



## Wykorzystanie interferencji RNA do opracowywania nowych terapii przeciwnowotworowych

Bożena Kamińska<sup>1,2</sup>, Dorota Kulesza<sup>1,2</sup>, Paweł Wiśniewski<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Regulacji Transkrypcji, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk

<sup>2</sup>Studium Medycyny Molekularnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>3</sup>Zakład Biologii Molekularnej, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

### RNA interference-based therapeutics in anticancer therapy

#### Summary

RNA interference (RNAi) is a phenomenon of sequence-specific gene silencing and its discovery led to wide applications. Short interfering RNA (siRNA), which induces RNAi, has been experimentally introduced as a cancer therapy and is expected to be developed as a nucleic acid-based medicine. Potential success of siRNA cancer therapies depends on selection of appropriate gene targets and candidate targets include genes associated with cell proliferation, metastasis, angiogenesis, and drug resistance. *In vivo* systemic delivery of siRNA-based therapeutics to tumour tissues is challenging and the major limitations of siRNA therapeutic use are its degradation by serum nucleases, poor cellular uptake and rapid renal clearance following systemic administration. Several siRNA-based therapeutics are already in clinical trials. Further development of anti-cancer therapeutic siRNAs depends on development of nanocarriers, nuclease-resistant chemically modified siRNAs and variety of synthetic or natural lipids and polymers to systemically deliver siRNA. Here, we review potential approaches for delivery of RNAi based therapeutic in cancer therapy, results of current studies and clinical trials which demonstrate that the use of targeted siRNA offers promising strategies for cancer therapies.

#### Adres do korespondencji

Bożena Kamińska,  
Pracownia Regulacji  
Transkrypcji,  
Instytut Biologii  
Doświadczalnej PAN  
im. M. Nenckiego,  
ul. Pasteura 3,  
02-093 Warszawa;  
e-mail:  
bozenakk@nencki.gov.pl

#### biotechnologia

3 (90) 94–114 2010

#### Key words:

RNA interference, cancer therapy, siRNA.

## 1. Wprowadzenie

Kiedy w 1998 r. ukazała się w „Nature” publikacja Andrew Fire’a i wsp. (1), żaden z nich nie przypuszczał zapewne, że opisane przez nich zjawisko interferencji RNA jest uniwersalne i doprowadzi do powstania niezwykle skutecznych narzędzi do modulowania ekspresji genów *in vitro* i *in vivo*. W latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku bardzo popularne było wykorzystanie antysensowych RNA do modulowania ekspresji genów i powszechnie uważano, że jest to wynikiem działania prostego mechanizmu wynikającego z hybrydyzacji między wprowadzonym antysensowym RNA i endogennym mRNA, prowadzącego do degradacji przez RNazy, blokowania obróbki transkrypty lub blokowania translacji mRNA. Fire’a i wsp. wprowadzając jedno- lub dwuniciowe (ds) antysensowe RNA do komórek nicienia *Caenorhabditis elegans* pokazali, że dsRNA było bardziej efektywne niż jednoniciowe RNA w blokowaniu transkrypcji genów (1). Wielka intuicja autorów polegała jednakże nie tylko na stwierdzeniu, że kilka cząsteczek dwuniciowego RNA na komórkę wystarczy, aby specyficznie interferować z ekspresją genów. Autorzy zaproponowali, że u podłoża procesu musi istnieć mechanizm katalityczny lub odpowiadający za zwielokrotnienie zjawiska wyciszania ekspresji genów. Słuszności ich tezy dowiedziono wkrótce w badaniach innych zespołów dokumentujących występowanie zjawiska interferencji RNA i obecności 25 nt RNA komplementarnych zarówno do mRNA jak i antysensowego RNA w komórkach roślin (2) i 21-23 nt RNA komplementarnych do mRNA w komórkach owadów *Drosophila melanogaster* (3-6), komórkach ssaczyc (7) i roślinnych (8).

Zjawisko i mechanizm molekularny interferencji RNA były przedmiotem licznych badań i publikacji. Wysoka wydajność i specyficzność wyciszania poprzez mechanizm interferencji zależnej od RNA (RNAi) przyspieszyły rozwój badań tego zjawiska i doprowadziły do dobrego poznania mechanizmów komórkowych leżących u podstaw tego procesu (8). Pierwsze wyniki dotyczące „maszyny komórkowej” odpowiedzialnej za zjawisko RNAi pochodziły z badań nad organizmem modelowym *Drosophila melanogaster* i wskazywały, że RNAi jest inicjowane przez długie fragmenty dwuniciowego RNA (dsRNA), które ulega pofragmentowaniu przez enzym zwany Dicer. Dicer ma dwie domeny o aktywności RNazy III oraz domeny: wiążącą dwuniciowe RNA, helikazową oraz PAZ – odpowiedzialną za interakcje z innymi białkami. Dicer degraduje długie fragmenty dwuniciowego RNA do krótkich, 21-nukleotydowych fragmentów zawierających 19 sparowanych nukleotydów i 2 wolne nukleotydy na końcach 3’. Powstałe 21-nukleotydowe, dwuniciowe RNA nazywane są siRNA (ang. *short interfering RNA*) (9,10).

Dwuniciowe siRNA asocjują z kompleksem białek zwanym RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*), który jest dużym kompleksem (160 kDa) o złożonej aktywności enzymatycznej wykazującym aktywność helikazy oraz endo- i egzonukleazy. Centrum katalityczne kompleksu stanowią białka Argonaute (Ago) zawierające domeny: PAZ (ang. *Piwi/Argonaute/Zwille*) rozpoznającą 3’ koniec RNA i PIWI (ang. *P-ele-*



ment *Induced Wimpy Testis*) o aktywności endonukleolitycznej (10). Białka TRBP (ang. *TAR RNA Binding Protein*) i PACT (ang. *Protein Activator of Protein Kinase PKR*) ułatwiają przekazanie siRNA do kompleksu białka Ago2 i RISC (11-13).

W obrębie kompleksu RISC siRNA jest rozwijane, RISC wiąże preferencyjnie nić wiodącą (ang. *guide strand*), a nić towarzysząca (ang. *passenger strand*) jest degradowana przez nukleazy. Związany z kompleksem RISC, jednoniciowy, antysensowy RNA rozpoznaje komplementarne sekwencje w mRNA, hybryduje z nim, co umożliwia degradację rozpoznanego RNA przez endonukleazy wchodzące w skład RISC. Cięcie dupleksów mRNA/siRNA następuje pomiędzy nukleotydem 10 i 11 od końca 5' nici antysensowej, a w dalszej degradacji uczestniczą egzonukleazy. Zjawisko to prowadzi do transkrypcyjnego wyciszenia ekspresji genów docelowych.

W komórkach eukariotycznych procesy RNAi zaangażowane są także w obróbkę i dojrzewanie mikro RNA. mikro RNA to jednoniciowe cząsteczki RNA o długości ok. 21-23 nukleotydów należące do grupy niekodujących kwasów rybonukleinowych tzw. ncRNA (ang. *non-coding RNA*) (14). Podobnie jak normalne geny miRNA są kodowane przez genom komórki. Obecnie u człowieka znanych jest >800 miRNA, a kodujące je geny stanowią >3% wszystkich genów. Pierwotne transkrypty miRNA zawierają złożone struktury drugorzędowe zwane (ang. *hairpin* czyli „szpilki do włosów”) i są przecinane do prekursorowych miRNA o dług. 70 pz przez jądrową nukleazę III Drosha (u zwierząt) lub DCL1 (u roślin). Pre-miRNA są transportowane do cytoplazmy przez białko Eksporyna-5 (Exp5) i procesowane do dojrzałego miRNA o długości od 18 do 24 nukleotydów przez Dicer (8,15). W odróżnieniu od siRNA, miRNA nie wykazują 100% identyczności sekwencji do docelowego mRNA. Jeśli dwuniciowy RNA ma sekwencję nie dopasowaną perfekcyjnie (w przypadku miRNA) wykorzystywany jest mechanizm obejmujący rozplecenie dupleksu przez helikazę. Powstaje wtedy dojrzały miRNA aktywujący RISC. W przeciwieństwie do siRNAs i roślinnych miRNA, które indukują cięcie docelowego, specyficznego mRNA, większość miRNA zwierząt nie ma perfekcyjnej homologii z docelowym mRNA i hamuje translację poprzez mechanizm zależny od RISC i rozpoznawania cap mRNA. Zjawisko to występuje w cytoplazmie w ciałkach P (ang. *processing bodies*), które zawierają mRNA nie ulegające translacji i są miejscem jego degradacji (16).

