



## RNAi w terapii

Katarzyna Kubiak, Barbara Nawrot

Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych  
i Makromolekularnych, Polska Akademia Nauk, Łódź

### RNAi in therapy

#### Summary

The discovery of RNA interference caused a revival of the concept of short nucleic acids application as molecular tools for therapeutic control of gene expression. After almost a decade of intensive research by leading pharmaceutical companies, there is only a limited number of clinical trials of synthetic siRNAs. In this review, we shall summarize the present status of knowledge of RNAi mechanism of action and discuss the potential of the use of siRNA in therapy. We shall also provide data on recent achievements in current clinical trials based on RNAi techniques.

#### Key words:

siRNA, RNAi therapy, chemical modification, clinical trial.

### 1. Wstęp

Prawie 20 lat temu poczyniono pierwsze obserwacje zjawiska potranskrypcyjnego wyciszania genów w organizmach roślin (PTGS, ang. *posttranscriptional gene silencing*) (1,2) i grzybów (ang. *quelling*) (3). Wówczas te systemy, zabezpieczające przed inwazją transpozonów i wirusów, uważano za specyficzne wyłącznie dla niższych organizmów. Termin „interferencja RNA” (RNAi, ang. *RNA interference*) został po raz pierwszy użyty przez Andrew Fire’a i Craiga Mello do opisu wyciszenia genów, wywołanego wbrew założeniom prowadzonego doświadczenia, po podaniu do organizmu nicienia *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) długich, dwuniciowych cząsteczek RNA (4). Fire i Mello zostali w 2006 r. wyróżnieni Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny, ponieważ jako

#### Adres do korespondencji

Barbara Nawrot,  
Zakład Chemii  
Bioorganicznej, Centrum  
Badań Molekularnych  
i Makromolekularnych,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Sienkiewicza 112,  
90-363 Łódź;  
bnawrot@bio.cbmm.lodz.pl

