileşim, girişim, müdahale anlamına gelmektedir. RNA İnterferans (RNA Interference; RNAi) fenomeninde ise küçük çift zincirli RNA'lar yardımıyla çoğunlukla hedef mRNAların ifadeleri baskılanmaktadır. 1990'lı yıllarda tanımlanmaya başlamış olan RNAi teknolojisi, insan genom projesinin çıktılarıyla da birleşince, günümüze değin başta moleküler biyoloji olmak üzere birçok temel ve uygulamalı bilimlerde kullanılan önemli bir araç konumuna gelmiştir. Bu derlemenin amacı; RNAi teknolojisinin keşfi ve sonrasındaki gelişim sürecini ele alıp, klinik uygulamalarını en güncel verilerle aktarmaktır.

NOBEL ÖDÜLLÜ MEKANİZMA RNAİ: KEŞFİ VE GELİŞİMİ

RNAi ile ilgili ilk önemli bulgular bitkiler üzerinde gözlenmiştir. 1990 yılında Napoli ve ark. *Petunia* bitkisinde, pigment oluşturan genlerin ekstra kopyalarını kullanarak transgenik bitkiler oluşturmuşlardır. Araştırmacılar çalışmaları sonucunda daha canlı ve parlak renkte çiçekler beklerken, bazı bitkiler beyaz ve alacalı renk vermiştir. Bu olayda bitkilere pigment oluşturması için verilen kalkon sentaz (Chalcone synthase; CHS) enzimi baskılanmış ve bunun sonucunda renk değişikliği gözlenmiştir.[1] Tarihte transkripsiyon sonrası gen susturma ilk kez bu çalışma ile kayıtlara geçmiştir. Daha sonra 1995 yılında bir başka çalışma *Caenorhabditis elegans* üzerinde gerçekleştirilmiştir. Guo ve Kemphues bazı endojenik genlere özgü RNA'ların anlamsız (antisens) zincirini kurtlara enjekte ederek, bu zincirlerin *C.elegans* genomunda hedef genlerle hibridize olup, translasyonu bloke etmesini amaçlamışlardır. Aynı çalışmada negatif kontrol amaçlı başka bir grup hayvana da aynı RNA'nın anlamlı (sens) zinciri enjekte edilmiştir. Elde ettikleri sonuçlarda ilginç bir şekilde anlamlı zincirin, anlamsız zincir kadar etkili olduğunu gözlemlemişlerdir.[2]

1998 yılında ise Fire ve ark. *C. elegans* üzerinde RNA'nın anlamlı ve anlamsız dizilerinin birlikte aynı hayvana yapılan enjeksiyonunda, etkinin tek bir zincire göre en az 10 kattan 100 kata kadar daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.[3] Bu çalışma çift zincirli RNA moleküllerinin birçok organizmada kullanılabileceğinin öncüsü olmuş ve bu teknolojinin gelişimi için çok önemli bir zemin hazırlamıştır. Keşiflerinden ötürü Andrew Fire ve Craig Mello 2006 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'ne layık görülmüşlerdir.[4]

Bu tarihten sonra RNAi mekanizmasını çözmek ve bunu aktif bir araç olarak kullanmak için birçok çalışma yapılmıştır. 1999 yılında Hamilton ve Baulcombe bitkilere sadece çift zincirli RNA verildiğinde 25 baz çiftlik RNA türevlerinin oluştuğunu rapor etmişlerdir.[5] 2000 yılında ise Zamore ve ark. *Drosophila* hücre ekstraktlarında çift zincirli RNA'ları oluşturan 21-23 baz çiftlik küçük RNA parçaları gözlemlemişlerdir. Bu oluşumun Dicer adlı enzim tarafından yapıldığını bulmuşlardır.[6] Aynı yıl içerisinde Hammond ve ark. bu küçük RNA'ların ribonükleazlar ile ilişkilerini keşfetmiş, RNA ve ribonükleaz bileşenine ise RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) adını vermişlerdir.[7] 2001 yılında Bernstein ve ark. Dicer enzimini *Drosophila*'dan klonlamayı başarmış ve bu çalışmaları ile sentetik olarak üretilecek RNA'ların insan hücrelerine gönderilerek, genom ebadında araştırmaların başlamasını sağlamışlardır.[8]

1990 yılından 2001 yılına kadar yapılan çalışmalarda RNAi mekanizması daha iyi anlaşılmış ve bu mekanizmada görevli yapıtaşları ortaya çıkarılmıştır. İlgili enzimlerin laboratuvar ortamında üretilir hale gelmesinin ardından, sentetik siRNA (küçük inhibe edici RNA) ve miRNA (mikroRNA)'ların memeli hücre kültürlerinde kullanılarak hedefe özgül spesifik genlerin baskılanmasına yönelik çalışmalar başarıyla gerçekleştirilmiştir.