W komórkach ssaków oprócz transkrypcyjnego wyciszenia ekspresji genów występuje także zjawisko potranskrypcyjnego wyciszenia ekspresji genów. Kompleksy siRNA-Ago2 wraz z TRBP2 (DNA metyltransferaza) i metyltransferazą histonów EZH2 (z rodziny Polycomb) są rekrutowane do promotorów genów docelowych siRNA. Przeprowadzają metylację DNA *de novo* lub metylację lizyny 9 i 27 histonu H3, co powoduje trwałe modyfikacje chromatyny (17,18).



## 2. Jak zaplanować dobre si/shRNA?

### 2.1. Zasady projektowania si/shRNA

Najbardziej powszechnym zastosowaniem RNAi jest specyficzne wyciszenie ekspresji wybranego genu. Jednakże projektowanie siRNA nie jest proste tym bardziej, że struktura przestrzenna i ufałdowanie docelowego mRNA lub jego oddziaływanie z innymi białkami mogą ograniczać dostęp i wiązanie kompleksu RISC do mRNA. Rekomendowane i powszechnie stosowane są zasady projektowania siRNA opracowane przez grupę Thomasa Tuschla (<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>) (19). Zasady projektowania si/shRNA z uwzględnieniem reguł Tuschla są stosunkowo proste:

- Zaczyna się od sekwencji AUG kodonu start i wyszukuje sekwencje AA i 19 sąsiadujących nukleotydów jako potencjalne miejsce rozpoznawane przez siRNA.
- Wybiera się 3-4 sekwencje docelowe najlepiej znajdujące się w różnych częściach mRNA, bo nie wiadomo, które okażą się najbardziej wrażliwe na degradację.
- Zawartość G/C nie powinna przekroczyć ~30-50%.
- Przeszukuje się wybrane bazy genów pod kątem podobieństwa z wybraną sekwencją i odrzuca wszystkie sekwencje o znaczącej homologii z innymi genami.
- Należy unikać sekwencji 5'-GUCCUCAA-3' i 5'-UGUGU-3', ponieważ te motywy mają silne działanie immunostymulujące i indukują odpowiedź interferonową.
- shRNA syntetyzowane z zintegrowanego wektora lentiwirusowego nie wywołuje efektu ubocznego tak jak egzogenne siRNA, gdyż nie wchodzi do endosomów.
- Nie można dopuścić do wysycenia endogennego mechanizmu wyciszającego (np. hamowanie Eksportyny 5 i eksportu endogennego miRNA jest toksyczne dla komórki). Dlatego lepszy jest słabszy promotor H1 niż silniejszy U6.

Istnieje kilka ogólnodostępnych serwisów internetowych w instytucjach akademickich lub komercyjnych, które oferują narzędzia do projektowania siRNA (URL: <http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi/html/rnai.html>, Cold Spring Harbor Laboratories; <http://hydra1.wistar.upenn.edu/Projects/siRNA/siRNAindex.htm>, Wistar Institute; <http://jura.wi.mit.edu/siRNAext>, Whitehead Institute; [http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html), Ambion; <http://design.dharmacon.com/> Dharmacon; <https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/> Invitrogen).

Jednakże należy zaznaczyć, że posługiwanie się teoretycznymi kryteriami projektowania efektywnie działających siRNA nie zapewnia ich efektywnego działania (20). Szereg bardzo efektywnie działających siRNA tylko częściowo spełnia kryteria zasad projektowania siRNA i odwrotnie, teoretycznie optymalne cząsteczki siRNA mogą wykazywać się ograniczoną efektywnością wyciszania. Zatem optymalny wybór cząsteczki siRNA wymaga doświadczalnego porównania efektywności wyciszania przez kilka zaprojektowanych cząsteczek-kandydatów.



Wkrótce skonstruowano wektory zawierające kasety DNA umożliwiające tworzenie w komórce krótkich RNA o strukturze spinki do włosów (shRNA, ang. *short hairpins*) lub transkrypcję przez polimerazę III 21-nukleotydowych nici sensowej i antysensowej tworzących w komórce dwuniciowe RNA. Minimalny wektor do ekspresji shRNA zawiera promotor dla polimerazy III, po którym następuje 19 nukleotydów odpowiadających sekwencji docelowej, linker o długości 4-10, 19-nukleotydową sekwencję antysensową zakończoną 4-6 urydynami oraz adaptory do klonowania do plazmidu. System może też zawierać dwa promotory umożliwiające transkrypcje 2 oddzielnych nici RNA. W celu lepszej modulacji procesu wyciszania stosuje się promotory indukowalne (np. tetracykliną) lub system indukowalnej ekspresji Cre-loxP.

Podobnie jak w przypadku siRNA, plazmidy kodujące shRNA nie przechodzą łatwo przez błony komórkowe i wymagają stosowania substancji ułatwiających przenikanie do komórek. Dlatego też stosowane są wektory wirusowe, najczęściej adenowirusowe lub pochodne AAV (ang. *Adeno-Associated Virus*). Coraz częściej do wprowadzania do komórek DNA stosuje się wektory retrowirusowe, które pozwalają na trwałe zmiany ekspresji, gdyż integrują się chromosomalnym DNA gospodarza. Wektory te bazują na wirusie białaczki (MLV, ang. *Murine Leukemia Virus*) lub lentiwirusach (np. HIV, FIV lub EIAV) i mają tę przewagę, że infekują także komórki nie dzielące się.

## 2.2. Mechanizmy nieswoistego działania siRNA

W przypadku projektowania si/shRNA należy zwracać szczególną uwagę na ryzyko wystąpienia efektów niespecyficznych w komórkach. Efekty te mogą polegać na degradacji innych genów niż docelowy (ang. *off-target effects*), wspomnianej toksyczności w przypadku wysycenia endogennych szlaków RNAi, zwłaszcza eksportyny 5 oraz indukcji odpowiedzi interferonowej. Dwuniciowe RNA dłuższe zarówno niż 30 pz, jak też zwykle używane 21-nukleotydowe, aktywują kinazę R (PKR) i indukują odpowiedź interferonową (21). Tępo zakończone siRNAs są lepsze od tych mających na końcach wolne nukleotydy (np. siRNA transkrybowane przez Pol T7). Jednoniciowe końce siRNA mogą być wykrywane przez helikazę kodowaną przez gen RIG-I (ang. *Retinoic Acid Gene 1*) (22), która uczestniczy w procesach rozpoznawania obcego, zwykle wirusowego RNA i inicjowaniu odpowiedzi przeciwwirusowej. Syntetyczne siRNA, które wchodzi do endosomów, mogą aktywować receptory TLR (ang. *Toll Like Receptors*), głównie TLR7 and TLR8 (23,24). Użycie plazmidów kodujących shRNA pozwala ominąć i wykluczyć aktywację receptorów TLR. Także modyfikacje nukleotydów, np. zastąpienie urydyn odpowiednikami zmodyfikowanymi w pozycji 2' (2'-O-metyl urydynami) znosi rozpoznawanie siRNA przez TLR7/8 i nie dopuszcza do stymulacji komórek układu odpornościowego, co jest szczególnie istotne w doświadczeniach *in vivo*.

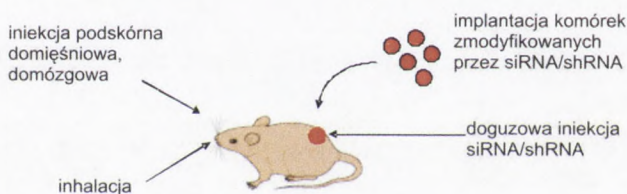
### 3. Wykorzystanie zjawiska RNAi do specyficznego wyciszania ekspresji genów *in vivo*

Spektakularne osiągnięcia w modulacji ekspresji genów z wykorzystaniem siRNA przyczyniły się do szybkiego ich zastosowania w badaniach *in vivo*. W 2002 r. McCaffrey i wsp. opublikowali pierwsze wyniki pokazujące wyciszenie ekspresji genu za pomocą siRNA i shRNA *in vivo* (25). Plazmid zawierający gen kodujący lucyferazę był wstrzyknięty dożylnie razem ze zsyntetyzowanymi chemicznie siRNA lub plazmidem kodującym shRNA do myszy. Aktywność lucyferazy w wątrobie zmierzono za pomocą obrazowania całego ciała. Stwierdzono 80% redukcję ekspresji lucyferazy w wątrobie myszy otrzymujących siRNA/shRNA skierowane przeciwko lucyferazie (25). W 2003 r. po raz pierwszy zastosowano siRNA jako czynnik potencjalnie terapeutyczny w mysim modelu zapalenia wątroby (26). Zapalenie wątroby wywoływano poprzez wstrzyknięcie konkanawaliny A lub przeciwciała aktywującego receptor Fas. Podanie do żyły ogonowej siRNA wyciszającego ekspresję Fas znosiło toksyczny efekt czynników uszkadzających wątrobę. Myszy po podaniu przeciwciała aktywującego Fas umierały po 3 dniach, natomiast 80% myszy nastrzykniętych siRNA przeciwko Fas przeżywało 10 dni (26).