#### biotechnologia

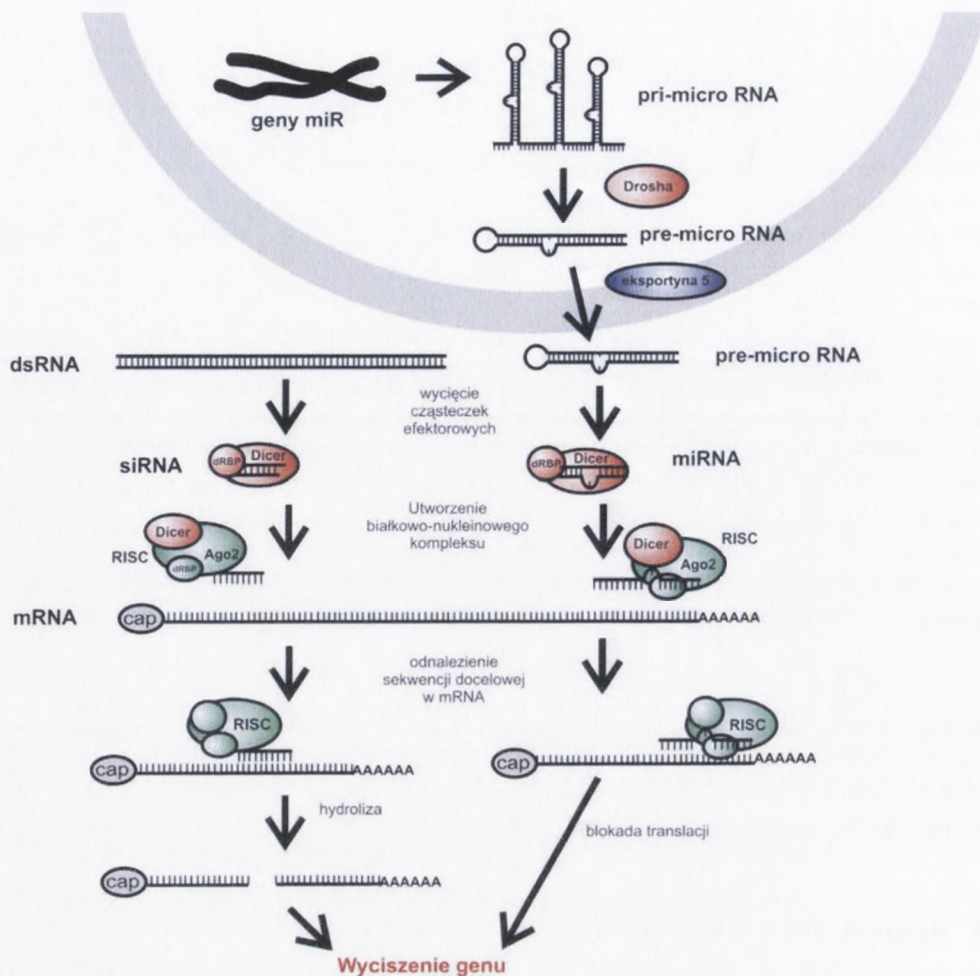
1 (84) 132–151 2009

pierwsi wskazali dwuniciowe cząsteczki RNA jako czynnik wywołujący wyciszenie homologicznego genu. Trzy lata po opublikowaniu tej przełomowej pracy, grupie badaczy kierowanej przez Thomasa Tuschla udało się zidentyfikować w ekstraktach komórek owadów wycinane z długich RNA cząsteczki efektorowe, tzw. krótkie interferujące RNA (siRNA, ang. *short interfering RNA*) (5,6). Odkrycie to otworzyło drogę do wyciszenia genów w komórkach ssaków za pośrednictwem syntetycznych siRNA (7). Zastosowanie krótkich dupleksów RNA pozwala na pominięcie obrony przeciw-wirusowej, indukowanej przez cząsteczki dwuniciowego RNA dłuższe niż 30 par zasad (8). W miarę postępu badań nad interferencją RNA wykazano ścisły związek tego zjawiska z opisanym wcześniej PTGS. Także mechanizm działania tzw. mikroRNA (miRNA) ma szereg wspólnych elementów z RNAi (9). MikroRNA są cząsteczkami regulatorowymi, kontrolującymi poziom ekspresji wielu genów. Od ich aktywności zależy przebieg tak istotnych procesów jak różnicowanie komórek, czy nowotworzenie (10). W regulacji ekspresji genów na drodze RNAi, indukowanej za pomocą zarówno siRNA jak i miRNA, uczestniczą enzymy należące do jednej rodziny białek – *Argonaute* (11,12). Istnieją liczne dowody świadczące także o udziale krótkich RNA w procesach kondensacji heterochromatyny (13). Dokładne poznanie tych nowo odkrytych, ale starych ewolucyjnie mechanizmów być może otworzy w niedalekiej przyszłości możliwość ingerencji terapeutycznej w ekspresję genów z użyciem krótkich cząsteczek RNA. Już dziś siRNA są powszechnie stosowanymi narzędziami do badania funkcji genów, a jako potencjalne terapeutyki znajdują się w centrum zainteresowania koncernów farmaceutycznych. Przegląd ten ma na celu przybliżenie czytelnikowi stanu wiedzy na temat tej niezwykle dynamicznie rozwijającej się dziedziny badań.