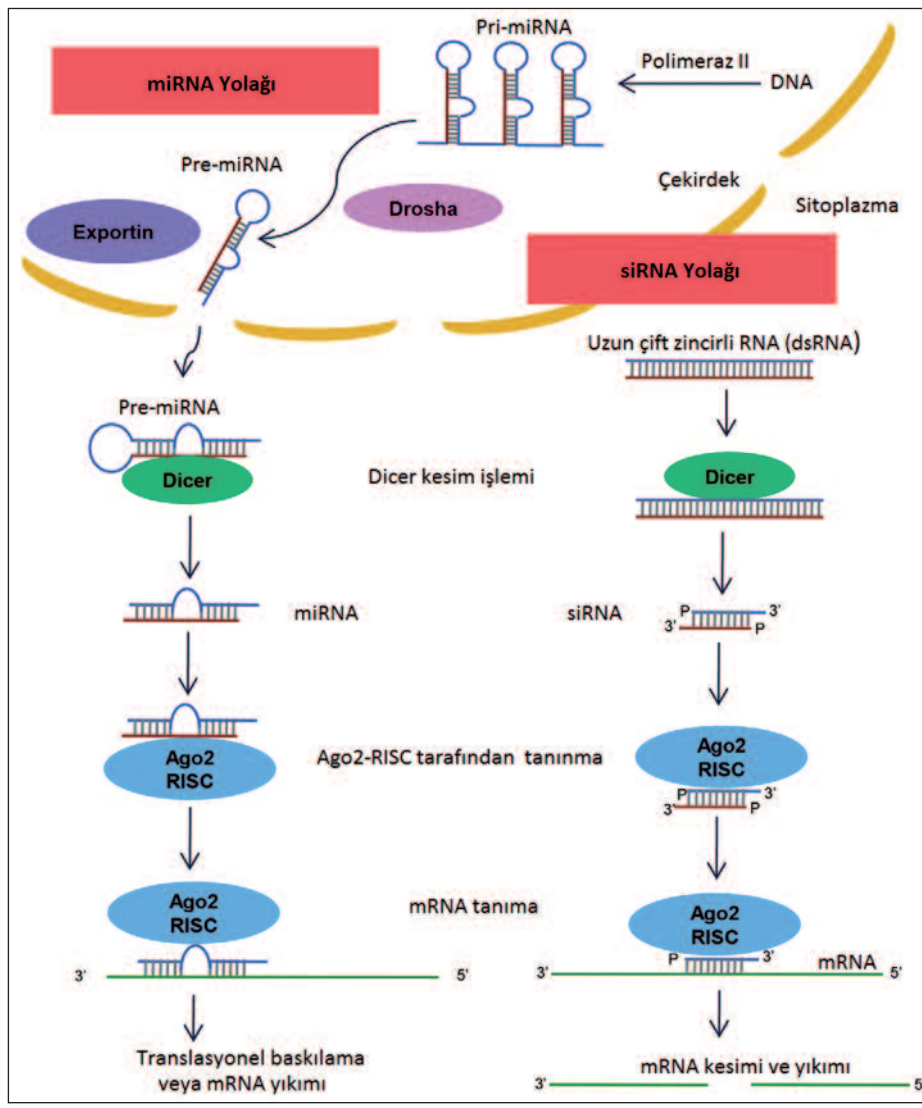
RNAi MEKANİZMASI VE BİYOGENEZİ

RNAi, hücre içinde sitoplazmada gerçekleşen ve RISC kompleksi tarafından düzenlenen bir gen susturma sürecidir. Bu mekanizma sayesinde 2 tip ve bağımsız çift zincirli küçük RNA molekülü işlenmekte ve hedeflerine yönelik etki göstermektedir. Birincisi endojen veya ekzojen kaynaklı olabilen, genellikle 21-23 baz uzunluğunda ve mRNA'nın parçalanmasını sağlayan siRNA'lardır. İkincisi ise

endojen kaynaklı olup, genellikle 22 baz uzunluğunda olan ve translasyon aşamasını baskılayan miRNA'lardır.[9-12]