#### Metody stabilizacji siRNA



#### Metody podawania siRNA/shRNA



Rys. 1. Metody zwiększania efektywności działania siRNA oraz sposoby ich dostarczenia do organizmu. Metody zwiększania efektywności działania siRNA za (27), zmodyfikowane.



Podawane do krwiobiegu lub dootrzewnowo siRNA, podobnie jak antysensowe oligonukleotydy, akumulują się w wątrobie, śledzionie i nerkach, natomiast ich stężenie w innych tkankach jest niskie. Ponadto w surowicy krwi jednoniciowe RNA jest degradowane przez nukleazy w ciągu sekund, a siRNA w czasie minut. Na przykład niezmodyfikowane siRNA podawane dożylnie szczurom za pomocą pomp ciśnieniowych ma okres półtrwania 6 min (27). Poprawę efektywności wyciszenia można uzyskać poprzez modyfikacje chemiczne cząsteczek siRNA, zwiększające ich stabilność i zdolność przenikania przez błony komórkowe, i inne bariery tkankowe (rys. 1) (28,29). Związanie siRNA lub plazmidowego DNA z cząsteczkami cholesterolu zwiększa ich transport do komórek zależny od receptorów lipoprotein oraz stabilność w surowicy poprzez związanie z albuminą. Opłaszczenie plazmidowego DNA kationowymi nośnikami (PEG) związanymi z liposomami i przeciwciałem umożliwiło uzyskanie 90% wyciszenia ekspresji EGFR w mózgu po podaniu dożylnym w mysim modelu guza mózgu (28,29).

#### **4. Opracowanie nowych terapii przeciwnowotworowych z wykorzystaniem interferencji RNA**

Komórki nowotworowe wykazują liczne i różnorodne zaburzenia genetyczne i epigenetyczne. Pomimo wielkiej różnorodności i złożoności zaburzeń, wzrost i proliferacja komórek nowotworowych jest często modyfikowana przez inaktywację pojedynczego onkogenu. Jest to związane z przestawieniem się metabolizmu komórki nowotworowej na dominujący szlak przekazywania zaburzony przez białko onkogenne. Zjawisko to nosi nazwę „uzależnienia od onkogenu” (ang. *Oncogene Addiction*) (30). Potwierdzeniem istnienia tego zjawiska jest wzrastająca liczba wyników badań wykazujących wysoką aktywność terapeutyczną przeciwciał lub inhibitorów farmakologicznych wyłączających funkcje poszczególnych białek onkogennych. Wśród spektakularnych przykładów można wymienić: trastuzumab (Herceptyna) hamujący receptorową kinazę HER-2/NEU u pacjentek z rakiem piersi, imatinib blokujący kinazę tyrozynową Bcr-abl w chronicznych białaczkach oraz gefitinib i erlotinib, blokujące receptor naskórkowego czynnika wzrostu EGFR w drobnokomórkowym raku płuc, raku trzustki i glejakach (30). Choroby nowotworowe stały się polem działania terapii bazujących na wykorzystaniu siRNA ze względu na możliwość wyciszenia ekspresji onkogenów lub innych genów podstawowych dla progresji nowotworu.

Tabela 1

Wyniki badań nad wykorzystaniem RNAi w terapii przeciwnowotworowej *in vivo*

Gen docelowy	Rodzaj RNAi	Sposób dostarczenia	Model badań (nowotwór)	Specyficzność	Docelowe komórki	Literatura	
1	2	3	4	5	6	7	
Onkogenne czynniki transkrypcyjne	STAT3	siRNA	nagie siRNA	czerniak, jelita grubego	olionukleotyd CpG (IDG, IDŻ)	komórki TLR9+	(31)
		shRNA	elektroporacja	prostaty	NSD (IDG)	NSD	(32)
		shRNA	atenuowane <i>S. typhimurium</i>	prostaty	NSD (IDŻ)	NSD	(33)
		shRNA	elektroporacja	prostaty	NSD (IDG)	NSD	(34)
		siRNA	neutralne liposomy	jajnika	NSD (IDŻ)	NSD	(35)
		shRNA	elektroporacja	wątrobowo-komórkowy	NSD (IDG)	NSD	(36)
		siRNA	kationowy polimer PEI zmodyfikowany StA	czerniak	NSD (IDG)	NSD	(37)
	cMyc	siRNA	protamina	czerniak	białko F105 (IDG, IDŻ)	komórki gp160+	(38)
	EWS-FLI1	siRNA	polikation na bazie cyklodekstryny	mięsak Ewinga	transferyna	komórki transferyna+	(42)
	RhoA	siRNA	PIHCA	piersi	NSD (IDŻ)	NSD	(43)
ANT2	shRNA	kationowy nośnik lipidowy	piersi	NSD (IDG)	NSD	(44)	
Apoptoza	Bcl2	siRNA	kationowy polimer PEI	czerniak, płuc	3p-siRNA (IDŻ)	komórki Rig-I+	(45)
		siRNA	aptamer	prostaty	aptamer (IDG)	komórki PSMA+	(46)
	BCLXL	shRNA	liposomy	jamy nosowo-gardłowej	NSD (IDG)	NSD	(47,48)
	PLK1	siRNA	aptamer	prostaty	aptamer (IDG)	komórki PSMA+	(46)
	Bcl2L12	shRNA	stabilna linia – retrovirus	glejak	BD	BD	(49)
	XIAP	shRNA	elektroporacja	piersi	NSD (IDG)	NSD	(50)
		shRNA	adenowirus	jelita grubego	NSD (IDG)	NSD	(51)
		shRNA	stabilna linia – adenowirus	trzustki	BD	BD	(52)
shRNA		adenowirus	wątrobowo-komórkowy	NSD (IDG)	NSD	(53)	
MDM2	siRNA	protamina	czerniak	białko F105 (IDG, IDŻ)	komórki gp160+	(38)	



	1	2	3	4	5	6	7	
Angiogeneza	<b>VEGF</b>	siRNA	protamina	czerniak	białko F105 (IDG, IDŻ)	komórki gp160+	(38)	
		shRNA	liposomy	jamy nosowo-gardłowej	NSD (IDG)	NSD	(47,48)	
		siRNA	nano-nośniki bazujące na CaCO <sub>3</sub>	rak żołądka	NSD (IDG)	NSD	(54)	
		siRNA	lentiwirus	trzustki	NSD (IDG)	NSD	(55)	
		shRNA	liposomy	jelita grubego	NSD (IDG)	NSD	(56)	
	<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	siRNA	kationowy polimer PEI	glejak	NSD (IDG)	NSD	(57)	
	<b>HIF-2<math>\alpha</math></b>	siRNA	kationowy polimer PEI	płuc (LLC)	NXD (IDŻ)	NSD	(58)	
		siRNA	kationowy polimer PEI	płuc (LLC)	NXD (IDŻ)	NSD	(58)	
	ścieżki sygnałowe	<b>EphA2</b>	siRNA	neutralne liposomy	rak jajnika	NXD (IDŻ)	NSD	(59)
		<b>EGFR</b>	shRNA	PEG-yłowane anionowe liposomy	glejak	HIRMab, mTrfMab (IDŻ)	komórki HIR+	(60)
<b>COX-2</b>		siRNA	kationowe liposomy	rak piersi	NSD (IDŻ)	NSD	(61)	
<b>TERT</b>		siRNA	kompleksy SWNTs	rak płuc (LLC)	NSD (IDG)	NSD	(62)	
		shRNA	liposomy	rak jamy nosowo-gardłowej	NSD (IDG)	NSD	(47,48)	
<b>aB-crystallin</b>		siRNA	prześciowa transfekcja – liposomy	glejak	BD	BD	(49)	
<b>Her-2</b>		siRNA	kationowy liposomy	rak piersi	folacyna (IDG)	komórki folacyna +	(63)	
<b>eIF4E</b>		shRNA	stabilna linia – liposomy	rak piersi	BD	BD	(64)	
<b>Wt1</b>		shRNA	kationowy polimer PEI	rak płuc	inhalacje aerozolem	komórki płuc	(65)	
<b>Akt2</b>		shRNA	kationowy polimer PEI	rak trzustki	NSD (IDG)	NSD	(66)	
<b>kRas</b>		shRNA	kationowy polimer PEI	rak trzustki	NSD (IDG)	NSD	(66)	
<b>TEL-PDGFR<math>\beta</math></b>		shRNA	stabilna linia – retrowirus	komórki Ba/F3	BD	BD	(48)	
<b>TGF<math>\beta</math></b>		shRNA	stabilna linia – lipofekcja	glejak	BD	glejak C6	(67)	
<b>Riptor, Raptor</b>	shRNA	stabilna linia – lentiwirus	rak jelita grubego	BD	BD	(39)		