## 2. Mechanizm interferencji RNA

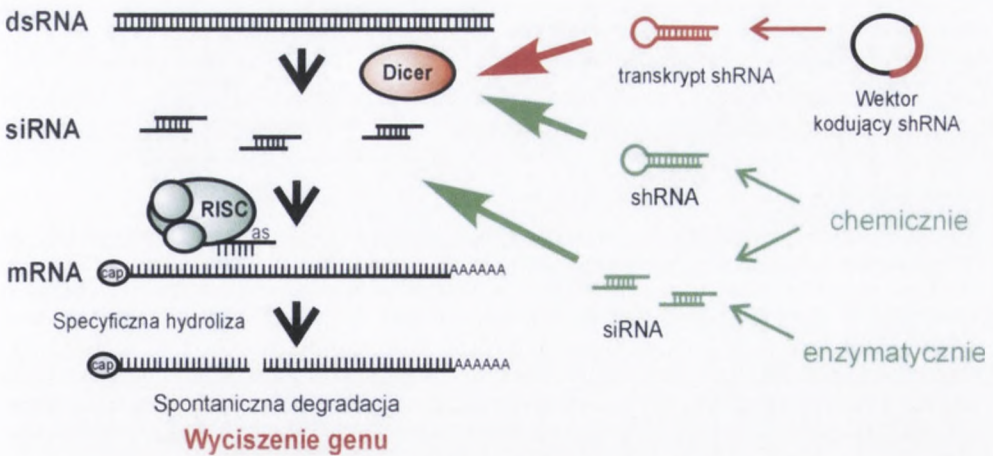
Uproszczony schemat mechanizmu interferencji RNA przedstawiono na rysunku 1. W organizmach ssaków jednym z procesów kontroli ekspresji genów jest interferencja RNA indukowana za pomocą mikroRNA (miRNA). Cząsteczki miRNA powstają w wyniku hydrolizy kodowanych w genomie prekursorów długości kilkudziesięciu nukleotydów, noszących nazwę pri-mikroRNA. W jądrze prekursorzy te są hydrolizowane za pomocą nukleazy Drosha do pre-mikroRNA (o strukturze niedoskonałej spinki do włosów), a następnie eksportowane z jądra z udziałem eksportyny 5. W cytoplazmie pre-miRNA jest poddawane dalszej hydrolizie przez nukleazę Dicer. Białko to pośredniczy w tworzeniu kompleksu efektorowego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). Wybór aktywnej nici miRNA, która zostaje włączona do RISC zależy od względnej trwałości termodynamicznej końców dupleksu – przejściowego produktu hydrolizy katalizowanej przez Dicer (14). Wiodącą staje się ta nić, której koniec 5' jest słabiej zaangażowany w wiązania Watsona-Cricka z drugą nicią w tym dupleksie (15). Po związaniu z białkami kompleksu RISC cząsteczka





Rys. 1. Mechanizm interferencji RNA wywołany za pomocą siRNA i miRNA. Częsteczki miRNA (miR) są kodowane w genomie i transkrybowane do pri-miRNA. Prekursory te są hydrolizowane przez nukleazę Drosha do pre-miRNA, które są transportowane przez eksportynę 5 z jądra do cytoplazmy. Częsteczki długich dwuniciowych RNA (dsRNA) i pre-miRNA o strukturze spinki do włosów (trzon-pętla) są substratami dla rybonukleazy Dicer. W wyniku hydrolizy powstają krótkie dupлексы RNA (siRNA i miRNA) rozpoznawane przez kompleks białkowy RISC. Jeśli nić RNA włączona do RISC jest w pełni komplementarna do docelowej częsteczki mRNA następuje ujawnienie rybonukleazowej aktywności RISC i hydroliza mRNA. Jeśli natomiast nić wiodąca nie jest w pełni komplementarna, następuje wyciszenie genu poprzez zahamowanie procesu translacji.

miRNA staje się sondą, służącą do rozpoznania sekwencji częściowo komplementarnej w obszarach 3'-UTR (ang. *untranslated region*) docelowego mRNA (16,17). Częsteczki mRNA związane z aktywnym kompleksem RISC nie podlegają translacji – są kierowane do ciałek P, w których może nastąpić ich enzymatyczna degradacja lub tymczasowe wyłączenie z translacji (18).

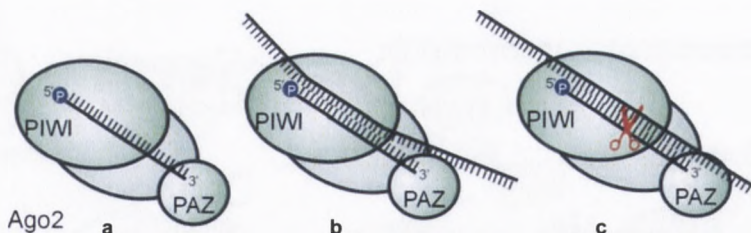


Rys. 2. Metody generowania dupleksów siRNA stosowanych do wyciszania ekspresji genów w komórkach ssaków. Częsteczki siRNA lub shRNA mogą być otrzymywane chemicznie, enzymatycznie, lub generowane wewnątrzkomórkowo poprzez ekspresję kodujących je wektorów. Częsteczki shRNA, będące produktami ekspresji wektorów, jak i te podawane z zewnątrz, są substratami dla rybonukleazy Dicer.