RNAi mekanizmasının ilk adımı, hücre sitoplazmasında uzun çift zincirli RNA'nın Dicer enzimi tarafından 20-25 bazlık küçük RNA'lara parçalanmasıdır. Endoribonükleaz bir molekül olan Dicer, RNaz III (RNase III, Ribonuclease III) enzim ailesinin üyesidir. Dicer tarafından işlenen küçük RNA parçaları siRNA olarak adlandırılmaktadır. miRNA biyogenezi sırasındaki farklılık ise; Dicer enziminin uzun çift zincirli RNA yerine, hücre çekirdeğinde pri-miRNA formundan pre-miRNA formuna dönüşerek sitoplazmaya transfer olan bu olgunlaşmamış miRNA'yı yine 20-25 bazlık küçük çift zincirli RNA'lara dönüştürmesidir. Bu ilk aşamadan sonra RNAi mekanizması siRNA ve miRNA yolakları için benzer basamaklarla ilerlemektedir (Şekil 1).[12-16]

RNAi mekanizmasının ikinci adımı ise, Dicer enziminin işlemesiyle olgun hale gelen siRNA veya miRNA'nın RISC kompleksine aktarılmasıdır.



ŞEKİL 1: Ökaryot hücrelerde RNA interferans süreci. miRNA ve siRNA yolakları ortak protein kompleksleri ile küçük RNA'ları işlemektedir. Uzun öncül miRNA (pri-miRNA) çekirdekte Drosha tarafından kesildikten sonra pre-miRNA olarak sitoplazmaya transfer edilir. Pre-miRNA tıpkı siRNA'lar gibi sitoplazmada Dicer tarafından daha küçük çift zincirli RNA parçalarına ayrılır. Bu küçük çift zincirli RNA'lar AGO2-RISC kompleksi tarafından bağlanır ve uygun zincir hedef mesajcı RNA'ya yönlendirilir ve siRNA veya miRNA oluşuna göre mRNA yıkımı veya translasyonel baskılama gerçekleşir.[13]

(Şekil, 13 numaralı referansın sorumlu yazarından izin alınarak revize edilmiştir).

siRNA ve miRNA'ların yapısal karakteristik özellikleri RISC kompleksine bağlanmaları açısından önemlidir.[17,18] Bu yapıların RISC kompleksine bağlanmaları için bir diğer önemli faktör de Argonat (Argonaute) proteinleridir. Bu proteinler hem mRNA yıkımı için hassas bir katalitik bölge teşkil ederken, aynı zamanda substrat seçiminde görevlidirler.[19,20] RISC kompleksine bağlanan siRNA veya miRNA'lar, komplementeri oldukları hedef mRNA'ya bağlanıp mRNA'nın yıkılmasını veya translasyonel olarak baskılanmasını sağlarlar. Bu noktada siRNA'lar mRNA'ya mükemmel komplementerite ile bağlandıklarından, hedef mRNA'yı tamamen yıkarak genin ifadesinin susturulmasını sağlarlar.[21]

RNAi TEKNOLOJİSİNİN GÜNCEL KLİNİK UYGULAMALARINA ÖRNEKLER

RNAi teknolojisinin keşfedilmesi ve hemen sonrasında hedefe özgü siRNA ve miRNA dizilerinin sentetik olarak elde edilebilmesi temel bilim çalışmalarında farklı bir pencere açmıştır. Bu araçlar ile öncelikle fonksiyonel analizler yapılmış, bu analizler sonucunda genlerin moleküler seviyedeki etki mekanizmaları öğrenilebilmiştir.[22,23] RNAi temelli çalışmaların multidisipliner olarak kullanılması, bu teknolojinin gelişimi ve kullanılabilirliğini üst seviyelere çıkarmıştır.

RNAi teknolojisinin sağladığı en önemli faydalardan biri de hastalıklara terapötik yaklaşımların geliştirilmesi olmuştur. Böylece, bu teknolojinin klinikte kullanımı için de çalışmalar başlatılmıştır.