	1	2	3	4	5	6	7
Adhezja	<b>FAK</b>	shRNA	neutralne liposomy	rak jajnika	NSD (IDO, IDŻ)	NSD	(68)
		shRNA	kationowe liposomy	rak prostaty, rak piersi	NSD (IDG)	NSD	(69)
		siRNA/ shRNA	przejsiowa transfekcja, kationowe liposomy	rak prostaty, rak piersi	BD	BD	(70)
		shRNA	zmodyfikowany polimer PEI	czerniak	NSD (IDG)	NSD	(71)
Chemowrażliwość	<b>MDR1</b>	shRNA	nagie DNA	rak szyjki macicy	NSD (IDG)	NSD	(72)
		shRNA	stabilna linia – kationowe liposomy	rak prącia	BD	BD	(73)
		shRNA	stabilna linia – kationowe liposomy	rak wątrobowokomórkowy	BD	BD	(74)
Iwazyjność	<b>uPAR</b>	shRNA	nagie DNA	rak piersi	NSD (IDG)	NSD	(75)
		siRNA	nagie DNA	rak jamy ustnej (OSCC)	NSD (IDG)	NSD	(76)
	<b>MMP-9</b>	shRNA	nagie DNA	rak piersi	NSD (IDG)	NSD	(75)
		siRNA	kationowe liposomy	rak żołądka	NSD (IDG)	NSD	(77)
	<b>Her-2</b>	siRNA	kationowe liposomy, PEG-yłowane kationowe liposomy	rak głowy i szyi	NSD/folacyna (IDG)	komórki folacyna+	(63)
Wirusowe onkogeny	<b>HPV E6</b>	siRNA	nagie DNA	rak szyjki macicy	NSD (IDG)	NSD	(78)
		siRNA	atelokolagen	rak szyjki macicy	NSD (IDG)	NSD	(79)
	<b>hPV E7</b>	siRNA	nagie DNA	rak szyjki macicy	NSD (IDG)	NSD	(78)
		siRNA	atelokolagen	rak szyjki macicy	NSD (IDG)	NSD	(79)
	<b>EBV LMP-1</b>	shRNA	stabilne linie -rAAV-2	rak nosogardła	BD	BD	(80)

NSD – niespecyficzne dostarczenie; BD – brak dostarczenia; IDG – iniekcja doguzowa; IDO – iniekcja dootrzewna; rAAV-2 (ang. *Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 Vector*); Sta – kwas stearynowy (ang. *Stearic Acid*); PEI – polietylenoimina, PEG – polietylenoglikol; DOPE – fosfatydyloetanolamina; PIHC – poliizoheksylocyjanoakryl; SWNT (ang. *Single-Walled Carbon Nanotubes*).

W tabeli 1 przedstawiono zestawienie wyników badań, w których wykorzystano zjawisko interferencji RNA w celu zahamowania wzrostu i rozwoju nowotworów *in vivo*. Pomimo trudności związanych ze specyficznym i efektywnym dostarczaniem kwasów nukleinowych do komórek nowotworowych *in vivo*, pojawia się wiele prac



wykazujących skuteczność tego podejścia w potencjalnej terapii przeciwnowotworowej. Narzędzie RNAi we wspomnianych badaniach służy do wyciszenia ekspresji onkogenów, których nadmierny poziom sprzyja progresji nowotworów. Szczególnie istotne jest, jak się wydaje, wyciszenie ekspresji tych białek onkogennych, dla których brak jest obecnie specyficznych inhibitorów, co uniemożliwia wykorzystanie ich, jako celów klasycznej terapii przeciwnowotworowej. Przykładem takiego podejścia jest wyciszenie onkogennych czynników transkrypcyjnych np. STAT3 (31-37), cMyc (38), dla których nie istnieją żadne farmakologiczne inhibitory, będące choćby na etapie badań klinicznych.

Innym ciekawym podejściem jest zahamowanie aktywności aktualnie dobrze znanych w terapii przeciwnowotworowej onkogenów np. kompleksów białka mTOR (ang. *Mammalian Target of Rapamycin*) (39), dla których klasyczne inhibitory nie zawsze są skuteczne. Białko mTOR występuje w dwóch kompleksach: jako kompleks mTORC1, w którym jednym ze składników jest białko Raptor oraz jako mTORC2 zawierający białko Rictor. Pat Gulhati i wsp. (39) wykazali, że użycie shRNA do wyciszenia białka Rictor i zahamowania aktywności kompleksu mTORC2 hamuje żywotność komórek raka jelita grubego niewrażliwych na rapamycynę (znanego leku hamującego pośrednio aktywność kompleksu mTORC1). Autorzy wykazali, że wyciszenie aktywności kompleksu mTORC2 w komórkach raka jelita grubego, zarówno wrażliwych jak i niewrażliwych na rapamycynę, ma znaczący wpływ na wielkość guza w eksperymentach *in vivo*. W komórkach wrażliwych na rapamycynę wielkość guza z około  $\sim 9500 \text{ mm}^3$  (komórki z ekspresją kontrolnego shRNA) zmniejszyła się do  $750 - 1250 \text{ mm}^3$  (shRNA przeciwko mTORC1-Raptor lub/oraz mTORC2-Rictor) po 25 dniach od implantacji. W komórkach niewrażliwych na rapamycynę wielkość guza, w którym ulegało ekspresji kontrolne shRNA wynosiła  $690 \text{ mm}^3$ . Zastosowanie shRNA wyciszającego ekspresję białka Rictor (mTORC2) lub jednoczesne zahamowanie aktywności mTORC1 i mTORC2 doprowadziło natomiast do dramatycznego zmniejszenia wielkości guza do  $10-135 \text{ mm}^3$ . Doświadczenia stworzyły podstawy do wykorzystania interferencji RNA w celu zahamowania aktywności kompleksów białka mTOR.

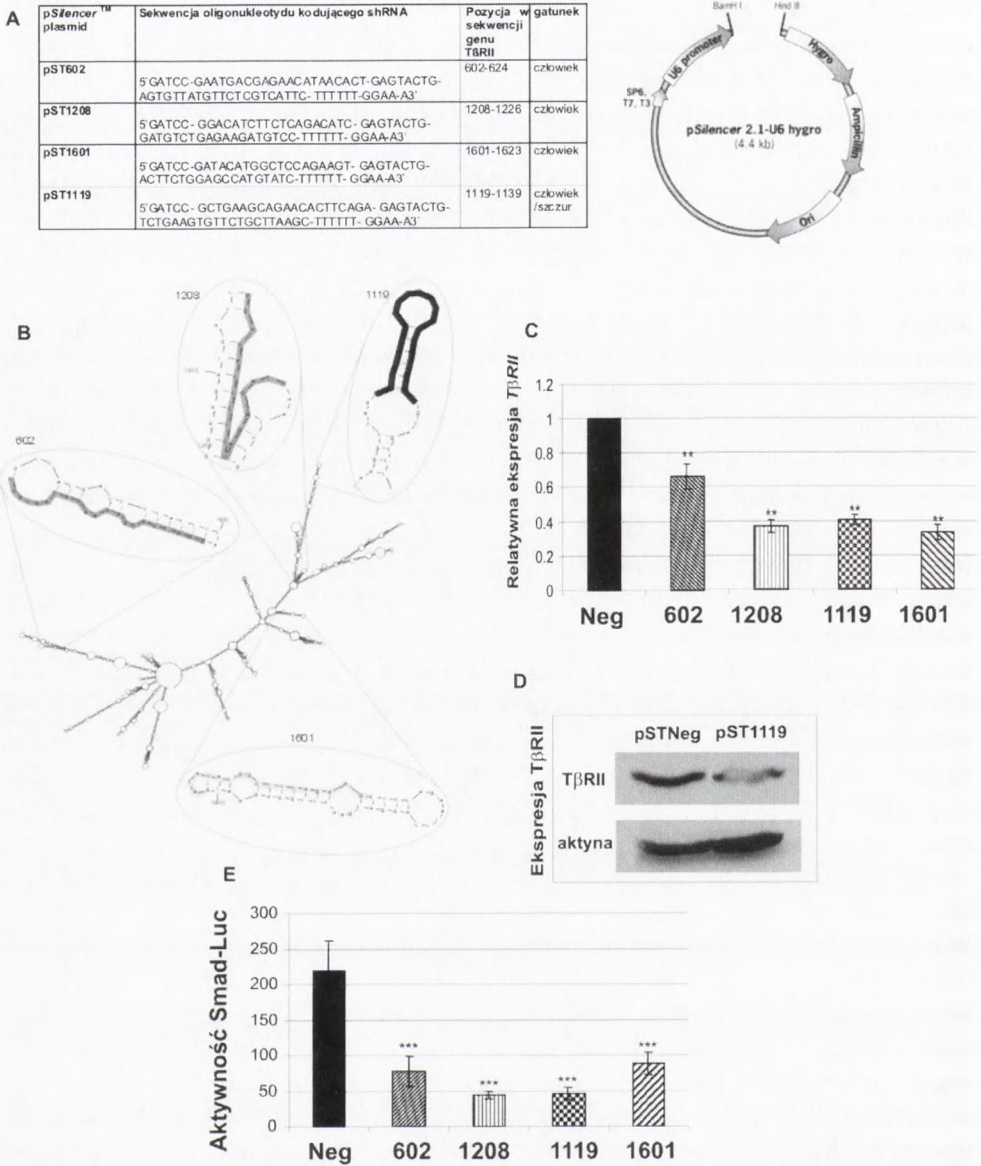
Jednym z głównych problemów skutecznego wykorzystania RNAi w doświadczeniach *in vivo* jest brak wysokiej specyficzności i wydajności dostarczenia siRNA do komórek docelowych. Dlatego różne grupy wykorzystują coraz nowsze systemy specyficznych i efektywnych nośników siRNA lub plazmidów kodujących shRNA. Przykładem dobrze ilustrującym optymalizację sposobów dostarczania siRNA są wyniki badań nad wyciszeniem białka STAT3 w zwierzęcym modelu raka prostaty (32-34). Wykorzystano tu dwa sposoby dostarczania plazmidów kodujących shRNA wyciszające ekspresję czynnika transkrypcyjnego STAT3: elektroporację (32,34) oraz pozbawiony aktywności szczep *S. typhimurium* jako nośnik (33). W dwóch pierwszych pracach po doustnym dostarczeniu siRNA wyciszającego ekspresję białka STAT3 odnotowano 3-5-krotne zmniejszenie objętości guza w porównaniu do myszy traktowanych kontrolnym siRNA. W opisanych pracach nie zastosowano