Cząsteczki długich dwuniciowych RNA indukują RNAi u niższych organizmów, jak np. u *C. elegans*. W komórkach ssaków możliwe jest wywołanie RNAi za pomocą syntetycznych dupleksów siRNA lub hydrolizowanych przez nukleazę Dicer cząsteczek RNA o strukturze typu spinki do włosów (shRNA, ang. *short hairpin RNA*) (rys. 2). Podczas tworzenia kompleksu RISC następuje hydroliza jednej z nici duplesu siRNA. Druga nić, zwana antysensową lub wiodącą (ang. *guide*) służy do odnalezienia komplementarnej sekwencji w obszarze kodującym docelowego mRNA. Hydroliza wiązania fosfodiesterowego w sekwencji mRNA następuje zawsze naprzeciwko wiązania pomiędzy 10 a 11 nukleotydem nici wiodącej, licząc od jej 5'-terminalnej grupy fosforanowej (6). Za aktywność nukleazową kompleksu RISC odpowiada białko Ago2 z rodziny *Argonaute* (19-21). Cząsteczka mRNA, w której nastąpiła hydroliza jednego wiązania internukleotydu pozbawiona jest ochrony w miejscu przecięcia, dlatego staje się celem nukleaz komórkowych i zostaje przez nie zdegradowana. Wykazano, że raz utworzony, aktywny, nukleinowo-białkowy kompleks RISC\* nie rozdykcjonuje po hydrolizie jednej cząsteczki mRNA, lecz katalizuje kolejne reakcje, co przyczynia się do wysokiej wydajności mechanizmu RNAi (22,23).

Dwoma etapami RNAi decydującymi o specyficzności wywołanego efektu wyciszenia jest wybór nici *guide* z duplesu siRNA (lub pre-miRNA) oraz odnalezienie komplementarnej sekwencji w docelowym mRNA. Selekcji nici wiodącej dokonuje Dicer w kompleksie z dwoma białkami wiążącymi dwuniciowe motywy RNA, tzw. białkami dsRBP (ang. *double stranded-RNA binding protein*). Białka te wiążą bardziej trwały termodynamicznie koniec duplesu siRNA (26). Białkami dsRBP w kompleksie





Rys. 3. Schemat wiązania antysensownej (wiodącej) nici siRNA w kompleksie z białkami RISC do cząsteczki mRNA (na podstawie cytowanej pracy (10)). (a) Schematyczna struktura aktywnego kompleksu RISC ze związaną cząsteczką nici wiodącej siRNA. Nić antysensowna siRNA tworzy kompleks z białkiem Ago2; 5'-terminalna grupa fosforanowa jest rozpoznawana przez domenę PIWI, zaś dwunukleotydowy koniec 3' jest wiązany przez domenę PAZ. (b) Rozpoznanie pomiędzy cząsteczką mRNA i końcem 5' nici wiodącej następuje w tzw. regionie *seed*; ważna jest komplementarność 7 nukleotydów od 2 do 8. (c) Po utworzeniu w pełni komplementarnego dupletu nici *guide* siRNA/mRNA ujawnia się nukleazowa aktywność kompleksu RISC i następuje hydroliza ściśle określonego wiązania fosfodiesterowego w mRNA, znajdującą się naprzeciwko wiązania pomiędzy nukleozydami 10 i 11 nici antysensownej.

ludzkiego Dicer są białko TRBP (ang. *human immunodeficiency virus transactivating response (HIV-1 TAR) RNA-binding protein*) (24) i białko PACT (ang. *protein activator of protein kinase PKR*) (25). Podobnie jak w przypadku miRNA, nicią wiodącą staje się ta, której 5'-koniec jest słabiej zaangażowany w wiązania Watsona-Cricka z komplementarną nicią w duplekcie. Dla prawidłowego rozpoznania docelowej sekwencji w mRNA decydujące znaczenie ma jej komplementarność z siedmioma nukleotydamy w pozycjach 2-8 od 5'-końca nici wiodącej siRNA, w tzw. rejonie *seed* (27,28) (rys. 3).