RNAi, tedavi amaçlı olarak ilk kez kronik miyeloid lösemi hastalığında kullanılmıştır. 22. kromozomda meydana gelen bir translokasyon sonucu normalden fazla aktive olan Bcr-Abl proteini siRNA yardımıyla baskılanarak tedavi yoluna gidilmiştir.[24]

İlerleyen süreçte RNAi uygulamaları başta kanser moleküler biyolojisi ve temel onkoloji çalışmalarında olmak üzere, göz hastalıklarında, dahili sistem hastalıklarında, HIV, hepatit gibi enfeksiyon hastalıklarında ve genetik hastalıklarda test edilmiştir.[25-29]

Yapılan çalışmalarda elde edilen pozitif bulguların ardından RNAi temelli terapötiklerle klinik faz çalışmaları başlatılmıştır. 2004 yılında Acuity Pharmaceuticals isimli şirket yaşa bağlı makula dejenerasyonu hastalığına özgü siRNA ilacı için birinci faz klinik denemelerini başlatmıştır.[30] İlaç geliştirme sürecindeki faz çalışmaları 4 ana evreye ayrılmaktadır. Bu basamakların amaçları ise faz I'de güvenilirlik araştırmaları, faz II'de etkinlik ve güvenilirlik, faz III'te etkinliğin kanıtlanması ve yan etkilerin belirlenmesi, faz IV'te ise uzun süreli güvenilirlik verilerinin toplanmasıdır.[31,32]

Günümüz itibariyle (Aralık 2015), farklı hastalık gruplarında büyük çoğunluğu siRNA olmak üzere, siRNA ve miRNA terapötikleri için klinik faz çalışmaları devam etmektedir. Programlar hakkındaki tüm gelişmeler Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü'ne bağlı www.clinicaltrials.gov adresinde yayınlanmaktadır ve siRNA faz klinik çalışmaları hakkındaki detaylı veriler güncellenerek özetlenmiştir (Tablo 1).[33] Mevcut faz çalışmaları kanser, enfeksiyon hastalıkları, oküler hastalıklar, kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar, genetik hastalıklar ve diğer hastalıklar şeklinde gruplandırılmıştır. Her bir ilaç için hedeflenen gen, mevcut faz durumu, ilacı verme yolu, hedef dokuya ulaştırma sistemi ve klinik çalışma (trial ID) nu marası yer almaktadır (Tablo 1). Bu numara ile clinicaltrials.gov adresinden istenilen çalışmaya ait tüm veriler görüntülenebilmektedir.

miRNA aracılı klinik faz çalışmalarının ilki 2013 yılında başlamıştır. Mirna Therapeutics isimli şirketin, primer karaciğer kanseri ve metastazı ile ilgili miR-34a odaklı çalışması faz I evresinde devam etmektedir (İsim: MRX34, Trial ID: NCT01829971). Bir diğer çalışma ise 2015 yılının başlarında Sydney Üniversitesi'nde başlatılmıştır. miR-16 mimik kullanarak malign plevral mezotelyoma ve küçük-hücreli olmayan akciğer kanseri üzerine çalışmalar faz I evresinde devam etmektedir (İsim: TargomiRs, Trial ID: NCT02369198).[33]

2004 yılından günümüze kadarki süreçte, yaklaşık 30 farklı siRNA ve 2 farklı miRNA ilacın klinik faz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Farklı hastalık grupları üzerinde devam eden klinik çalış-

TABLO 1: Klinik denemeleri devam eden siRNA terapötikleri.