nośnika plazmidowego, ani cząsteczki kierującej go do komórek nowotworu. W jednej z prac zastosowano jednak dodatkowo efekt synergii wyciszenia równocześnie dwóch onkogenów: STAT3 i GRIM-19 (34). W tym wariantcie doświadczalnym objętość guza zmalała ponad 10-krotnie w porównaniu do wariantu wyciszenia poszczególnych onkogenów (STAT3 i GRIM-19) osobno. Takie podejście wskazuje na użyteczność wyciszenia jednocześnie większej liczby onkogenów lub stosowania terapii łączonej, gdzie siRNA stanowi jeden ze składników środka terapeutycznego. Podobne podejście synergii zostało wykorzystane przez Ling Zhang i wsp. (33), którzy wykorzystali atenuowany szczep *S. typhimurium* jako nośnik plazmidu kodującego shRNA, wyciszającego ekspresję białka STAT3 w zwierzęcym modelu raka prostaty. Pozbawione zjadliwości bakterie *S. typhimurium* same wykazują działanie przeciwnowotworowe oraz mają zdolność do preferencyjnej, 1000 razy częstszej infekcji komórek nowotworowych w porównaniu do komórek prawidłowych, jak również infekują tkankę nowotworu równomiernie (40,41). Dodatkowe wykorzystanie *S. typhimurium*, jako nośnika DNA kodującego shRNA wyciszającego ekspresję onkogenów czyni go atrakcyjnym, efektywnym i do pewnego stopnia specyficznym wektorem komórek nowotworowych. Próby wykorzystania tego narzędzia do transfekcji komórek raka prostaty *in vivo* doprowadziły do 12-krotnego zmniejszenia objętości nowotworu (z 2458,51 mm<sup>3</sup> w myszach kontrolnych do 216,42 mm<sup>3</sup> w myszach traktowanych dożylnie *S. typhimurium*\_shRNASTAT3). Dodatkowo u myszy transfekowanych *S. typhimurium* kodującym shRNA wyciszającym STAT3 doszło do 84% spadku liczby przerzutów. Co więcej, u co trzeciej tak traktowanej myszy został odnotowany całkowity zanik tkanki nowotworowej. Podsumowując, wykorzystanie specyficznego i wydajnego systemu dostarczania shRNA, który dodatkowo wykorzystuje efekt synergistyczny pobudzając odpowiedź odpornościową, skutkuje najlepszym wynikiem terapeutycznym.

Wiele komórek nowotworowych, włączając w to komórki glejaka, wydziela cytokinę transformujący czynnik wzrostowy – TGFβ (ang. *Transforming Growth Factor β*). W komórkach ludzkich glejaków podwyższony poziom ekspresji TGFβ jest skorelowany z poziomem złośliwości nowotworu, a TGFβ modyfikuje podścielisko guza, wspiera wzrost nowotworu bezpośrednio albo pośrednio przez hamowanie odpowiedzi układu odpornościowego, stymulację produkcji czynników angiogennych, regulację migracji i inwazyjności. W grupie kierowanej przez Bożenę Kamińską w Pracowni Regulacji Transkrypcji w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN, aby wyciszyć przekazywanie przez TGFβ w komórkach ludzkiego glejaka, skonstruowano plazmidy, które kodowały 4 różne shRNA i mogły specyficznie hamować ekspresję receptora TGFβ typu II (TβRII) (67). Jako kontrolę wykorzystano plazmid kodujący shRNA bez znaczącej homologii z genami szczura i człowieka. Zaprojektowane shRNA różniły się wydajnością wyciszenia ekspresji genu, ale wszystkie obniżyły ekspresję mRNA TβRII o 40-70%, redukowały poziom białka TβRII oraz blokowały zależną od tego receptora ścieżkę sygnałową w transfekowanych komórkach (rys. 2). Wyciszenie ekspresji TβRII w komórkach ludzkiego glejaka hamowało inwazyjność induk-





Rys. 2. Ocena działania zaprojektowanych shRNA transkrybowanych z plazmidu na ekspresję receptora TGF typu II (TβRII).

A. Schemat zaprojektowanych nukleotydów i plazmidu wyjściowego pSilencer; B. Lokalizacja sekwencji rozpoznawanych przez zaprojektowane shRNA w obrębie drugorzędowej struktury mRNA TβRII; C. Ocena działania shRNA kodowanych przez plazmidy na poziomie mRNA (C), ekspresji białka (D) oraz ścieżki sygnałowej Smad zależnej od aktywacji receptora (E); zmodyfikowane według rozprawy doktorskiej Aleksandry Wesolowskiej.

waną przez cytokinę w badaniach *in vitro*. W badaniach nad regulacją migracji i inwazyjności komórek glejaka w modelu zwierzęcym wykorzystano stabilnie modyfikowane linie glejaka, w których za pomocą zaprojektowanych shRNA, trwale wyciszono ekspresję receptora TGF- $\beta$ 1 typu II. Stwierdzono, że linie niezdolne do odpowiedzi na egzogenny TGF- $\beta$ 1 po wszczępieniu do zwierząt tworzą dwukrotnie mniejsze guzy (67). Plazmidy kodujące shRNA wyciszające receptor TGF- $\beta$ 1 mogą być zatem nowym narzędziem do terapii genowej. Wytworzone plazmidy są obecnie testowane w zwierzęcym modelu zależnego od TGF- $\beta$  zwłóknienia płuc.

Nietypowe, bo nie poprzedzone badaniami na hodowanych *in vitro* komórkach czy zwierzętach, jest zastosowanie dwuniciowego RNA przeciwko tenascynie w terapii guzów mózgu u ludzi (81,82). Mimo że opisane w pracach dwuniciowe ATN-RNA nie spełnia reguł, autorzy opisują jego działanie terapeutyczne oparte na mechanizmie RNAi. Glejaki są najczęstszymi pierwotnymi guzami mózgu, a ich najbardziej złośliwą formą jest glejak wielopostaciowy (GBM, ang. *Glioblastoma Multiforme*). Należą one do najtrudniejszych do leczenia nowotworów. We wzmiankowanych badaniach podawano dwuniciowe RNA o sekwencji homologicznej do mRNA tenascyny C, syntetyzowane enzymatycznie przez polimerazy T3 i T7, i przekształcane w dwuniciowe 164-nukleotydowe RNA (ATN-RNA). Wprowadzenie ATN-RNA do komórek glejakach wyizolowanych z guza i hodowanych *in vitro* już po 24 godz. w 80% obniżało poziom mRNA tenascyny C. Biorąc pod uwagę, że komórki glejaka wyizolowane z guzów słabo się transfekują (od kilku do kilkunastu procent), a efekty wyciszenia są zwykle widoczne po 48-72 godz., uzyskanie takiego wyniku po 24 godzinach jest mało wiarygodne. Autorzy przeprowadzili śródoperacyjne podania dwuniciowego ATN-RNA do guzów o wysokim stopniu złośliwości (III i IV) u 10 chorych po chirurgicznym usunięciu masy guza. Po 10 tygodniach oceniano wielkość guzów za pomocą tomografii komputerowej i wykazano, że wznowa wysoko złośliwego glejaka po podaniu ATN-RNA była zahamowana (81). W kolejnym badaniu liczba traktowanych pacjentów została zwiększona do 46 i stwierdzono przedłużenie okresu przeżycia o 3,5 tyg. w porównaniu z grupą chorych poddanych tylko brachyterapii (82). Ze względu na brak grupy kontrolnej, analizy statystycznej oraz brak przekonujących wyników z badań na komórkach, ocena wyników badań jest niemożliwa. Biorąc pod uwagę, że 164-nukleotydowe ATN-RNA jest dość długie i posiada wolne końce jako efekt syntezy enzymatycznej, najbardziej prawdopodobne jest to, że ma ono działanie immunomodulujące i może indukować odpowiedź interferonową, zatem nie można stwierdzić, że chodzi tu o działanie oparte na mechanizmie RNAi.