### 3. Krótkie RNA jako potencjalne terapeutyki

Jest wiele możliwych sposobów wykorzystania potencjału krótkich cząsteczek RNA w medycynie. Oczywistym celem dla terapii opartych na interferencji RNA są choroby, za których powstanie odpowiadają mutacje pojedynczego genu, jak np. fenylketonuria, anemia sierpowata, hemofilia. Obecnie szeroko prowadzone są badania nad zastosowaniem siRNA specyficznych dla genów, stanowiących dobrze zdefiniowany cel w terapii chorób, których etiopatologia jest znana. Obszar tych badań jest bardzo szeroki i obejmuje wiele chorób wirusowych, nowotworowych, neurodegeneracyjnych, a także metabolicznych. W kilku przypadkach pokazano możliwość allelospecyficznego wyciszania zmutowanego genu w systemie komórkowym (29). Powstało kilkadziesiąt firm biotechnologicznych pracujących nad rozwojem techniki RNAi, w większości korzystających z wcześniejszych doświadczeń w zakresie chemii kwasów nukleinowych. Trudno obecnie wskazać obszary medycyny, w których nie dąży się do zastosowania RNAi. Pomimo to, trwających badań klinicznych jest zaledwie kilka (tab.). Do najbardziej zaawansowanych należą terapie oparte na miejscowej aplikacji siRNA, które zostaną omówione w dalszej części tego przeglądu.

Tabela

## Prowadzone lub zapowiedziane badania kliniczne z zastosowaniem interferencji RNA

Schorzenie	Etap	Czynnik RNAi; nazwa	Sposób podania	Zaangażowane firmy
1	2	3	4	5
<b>CHOROBY OCZU</b>				
AMD (starcze zwyrodnienie plamki)	badania klin. faza I/II	siRNA na RTP801; RTP801i-14	iniekcja do gałki ocznej, 2'-OMe zmodyfikowane siRNA w liposomach (AtuPLEX)	Silence Therapeutics/ Atugen AG/Quark Pharma/Pfizer
	badania klin. faza II	siRNA na VEGFR; Sirna027/AGN211645	iniekcja do gałki ocznej, zmodyfikowane chemicznie siRNA w roztworze soli	Sirna/Merck/Allergan
	badania klin. faza II/III	siRNA na VEGF; Cand5	iniekcja do gałki ocznej, zmodyfikowane chemicznie siRNA w roztworze soli	Acuity/Opko
<b>INFEKcje WIRUSOWE</b>				
HBV, HCV	badania klin. faza I	eiRNA na 4 geny wirusa	wektory plazmidowe kodujące dwuniciowe RNA	Nucleonics
HCV	przedkliniczny	LNA-antimiR™ na miR122; SPC3649	„mixery” LNA i DNA, dożylnie	Santaris Pharma/Enzon
RSV (wirus zapalenia oskrzeli) wirus grypy	badania klin. faza II	siRNA	w areozolu donosowo, opłaszczony liposomami (SNALP)	Alnylam, Protiva
wirus grypy	przedkliniczny	siRNA na konserwatywne sekwencje	inhalacja	Nastech
CMV (2005)	przedkliniczny		miejscowo	CytRx (2005)
HIV-1	badania klin. faza I	shRNA	lentivirus kodujący także rybozym i TAR	Benitec/City of Hope
<b>NOWOTWORY</b>				
guzy lite	badania klin. faza I	siRNA na RRM2; CALAA-01	dożylnie, niezmodyfikowane siRNA w nanocząsteczkach	Calando
guzy lite (angiogeneza)	przedkliniczny (IND w 2008)	siRNA na VEGF i VEGFR; ICS-283	dożylnie, siRNA opłaszczony nanocząsteczkami (Nonoplex™)	Intradigm
nowotwory (angiogeneza)	przedkliniczny	siRNA	zmodyfikowane chemicznie siRNA, dożylnie w liposomach (AtuPLEX)	Silence Therapeutics