siRNA Terapötik İsmi	Endikasyonlar	siRNA Hedefi	Faz	Taşıma Sistemi	İlaç Uygulama Yolu	Trial ID	Şirket / Merkez
Kanser							
ALN-VSP02	İlerlemiş solid tümör (karaciğer)	KSP ve VEGF	1, tamamlandı 1, tamamlandı	Lipit nanopartiküller	Damar içi	NCT01158079; NCT00882180	Alnylam Pharmaceuticals Alnylam Pharmaceuticals
Atu027	İlerlemiş solid tümör Pankreatik duktal karsinoma	PKN3	1, tamamlandı 1/2,devam ediyor	Lipozomal partiküller (AtuPLEX®)	Damar içi	NCT00938574 NCT01808638	Silence Therapeutics GmbH Silence Therapeutics GmbH
CALAA-01	Solid tümör	RRM2	1, sonlandırıldı	Polimer temelli hedef nanopartiküller	Damar içi	NCT00689065	Calando Pharmaceuticals
DCR-MYC (Dicer substrat siRNA)	Solid tümör, multipl miyelom, non Hodgkin lenfoma Hepatosellüler karsinom	MYC onkogen	1,devam ediyor 1/2,devam ediyor	Lipit nanopartiküller (EnCore)	Damar içi	NCT02110563 NCT02314052	Dicerna Pharmaceuticals, Inc. Dicerna Pharmaceuticals, Inc.
siG12D LODER	İleri evre pankreatik kanser	Mutant KRAS onkogen	1, tamamlandı; 2,devam ediyor	Biyobozunur polimer temelli iskelet	Lokal implantasyon	NCT01188785; NCT01676259	Silenseed Ltd Silenseed Ltd
siRNA-EphA2-DOPC	İleri evre kanser	EphA2	1,devam ediyor	Nötral lipozomlar	Damar içi	NCT01591356	M.D. Anderson Cancer Center
TKM-080301 (TKM-PLK1)	Primer veya sekonder karaciğer kanseri Nöroendokrin tümör ve adrenokortikal karsinoma	PLK1	1, tamamlandı 1/2 tamamlandı	Lipid nanopartiküller	Damar içi	NCT01437007 NCT01262235	National Cancer Institute (NCI) Arbutus Biopharma Corporation
Enfeksiyon Hastalıkları							
ALN-RSV01	RSV enfeksiyonu Akciğer transplantasyonunda RSV enfeksiyonu	RSV Nükleokapsit	2, tamamlandı 2,tamamlandı	Drekt uygulama	Burun içi Nebulizasyon	NCT00496821 NCT00658086; NCT011065935	Alnylam Pharmaceuticals Alnylam Pharmaceuticals
ARC-520	Kronik HBV enfeksiyonu	HBV'nin korunmuş bölgeleri	1, tamamlandı; 2,devam ediyor	DPC (Kolesterol konjüge siRNA taşıyan membran litik peptitler)	Damar içi	NCT01872065; NCT02065336; NCT02349126	Arrowhead Research Corp. Arrowhead Research Corp. Arrowhead Research Corp.
TKM-100201 TKM-100802	Ebola virüs enfeksiyonu	Ebola L Polimeraz, VP24 ve VP25	1, sonlandırıldı 1,devam ediyor	Lipit nanopartikülleri	Damar içi	NCT01518881 NCT02041715	Arbutus Biopharma Corp. Arbutus Biopharma Corp.
Oküler Hastalıklar							
AGN211745 (Sirna-027)	CNV, AMD	VEGF reseptör 1	1/2,tamamlandı; II, sonlandırıldı	Drekt uygulama	Göz içi	NCT00363714; NCT00395057	Allergan Allergan
Bamosiran (SYL040012)	Göz hipertansiyonu, Glokom Göz hipertansiyonu, Açık açılı glokom	ADRB2	1, tamamlandı; 1/2,tamamlandı 2, tamamlandı; 2,devam ediyor	Drekt uygulama	Topikal oküler	NCT00990743; NCT01227291 NCT01739244; NCT02250612	Sylentis, S.A Sylentis, S.A Sylentis, S.A Sylentis, S.A
Bevasiranib (Cand5)	Islak AMD Diyabetik maküler ödem VEGF Islak AMD AMD	VEGF	2, tamamlandı 3, sonlandırıldı 3, geri çekildi	Drekt uygulama	Göz içi	NCT00722384; NCT00259753 NCT00306904 NCT00499590 NCT00557791	OPKO Health,Inc. OPKO Health,Inc. OPKO Health,Inc. OPKO Health,Inc. OPKO Health, Inc.
PF-04523655	AMD	RTP801	1,2 tamamlandı	Drekt uygulama	Göz içi	NCT00725686	Quark Pharmaceuticals