Pomimo licznych i spektakularnych sukcesów specyficznego wyciszenia genów w komórkach nowotworowych *in vitro* i *in vivo*, identyfikacja efektywnie działających siRNA/shRNA i wykorzystanie optymalnych sposobów dostarczania siRNA lub DNA plazmidowego pozostaje dużym wyzwaniem.



## 5. Badania przedkliniczne i kliniczne czynników terapeutycznych wykorzystujących proces RNAi

Technologia RNAi skupiła uwagę przemysłu farmaceutycznego jako alternatywa dla konwencjonalnych związków chemicznych używanych jako czynniki terapeutyczne. Podstawowym powodem jest niewątpliwie łatwość projektowania specyficznych siRNA i wysoka specyficzność działania cząsteczek siRNA, lecz równie istotnym, jak się wydaje, jest relatywnie krótki czas rozwoju produktu leczniczego (17-28 miesięcy) w porównaniu z tradycyjnymi, niskocząsteczkowymi związkami (42-66 miesięcy), a także rekombinowanymi białkami czy przeciwciałami (27-50 miesięcy). Pierwsze wyniki badań przedklinicznych z wykorzystaniem syntetycznych cząsteczek RNA zostały opublikowane przez Bitko i wsp. w roku 2005 na łamach „Nature Medicine” (83). Badania te dotyczyły wpływu siRNA na dwa wirusowe patogeny układu oddechowego: wirus RSV (ang. *Respiratory Syncytial Virus*) oraz PIV (ang. *Parainfluenza Virus*) wywołujące wysoką śmiertelnością. Na podstawie wyników badań przedklinicznych sugerowano, że lokalne podawanie siRNA, zwłaszcza w okolicy nabłonka dróg oddechowych, może być bardziej skuteczne niż systemowe. Bitko i wsp. (83) podawali syntetyzowane chemicznie siRNA przeciwko wirusom RSV i PIV do wnętrza nosa zwierząt zakażonych wirusami, co w 99% zahamowało replikację wirusów i w konsekwencji ochroniło przed uszkodzeniem płuc. Nie stwierdzono efektów ubocznych i indukcji odpowiedzi interferonowej. Wyniki tych badań zainicjowały wkrótce serię badań klinicznych z wykorzystaniem technologii RNAi. Już pół roku później firma Sirna Therapeutics (Boulder, CO, USA) zaprezentowała wyniki badań klinicznych z wykorzystaniem produktu opartego na tej technologii.

Najbardziej zaawansowane programy kliniczne dotyczą obecnie związanego z wiekiem zwyrodnienia plamki żółtej. Choroby oczu zwróciły uwagę badaczy głównie z powodu relatywnie niskiego poziomu rybonukleaz – enzymów degradujących cząsteczki RNA, w środowisku oka. Umożliwiło to podawanie leków opartych na technologii RNAi w niezmienionej postaci wprost do miejsca, w którym lek ma działać. Bezsporną korzyścią w tym podejściu jest eliminacja wszelkich kwestii związanych z dostarczaniem cząsteczek do organizmu i ich stabilnością. To z kolei sprawia, że cząsteczki siRNA czy shRNA mogą stać się w bardzo krótkim czasie powszechnie wykorzystywanymi produktami leczniczymi stosowanymi w terapii chorób oczu.

Tabela 2

## Przegląd produktów wykorzystujących technologię RNAi obecnie testowanych w badaniach klinicznych

Firma	Produkt	Gen docelowy	Choroba	Sposób dostarczania	Status
1	2	3	4	5	6
Acuity Pharmaceuticals /Opko Health Inc.	Bevasiranib	VEGF	zwyrodnienie płamki żółtej	śródocznie	faza III
Acuity Pharmaceuticals /Opko Health Inc.	Bevasiranib	VEGF	cukrzycowy obrzęk płamki żółtej	domiejskowo	faza II zakończone
Aegera Therapeutics	AEG35156	XIAP	limfocytna białaczka przewlekła, limfoma limfocytów B	obwodowo	faza I/II
Allergan/Merck	AGN211745	receptor VEGF	zwyrodnienie płamki żółtej	śródocznie	faza II
Alnylam Pharmaceuticals	ALN-RSV01	białko nukleokapsydu wirusa RSV	RSV	donosowo lub wziewnie	faza II zakończone
Benitec	sidrZT	Tat/rev, CCR5, TAR (3 shRNA)	HIV/AIDS	wektor lentiwirusowy	faza I
Calando Pharmaceuticals	CALAA-01	reduktaza rybonukleotydowa	guzy lite	obwodowo	faza I
Merck/Sirna Therapeutics	Sirna-027		zwyrodnienie płamki żółtej		faza II
Nucleonics	NUC B100	Pre-gen./pre-C, Pre-S1, Pre-S2/S, X (4 shRNA)	zapalenie wątroby typu B	obwodowo	faza I
Quark Pharmaceuticals /Pfizer	RTP-801i-14	RTP-801	zwyrodnienie płamki żółtej	śródocznie	faza I/II
Quark Pharmaceuticals /Pfizer	RTP-801i-14	RTP-801	cukrzycowy obrzęk płamki żółtej	domiejskowo	faza II
Quark Pharmaceuticals	AKIi-5	p53	ostra niewydolność nerek	obwodowo	faza I
Santaris Pharmaceuticals	SPC3649		wirusowe zapalenie wątroby typu C		faza I
Senetec PLC	ATN-RNA		glejak wielopostaciowy		faza I
TransDerm Inc.	TD101	keratyna 6a z mutacją N171K	wrodzone zgrubienie paznokci	śródkórnice	faza I b
Silence Therapeutics AG	Atu027	kinaza białkowa N3	guzy lite	infuzyjnie	faza I
Tekmira Pharmaceuticals Corporation	PRO-020401	ApoB	hipercholesterolemia	infuzyjnie	faza I
CombiMatrix			wirusowe zapalenie wątroby typu C		faza przedkliniczna
CombiMatrix			HIV/AIDS		faza przedkliniczna
Merck & Co Inc.	Sirna-034		wirusowe zapalenie wątroby typu C		faza przedkliniczna



1	2	3	4	5	6
Nastech		genom wirusa grypy	grypa		faza przedkliniczna
Protiva		genom wirusowy	zapalenie wątroby typu B i C, wirus Ebola, wirus Marbuga		faza przedkliniczna
Tacere Therapeutics	TT-033	3 obszary genomu wirusa HCV	zapalenie wątroby typu C		faza przedkliniczna

W tabeli 2 zestawiono informacje o prowadzonych aktualnie badaniach klinicznych wykorzystujących siRNA lub shRNA. Dane pochodzą ze strony internetowej [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), doniesień prasowych umieszczonych w internecie oraz stron firm, które przeprowadzały te badania.

Wśród chorób zakaźnych najdalej posunięte prace związane są z eliminacją wirusa RSV wywołującego infekcje zarówno górnych jak i dolnych dróg oddechowych. Pomyślnie zakończone w lipcu 2009 r. badania kliniczne II fazy przeprowadzone przez firmę Alnylam Pharmaceuticals obejmowały grupę dorosłych pacjentów po przeszczepie płuca, u których w naturalny sposób dochodziło do zakażenia tym wirusem. Badany produkt podawany był donosowo, co w dużej mierze redukowało problemy występujące przy podawaniu tego typu cząsteczek obwodowo.

Ciekawe podejście do problemu eliminacji wirusów HIV i HBV wywołujących odpowiednio: AIDS i wirusowe zapalenie wątroby typu B, zaprezentowały firmy Benitec oraz Nucleonics. W przeciwieństwie do większości produktów skierowanych przeciwko jednemu tylko genowi, umieściły one w wektorach, odpowiednio lentiwirusowym i plazmidowym, od 3 do 4 sekwencji shRNA skierowanych przeciwko różnym genom w genomie wirusów HIV i HBV. Mimo że poziom wyciszenia genów prawie nigdy nie jest całkowity, jednoczesna degradacja transkryptów kilku genów podstawowych dla namnażania się wirusów może okazać się zaskakująco dobrą strategią i być wykorzystana w leczeniu pacjentów zakażonych tymi wirusami.

Technologia RNAi, jak się wydaje, posiada ogromny potencjał do rozwoju produktów leczniczych o wysokiej specyficzności działania. Niemniej jednak pozostaje kilka kwestii do rozwiązania zanim będziemy mogli myśleć o tej technologii jako substytucie obecnie stosowanych terapii. Podstawowym problemem są trudności w dostarczaniu cząsteczek siRNA do miejsc ich działania przy podawaniu ich bezpośrednio do krwiobiegu, a co za tym idzie kłopoty z ich stabilnością w tym środowisku. Badania nad stabilnością siRNA i ich aktywnością prowadzone są od wielu lat, co uwidacznia skalę podnoszonego problemu (84,85). Inną nie w pełni wyjaśnioną kwestią pozostaje problem ograniczenia niespecyficznego wpływu siRNA/shRNA na ekspresję genów innych niż docelowe (ang. *off-target effects*), poza wcześniej opisywaną indukcją odpowiedzi interferonowej (86). Na podstawie wyników badań Scacheri i wsp. (87) wykazano zmiany ekspresji p53 oraz p21<sup>WAF1</sup> przez niektóre



z 10 siRNA wyciszających ekspresję MEN1 (ang. *Multiple Endocrine Neoplasia, type I*). Autorzy sugerowali, że siRNA mogą wywoływać niespecyficzny, ale zależny od sekwencji wpływ działając na nieznaną celę komórkową. Autorzy spekulowali, że częściowa komplementarność sekwencji siRNA do genów innych niż docelowe może wpływać na translację, w sposób podobny do wywoływanego przez miRNA (87). Te dwie kwestie, jak się wydaje, są głównymi przeszkodami na drodze opracowywania terapii opartych na technologii RNAi.

## Literatura

1. Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., (1998), *Nature*, 391, 806-811.
2. Hamilton A. J., Baulcombe D. C., (1999), *Science*, 286, 950-952.
3. Tuschl T., Zamore P. D., Lehmann R., Bartel D. P., Sharp P. A., (1999), *Genes Dev.*, 13, 3191-3197.
4. Zamore P. D., Tuschl T., Sharp P. A., Bartel D. P., (2000), *Cell*, 101, 25-33.
5. Elbashir S. M., Lendeckel W., Tuschl T., (2001), *Genes Dev.*, 15, 188-200.
6. Hammond S. M., Bernstein E., Beach D., Hannon G. J., (2000), *Nature*, 404, 293-296.
7. Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T., (2001), *Nature*, 411, 494-498.
8. Szweykowska-Kulińska Z., Szarzyńska B., Sobkowiak Ł., Jarmołowski A., (2009), *Postępy Biologii Komórki*, 36, 43-58.
9. Mello C. C., Conte D., Jr., (2004), *Nature*, 431, 338-342.
10. Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J., (2001), *Nature*, 409, 363-366.
11. Chendrimada T. P., Gregory R. I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R., (2005), *Nature*, 436, 740-744.
12. Martinez J., Tuschl T., (2004), *Genes Dev.*, 18, 975-980.
13. Azuma-Mukai A., Oguri H., Mituyama T., Qian Z. R., Asai K., Siomi H., Siomi M. C., (2008), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 7964-7969.
14. Lee R. C., Ambros V., (2001), *Science*, 294, 862-864.
15. Jinek M., Doudna J. A., (2009), *Nature*, 457, 405-412.
16. Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R. I., Diederichs S., (2009), *Nat. Cell Biol.*, 11, 228-234.
17. Volpe T. A., Kidner C., Hall I. M., Teng G., Grewal S. I., Martienssen R. A., (2002), *Science*, 297, 1833-1837.
18. Hall I. M., Shankaranarayana G. D., Noma K., Ayoub N., Cohen A., Grewal S. I., (2002), *Science*, 297, 2232-2237.
19. Yuan B., Latek R., Hossbach M., Tuschl T., Lewitter F., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, W130-134.
20. Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W. S., Khvorova A., (2004), *Nat. Biotechnol.*, 22, 326-330.
21. Jackson A. L., Bartz S. R., Schelter J., Kobayashi S. V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsley P. S., (2003), *Nat. Biotechnol.*, 21, 635-637.
22. Yoneyama M., Fujita T., (2008), *Immunity*, 29, 178-181.
23. Goodchild A., Nopper N., King A., Doan T., Tanudji M., Arndt G. M., Poidinger M., Rivory L. P., Passioura T., (2009), *BMC Immunol.*, 10, 40.
24. Rossi J. J., (2009), *Gene Ther.*, 16, 579-580.
25. McCaffrey A. P., Meuse L., Pham T. T., Conklin D. S., Hannon G. J., Kay M. A., (2002), *Nature*, 418, 38-39.
26. Song E., Lee S. K., Wang J., Ince N., Ouyang N., Min J., Chen J., Shankar P., Lieberman J., (2003), *Nat. Med.*, 9, 347-351.
27. Aagaard L., Rossi J. J., (2007), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59, 75-86.



28. Ge Q., Dallas A., Ilves H., Shorestein J., Behlke M. A., Johnston B. H., (2010), *RNA*, 16, 118-130.
29. Wang S. L., Yao H. H., Qin Z. H., (2009), *Expert Opin. Biol. Ther.*, 9, 1357-1368.
30. Weinstein I. B., Joe A., (2008), *Cancer Res.*, 68, 3077-3080.
31. Kortylewski M., Swiderski P., Herrmann A., Wang L., Kowolik C., Kujawski M., Lee H., Scuto A., Liu Y., Yang C., Deng J., Soifer H. S., Raubitschek A., Forman S., Rossi J. J., Pardoll D. M., Jove R., Yu H., (2009), *Nat. Biotechnol.*, 27, 925-932.
32. Gao L., Zhang L., Hu J., Li F., Shao Y., Zhao D., Kalvakolanu D. V., Kopecko D. J., Zhao X., Xu D. Q., (2005), *Clin. Cancer Res.*, 11, 6333-6341.
33. Zhang L., Gao L., Zhao L., Guo B., Ji K., Tian Y., Wang J., Yu H., Hu J., Kalvakolanu D. V., Kopecko D. J., Zhao X., Xu D. Q., (2007), *Cancer Res.*, 67, 5859-5864.
34. Zhang L., Gao L., Li Y., Lin G., Shao Y., Ji K., Yu H., Hu J., Kalvakolanu D. V., Kopecko D. J., Zhao X., Xu D. Q., (2008), *Clin. Cancer Res.*, 14, 559-568.
35. Landen C. N., Jr., Lin Y. G., Armaiz Pena G. N., Das P. D., Arevalo J. M., Kamat A. A., Han L. Y., Jennings N. B., Spannuth W. A., Thaker P. H., Lutgendorf S. K., Savary C. A., Sanguino A. M., Lopez-Berestein G., Cole S. W., Sood A. K., (2007), *Cancer Res.*, 67, 10389-10396.
36. Li J., Piao Y. F., Jiang Z., Chen L., Sun H. B., (2009), *World J. Gastroenterol.*, 15, 2602-2608.
37. Alshamsan A., Hamdy S., Samuel J., El-Kadi A. O., Lavasanifar A., Uludag H., (2010), *Biomaterials*, 31, 1420-1428.
38. Song E., Zhu P., Lee S. K., Chowdhury D., Kussman S., Dykxhoorn D. M., Feng Y., Palliser D., Weiner D. B., Shankar P., Marasco W. A., Lieberman J., (2005), *Nat. Biotechnol.*, 23, 709-717.
39. Gulhati P., Cai Q., Li J., Liu J., Rychahou P. G., Qiu S., Lee E. Y., Silva S. R., Bowen K. A., Gao T., Evers B. M., (2009), *Clin. Cancer Res.*, 15, 7207-7216.
40. Pawelek J. M., Low K. B., Bermudes D., (1997), *Cancer Res.*, 57, 4537-4544.
41. Low K. B., Ittensohn M., Le T., Platt J., Sodi S., Amoss M., Ash O., Carmichael E., Chakraborty A., Fischer J., Lin S. L., Luo X., Miller S. I., Zheng L., King I., Pawelek J. M., Bermudes D., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 37-41.
42. Hu-Lieskovan S., Heidel J. D., Bartlett D. W., Davis M. E., Triche T. J., (2005), *Cancer Res.*, 65, 8984-8992.
43. Pille J. Y., Li H., Blot E., Bertrand J. R., Pritchard L. L., Opolon P., Maksimenko A., Lu H., Vannier J. P., Soria J., Malvy C., Soria C., (2006), *Hum. Gene Ther.*, 17, 1019-1026.
44. Jang J. Y., Choi Y., Jeon Y. K., Kim C. W., (2008), *Breast Cancer Res.*, 10, R11.
45. Poeck H., Besch R., Maihofer C., Renn M., Tormo D., Morskaya S. S., Kirschnek S., Gaffal E., Landsberg J., Hellmuth J., Schmidt A., Anz D., Bscheider M., Schwerd T., Berking C., Bourquin C., Kalinke U., Kremmer E., Kato H., Akira S., Meyers R., Hacker G., Neuenhahn M., Busch D., Ruland J., Rothenfusser S., Prinz M., Hornung V., Endres S., Tuting T., Hartmann G., (2008), *Nat. Med.*, 14, 1256-1263.
46. McNamara J. O., 2<sup>nd</sup>, Andrechek E. R., Wang Y., Viles K. D., Rempel R. E., Gilboa E., Sullenger B. A., Giangrande P. H., (2006), *Nat. Biotechnol.*, 24, 1005-1015.
47. Wang Y., Tao Z. Z., Chen S. M., Xiao B. K., Zhou X. H., Liu J. P., (2008), *Cancer Biol. Ther.*, 7, 896-901.
48. Chen J., Wall N. R., Kocher K., Duclos N., Fabbro D., Neuberger D., Griffin J. D., Shi Y., Gilliland D. G., (2004), *J. Clin. Invest.*, 113, 1784-1791.
49. Stegh A. H., Kesari S., Mahoney J. E., Jenq H. T., Forloney K. L., Protopopov A., Louis D. N., Chin L., DePinho R. A., (2008), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 10703-10708.
50. Zhang Y., Wang Y., Gao W., Zhang R., Han X., Jia M., Guan W., (2006), *Breast Cancer Res. Treat.*, 96, 267-277.
51. Dai Y., Qiao L., Chan K. W., Yang M., Ye J., Zhang R., Ma J., Zou B., Lam C. S., Wang J., Pang R., Tan V. P., Lan H. Y., Wong B. C., (2009), *Mol. Cancer Ther.*, 8, 2762-2770.
52. Vogler M., Walczak H., Stadel D., Haas T. L., Genze F., Jovanovic M., Gschwend J. E., Simmet T., Debatin K. M., Fulda S., (2008), *Cancer Res.*, 68, 7956-7965.
53. Pan Q., Liu B., Liu J., Cai R., Liu X., Qian C., (2008), *Acta Oncol.*, 47, 135-144.
54. He X. W., Liu T., Chen Y. X., Cheng D. J., Li X. R., Xiao Y., Feng Y. L., (2008), *Cancer Gene Ther.*, 15, 193-202.