devamı →

TABLO 1: *devamı.*

(PF-655)	CNV, diyabetik retinopati, Diyabetik maküler ödem Diyabetik retinopati, Diyabetik komplikasyonlar	(hypoxia-inducible factor 1 responsive gene)	2, tamamlandı 2, sonlandırıldı			NCT00713518 NCT01445899 NCT00701181	Quark Pharmaceuticals Quark Pharmaceuticals Quark Pharmaceuticals
QPI-1007	Optik atrofi, non arteritik iskemik optik nöropati	CASP2	1, tamamlandı	Drekt uygulama	Göz içi	NCT01064505	Quark Pharmaceuticals
SYL1001	Göz ağrısı, kuru göz sendromu	Kapsaisin reseptörü	1, tamamlandı; 1/2,tamamlandı	Drekt uygulama	Topikal oküler	NCT01438281; NCT01776658	Sylentis, S.A Sylentis, S.A
Kardiyovasküler ve Metabolik Hastalıklar							
ALN-PCS02	Hiperkolesterolemi	PCSK9	1, tamamlandı	Lipit nanopartikülleri	Damar içi	NCT01437059	Alnylam Pharmaceuticals
ALN-PCSsc	Hiperkolesterolemi		1, devam ediyor	GalNAc-siRNA konjugasyonu	Deri altı	NCT02314442	Alnylam Pharmaceuticals
PRO-040201 (TKM-ApoB)	Hiperkolesterolemi	ApoB	1, sonlandırıldı	Lipit nanopartikülleri	Damar içi	NCT00927459	Arbutus Biopharma Corp.
Genetik Hastalıklar							
ALN-AT3sc	Hemofili A ve B	AT komplement Bileşen C5	1, devam ediyor	GalNAc-siRNA konjügatı	Deri altı	NCT02035605	Alnylam Pharmaceuticals
ALNCC5	PNH	AT komplement Bileşen C5	1/2, devam ediyor	GalNAc-siRNA konjügatı	Deri altı	NCT02352493	Alnylam Pharmaceuticals
ALN-TTR01	TTR aracılı amiloidoz (FAP)	TTR	1, tamamlandı	Lipit nanopartikülleri	Damar içi	NCT01148953	Alnylam Pharmaceuticals
Patisiran (ALN-TTR02)	TTR aracılı amiloidoz (FAP)	TTR	1,2 tamamlandı 2, tamamlandı 1, tamamlandı 2, devam ediyor 3,devam ediyor	Lipit nanopartikülleri	Damar içi	NCT01559077 NCT01617967; NCT02053454 NCT01961921; NCT01960348	Alnylam Pharmaceuticals Alnylam Pharmaceuticals Alnylam Pharmaceuticals Alnylam Pharmaceuticals Alnylam Pharmaceuticals
Revusiran (ALN-TTRsc)	TTR aracılı amiloidoz (FAC)	TTR	2, tamamlandı 1,devam ediyor 2,devam ediyor 3,devam ediyor	GalNAc-siRNA konjügatı	Deri altı	NCT01981837 NCT01814839; NCT02292186; NCT02319005	Alnylam Pharmaceuticals Alnylam Pharmaceuticals Alnylam Pharmaceuticals Alnylam Pharmaceuticals
TD101	Pakionişi konjenita	Keratin 6a (N171k mutantı)	1, tamamlandı	Drekt uygulama	Deri altı	NCT00716014	Alnylam Pharmaceuticals
Diğer Hastalıklar							
ND-L02-s0201	Hepatik fibroz	HSP47	1, tamamlandı; 1/2,devam ediyor	Vitamin A bağlı lipozomlar	Damar içi	NCT01858935; NCT02227459	Nitto Denko Corporation Nitto Denko Corporation
QPI-1002 (I5NP)	Akut böbrek yetmezliği, böbrek hasarı Böbrek nakli sırasında doku reddinin geciktirilmesi	p53	1, tamamlandı; 1, sonlandırıldı 1,2, tamamlandı	Drekt uygulama	Damar içi	NCT00554359; NCT00683553 NCT00802347	Quark Pharmaceuticals Quark Pharmaceuticals Quark Pharmaceuticals

Çalışmalar clinicaltrials.gov sitesinden Aralık 2015 itibarı ile güncellenmiştir.

ADRV: β-2 andrenerjik reseptör; AMD: Yaşa bağlı makula dejenerasyonu; ApoB: Apolipoprotein B; AT: Antitrombin; CASP2: Kaspaz-2; CNV: Koroidal nörovaskülarizasyon; DPC: Dinamik polikonjügat; EphA2: Efrin tip-A reseptör 2; FAC: Ailesel amiloid kardiyomiyopati; FAP: Ailesel amiloid polinöropati; GalNac: N, asetilgalaktozamin; HBV: Hepatit B virüsü; HSP47: Isı şoku proteini 47; KRAS: Kirsten rat sarkoma viral onkogen homolog; KSP: Kinezin iğ proteini; LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein; MYC: v-myc avian miyelositomatoz viral onkogen homologu; PCSK9: Proprotein konvertaz subtilisin/keksin tip 9; PKN3: Protein kinaz N3; PLK1: Polo benzeri kinaz 1; PNH: Paroksimal nokturnal hemoglobinüri; RRM2: Ribonükleotit reduktaz altünite M2; RSV: Respiratuvar sinsitiyal virüs; TTR: Transtiretin; VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü; VP: Viral protein.

maların dağılımı incelendiğinde, en büyük payı %31 ile kanser hastalığı üzerindeki çalışmalar almaktadır. Bunu sırası ile göz hastalıkları (%21) ve genetik hastalıklar (%21), enfeksiyon hastalıkları (%10), kardiyovasküler/metabolik hastalıklar (%10) ve diğer hastalıklar (%7) takip etmektedir.[33] RNAi teknolojisinin kullanışlı, uygulanabilir ve pratik oluşu, bu kadar farklı hastalıklarda uygulanabilmesine imkan sağlamıştır. siRNA terapötikleri özellikle başka ilaç uygulanamayan bazı kanser ve diğer hastalık grupları için umut veren moleküller olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak siRNA terapötiklerinin uygulamasında pek çok zorlukla karşılaşılabilinmektedir; siRNA'lar hızla yıkılabilirler ya da hedef organa/hücre içine taşınım beklenen etkinlikte gerçekleşmeyebilir, ayrıca hedef mRNA dışı bağlanmalar meydana çıkabilir.[13] Literatürde "off-target effects" olarak geçen hedef dışı bağlanmalar; spesifik bir hedefe özgül tasarlanan siRNA dizisinin farklı bir mRNA'ya bağlanması ve hedeflenmeyen genin ifadesinin baskılanmasıdır. Hedef dışı bağlanmaların önüne geçebilmek için, siRNA tasarımlarının doğru ve kontrollü yapılması ve uygulama esnasında uygun doz-zaman aralığının da en optimal düzeyde seçilmesi gereklidir.[34] Son zamanlarda kullanımı yaygınlaşan ve yüksek verimde çalışan 'siRNA havuz'larının da hedefe spesifik bağlanma konusunda başarılı olduğu bildirilmiştir.[35]

Tedavide hedef dokuya, doğru bir şekilde ulaşan siRNA'nın verimlilik düzeyi de önemli kriterlerin arasında gelmektedir. *In vitro* ortamda bile, özellikle primer hücre kültürü çalışmalarında susturma verimi düşük olabilmektedir. Bu aşamadaki başarı, siRNA molekülünün hücre içine ne kadar efektif girebildiği ile doğru orantılıdır ve bu durumda verim de o kadar yüksek olacaktır. Bunun için de öncelikle doğru tasarımdan emin olunmalı ve etkin bir gönderim/taşınım yöntemi belirlenmelidir.[36-38]

siRNA hedef dokuya yönlendirildiğinde pek çok aşamada farklı zorluklarla karşılaşılabilinmektedir. Bu zorluklardan başlıcası siRNA molekülünün degradasyonu ile birlikte yarı ömrünün azalmasıdır. Bu bakımdan terapötik siRNA'ların nükleaz degradasyonundan etkilenmeden hedef dokuya ulaşması için çeşitli kimyasal modifikasyonlar uygulanmaktadır.[13,39] Etkili bir gönderim yöntemi, hem siRNA dizilerini nükleaz aktivitesinden korumalı hem de siRNA üzerinde kimyasal modifikasyonlara duyulan ihtiyacı azaltmalıdır. Mevcut klinik faz çalışmalarında kullanılan lipit, polimer ve lipozomal temelli nanopartiküller ve çıplak siRNA şeklinde gönderim yöntemleri bulunmaktadır (Tablo 1). Bunların kullanımı hedef dokunun lokalizasyonu ve hastalığın patogenezine göre değişiklik gösterebilmektedir. Bu aynı zamanda klinik sürecin dizaynına da bağlıdır.[33] siRNA temelli tedavideki en büyük zorluklardan birisi sistemik taşınımla hedefe ulaşım olduğundan, son yıllarda siRNAların kimyasal modifikasyonu, biyoaktif moleküllere siRNA konjugasyonu ve taşınım formulasyonları ile ilgili çalışmalar yoğun şekilde devam etmektedir.[40-45]