55. Wang J., Shi Y. Q., Yi J., Ye S., Wang L. M., Xu Y. P., He M., Kong X. M., (2008), *J. Dig. Dis.*, 9, 228-237.
56. He X. W., Yu X., Liu T., Yu S. Y., Chen D. J., (2008), *Chin. Med. J. (Engl)*, 121, 439-444.
57. Gillespie D. L., Whang K., Ragel B. T., Flynn J. R., Kelly D. A., Jensen R. L., (2007), *Clin. Cancer Res.*, 13, 2441-2448.
58. Kamlah F., Eul B. G., Li S., Lang N., Marsh L. M., Seeger W., Grimminger F., Rose F., Hanze J., (2009), *Cancer Gene Ther.*, 16, 195-205.
59. Landen C. N., Jr., Chavez-Reyes A., Bucana C., Schmandt R., Deavers M. T., Lopez-Berestein G., Sood A. K., (2005), *Cancer Res.*, 65, 6910-6918.
60. Zhang Y., Zhang Y. F., Bryant J., Charles A., Boado R. J., Pardridge W. M., (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10, 3667-3677.
61. Mikhaylova M., Stasinopoulos I., Kato Y., Artemov D., Bhujwala Z. M., (2009), *Cancer Gene Ther.*, 16, 217-226.
62. Zhang Z., Yang X., Zhang Y., Zeng B., Wang S., Zhu T., Roden R. B., Chen Y., Yang R., (2006), *Clin. Cancer Res.*, 12, 4933-4939.
63. Yoshizawa T., Hattori Y., Hakoshima M., Koga K., Maitani Y., (2008), *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 70, 718-725.
64. Dong K., Wang R., Wang X., Lin F., Shen J. J., Gao P., Zhang H. Z., (2009), *Breast Cancer Res. Treat.*, 113, 443-456.
65. Zamora-Avila D. E., Zapata-Benavides P., Franco-Molina M. A., Saavedra-Alonso S., Trejo-Avila L. M., Resendez-Perez D., Mendez-Vazquez J. L., Isaias-Badillo J., Rodríguez-Padilla C., (2009), *Cancer Gene Ther.*, 16, 892-899.
66. Shi X. H., Liang Z. Y., Ren X. Y., Liu T. H., (2009), *Cancer Gene Ther.*, 16, 227-236.
67. Wesolowska A., Kwiatkowska A., Slomnicki L., Dembinski M., Master A., Sliwa M., Franciszkiewicz K., Chouaib S., Kaminska B., (2008), *Oncogene*, 27, 918-930.
68. Halder J., Kamat A. A., Landen C. N., Jr., Han L. Y., Lutgendorf S. K., Lin Y. G., Merritt W. M., Jennings N. B., Chavez-Reyes A., Coleman R. L., Gershenson D. M., Schmandt R., Cole S. W., Lopez-Berestein G., Sood A. K., (2006), *Clin. Cancer Res.*, 12, 4916-4924.
69. Tsutsumi K., Yamaura T., Nakajima M., Honda T., Kasaoka T., (2009), *Cancer Biol. Ther.*, 8, 1292-1299.
70. Tsutsumi K., Kasaoka T., Park H. M., Nishiyama H., Nakajima M., Honda T., (2008), *Int. J. Oncol.*, 33, 215-224.
71. Li S., Dong W., Zong Y., Yin W., Jin G., Hu Q., Huang X., Jiang W., Hua Z. C., (2007), *Mol. Ther.*, 15, 515-523.
72. Stein U., Walther W., Stege A., Kaszubiak A., Fichtner I., Lage H., (2008), *Mol. Ther.*, 16, 178-186.
73. Shi Z., Liang Y. J., Chen Z. S., Wang X. W., Wang X. H., Ding Y., Chen L. M., Yang X. P., Fu L. W., (2006), *Cancer Biol. Ther.*, 5, 39-47.
74. Pan G. D., Yang J. Q., Yan L. N., Chu G. P., Liu Q., Xiao Y., Yuan L., (2009), *World J. Gastroenterol.*, 15, 431-440.
75. Kunigal S., Lakka S. S., Gondi C. S., Estes N., Rao J. S., (2007), *Int. J. Cancer*, 121, 2307-2316.
76. Zhou H., Tang Y., Liang X., Yang X., Yang J., Zhu G., Zheng M., Zhang C., (2009), *Int. J. Cancer*, 125, 453-462.
77. Zhao F., Zhang Q., Kang C., Cui X., Wang T., Xu P., Zhou X., Liu J., Song X., (2009), *Med. Oncol.*, DOI10.1007/12032-009-9285-X.
78. Jonson A. L., Rogers L. M., Ramakrishnan S., Downs L. S., Jr., (2008), *Gynecol. Oncol.*, 111, 356-364.
79. Fujii T., Saito M., Iwasaki E., Ochiya T., Takei Y., Hayashi S., Ono A., Hirao N., Nakamura M., Kubshiro K., Tsukazaki K., Aoki D., (2006), *Int. J. Oncol.*, 29, 541-548.
80. Li X., Liu X., Li C. Y., Ding Y., Chau D., Li G., Kung H. F., Lin M. C., Peng Y., (2006), *Int. J. Oncol.*, 29, 595-603.
81. Zukiel R., Nowak S., Wyszko E., Rolle K., Gawronska I., Barciszewska M. Z., Barciszewski J., (2006), *Cancer Biol. Ther.*, 5, 1002-1007.
82. Rolle K., Nowak S., Wyszko E., Nowak M., Zukiel R., Piestrzeniewicz R., Gawronska I., Barciszewska M. Z., Barciszewski J., (2010), *Cancer Biol. Ther.*, 9, (w druku).



83. Bitko V., Musiyenko A., Shulyayeva O., Barik S., (2005), *Nat. Med.*, 11, 50-55.
82. Sipa K., Sochacka E., Kazmierczak-Baranska J., Maszewska M., Janicka M., Nowak G., Nawrot B., (2007), *RNA*, 13, 1301-1316.
83. Choi S. W., Lee S. H., Mok H., Park T. G., (2009), *Biotechnol. Prog.*, 26, 57-63.
84. Tschuch C., Schulz A., Pscherer A., Werft W., Benner A., Hotz-Wagenblatt A., Barrionuevo L. S., Lichter P., Mertens D., (2008), *BMC Mol. Biol.*, 9, 60.
85. Scacheri P. C., Rozenblatt-Rosen O., Caplen N. J., Wolfsberg T. G., Umayam L., Lee J. C., Hughes C. M., Shanmugam K. S., Bhattacharjee A., Meyerson M., Collins F. S., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 1892-1897.