RNAi temelli tedavi yöntemlerinde immün cevap ve toksisite de bir başka problemdir. RNAi mekanizması, vücudu istenmeyen patojenlerden korumak için yer alan doğuştan bir immün cevap sistemidir. siRNA'ları tedavi amaçlı kullanırken ise organizmanın herhangi bir immün yanıt oluşturmaması gereklidir. Ayrıca kullanılan siRNA'ların vücutta toksik etki yaratmaması da şarttır.[13,46]

SONUÇ

RNAi teknolojisi son on beş yılda moleküler biyolojinin en değerli araçlarından biri haline gelmiş, bugün ise birçok alanda uygulaması devam etmekte olan bir yöntem olmuştur. Bu derlemede de RNAi teknolojisinin çeşitli hastalıklardaki terapötik kullanımı için geliştirilen klinik uygulamalar en güncel verilerle özetlenmiş, aynı zamanda uygulamalar esnasında karşılaşılabilinecek zorluklara değinilmiştir. siRNA terapötikleri kullanılarak başta kanser olmak üzere birçok hastalık grubunda tanı ve tedaviye yönelik çalışmalar devam etmektedir. Yapılan klinik faz çalışmalarının sayısı her geçen yıl artmakla birlikte yakın gelecekte RNAi ilaçlarının klinikte rutin olarak kullanılması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell 1990;2(4):279-89.
2. Guo S, Kemphues KJ. Par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell 1995; 81(4):611-20.
3. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 1998;391 (6669):806-11.
4. Mello CC. Return to the RNAi world: rethinking gene expression and evolution (Nobel Lecture). Angew Chem Int Ed Engl 2007; 46(37):6985-94.
5. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 1999; 286(5441):950-2.
6. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 2000;101(1):25-33.
7. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature 2000;404(6775):293-6.
8. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 2001;409(6818):363-6.
9. Zamore PD. RNA interference: big applause for silencing in Stockholm. Cell 2006;127(6): 1083-6.
10. Hannon GJ. RNA interference. Nature 2002; 418(6894):244-51.
11. Zamore PD. RNA interference: listening to the sound of silence. Nat Struct Biol 2001; 8(9):746-50.
12. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. Genomics Proteomics Bioinformatics 2009;7(4):147-54.
13. Ozcan G, Ozpolat B, Coleman RL, Sood AK, Lopez-Berestein G. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. Adv Drug Deliv Rev 2015;87:108-19.
14. Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. Genes Dev 2005;19(5):517-29.
15. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans. Genes Dev 2001;15(20):2654-9.
16. Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. Nat Biotechnol 2005;23(2):222-6.
17. Preall JB, Sontheimer EJ. RNAi: RISC gets loaded. Cell 2005;123(4):543-5.
18. Filipowicz W. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. Cell 2005;122(1):17-20.
19. Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. Nat Rev Mol Cell Biol 2008;9(1):22-32.
20. Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. Cell 2005; 123(4):621-9.
21. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. Microbiol Mol Biol Rev 2003; 67(4):657-85.
22. Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. Methods 2002;26(2):199-213.
23. Kim JK, Gabel HW, Kamath RS, Tewari M, Pasquinelli A, Rual JF, et al. Functional genomic analysis of RNA interference in C. elegans. Science 2005;308(5725):1164-7.
24. Scherr M, Battmer K, Winkler T, Heidenreich O, Ganser A, Eder M. Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. Blood 2003;101(4):1566-9.
25. Kumar P, Ban HS, Kim SS, Wu H, Pearson T, Greiner DL, et al. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. Cell 2008;134(4):577-86.
26. Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. Gene Ther 2006;13(6): 464-77.
27. Campochiaro PA. Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. Gene Ther 2006;13(6):559-62.
28. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. Nat Rev Genet 2007;8(3):173-84.
29. Devi GR. siRNA-based approaches in cancer therapy. Cancer Gene Ther 2006;13(9):819-29.
30. de Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. Nat Rev Drug Discov 2007;6(6):443-53.
31. DiMasi JA. The value of improving the productivity of the drug development process: faster times and better decisions. Pharmacoeconomics 2002;20(Suppl 3):1-10.
32. İskit AB. [Clinical drug research]. Hacettepe Tıp Dergisi 2006;37:78-83.