1	2	3	4	5
białaczka szpikowa ostra (AML), inne nowotwory, immunostymulacja	przedkliniczny	siRNA na białko li	siRNA w areozolu w roztworze z surfaktantami (RapidMist™)	Antigen Express/Generex Biotech
glejaki mózgu	badania kliniczne	dsRNA	iniekcja śródoperacyjna roztworu długiego dwuniciowego RNA	ICHB PAN/AM Poznań
białaczka limfocytowa (CLL)	badania klin. faza I/II	„RNA Antagonist” na Bcl2; SPC2996	„Gapmer” LNA i DNA, 2h wlew dożylny	Santaris Pharma/Enzon
<b>NOWOTWORY</b>				
złośliwe guzy lite	przedkliniczny	„RNA Antagonist” na surwiwinę; SPC3042	„Gapmer” LNA i DNA, dożylnie	Santaris Pharma/Enzon
różne nowotwory	badania klin. faza I/II	„RNA Antagonist” na HIF-1; SPC2968	„Gapmer” LNA i DNA, dożylnie	Santaris Pharma/Enzon
<b>CHOROBY UKŁADU NERWOWEGO</b>				
ALS (stwardnienie zanikowe boczne)	przedkliniczny	siRNA allelospecyficzne na zmutowane SOD1	chemicznie zmodyfikowane siRNA, miejscowo u myszy	CytRx
<b>CHOROBY METABOLICZNE</b>				
hipercholesterolemia	przedkliniczny u naczelnych	siRNA na PCSK9	dożylnie, siRNA opłaszczane liposomami	Alylam
	przedkliniczny	„RNA Antagonist” na apoB100	„Gapmer” LNA i DNA, dożylnie	Santaris Pharma/Enzon
	przedkliniczny	LNA-antimiR™ na miR122; SPC3649	„mixmery” LNA i DNA, dożylnie	Santaris Pharma/Enzon
otyłość i cukrzyca typu 2	przedkliniczny w myszach	siRNA na RIP140	N/A	CytRx
<b>INNE CHOROBY</b>				
stany zapalne	przedkliniczny	siRNA na TNF-alfa	formulacja z peptydami, podawane dożylnie	Nastech
ostra niewydolność nerek (ARF, AKI)	badania klin. faza I	siRNA na p53; AKI-5	2'-OMe zmodyfikowane siRNA w liposomach (AtuPLEX), dożylnie	Silence Ther/Atugen AG/Quark Pharma
autopourazowa utrata słuchu (AHL)	przedkliniczny (status IND)	siRNA na p53; AHLi-11	2'-OMe zmodyfikowane siRNA w liposomach (AtuPLEX), dożylnie	Atugen AG/Quark Pharma
przewlekła obstrucyjna choroba płuc (COPD)	przedkliniczny	siRNA na RTP801; CTPI-1	2'-OMe zmodyfikowane siRNA w liposomach (AtuPLEX), dożylnie	Atugen AG/Quark Pharma/Pfizer



Zastosowanie w praktyce leków opartych na kwasach nukleinowych jest bardzo trudne, co dobrze ilustruje ponad dwudziestoletnia historia badań w obszarze strategii antysensowych. Jedynie w dwóch przypadkach leki oligonukleotydowe doczekały się akceptacji przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*). Są to: Vitravene<sup>®</sup> (oligonukleotyd antysensowy stosowany w terapii zakażeń wirusem cytomegalii u chorych na AIDS) i Macugen<sup>®</sup> (aptamer VEGF, (ang. *vascular endothelial growth factor*), stosowany w terapii zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem (AMD, ang. *age-related macular degeneration*).

Jedną z przeszkód w terapeutycznym zastosowaniu siRNA jest ograniczony czas trwania efektu wyciszenia. Nadzieją na uniknięcie wielokrotnego podawania dawek leku jest zastosowanie wektorów wirusowych, zapewniających stabilną ekspresję kaset kodujących shRNA (30,31). Do tej grupy należą wektory lentiwirusowe, które integrują do genomu gospodarza i w związku z tym ich stosowanie niesie ryzyko uaktywnienia onkogenów. Natomiast wektory oparte na adenowirusach lub AAV (ang. *adeno-associated virus*) są bezpieczniejsze pod tym względem ponieważ ulegają ekspresji episomalnej, przejściowej. Obydwa typy wektorów są zdolne do infekowania komórek zarówno dzielących się, jak i nie dzielących się (32,33). Najczęściej w celu zapewnienia wydajnej ekspresji krótkich RNA stosuje się promotory dla polimerazy RNA typu III (U6 i H1). Jednakże duża skuteczność tych promotorów może w niektórych przypadkach być niepożądana. Istnieje ryzyko wysycenia aparatu enzymatycznego RNAi, a co za tym idzie, zakłócenia naturalnych szlaków regulacji ekspresji genów za pośrednictwem miRNA (34). Dotychczas tylko jeden wektor lentiwirusowy, kodujący shRNA razem z rybozymem i oligonukleotydem *decoy*, został zakwalifikowany przed FDA do I fazy badań klinicznych w terapii zakażenia HIV (35).

#### 4. Właściwości farmakokinetyczne syntetycznych siRNA

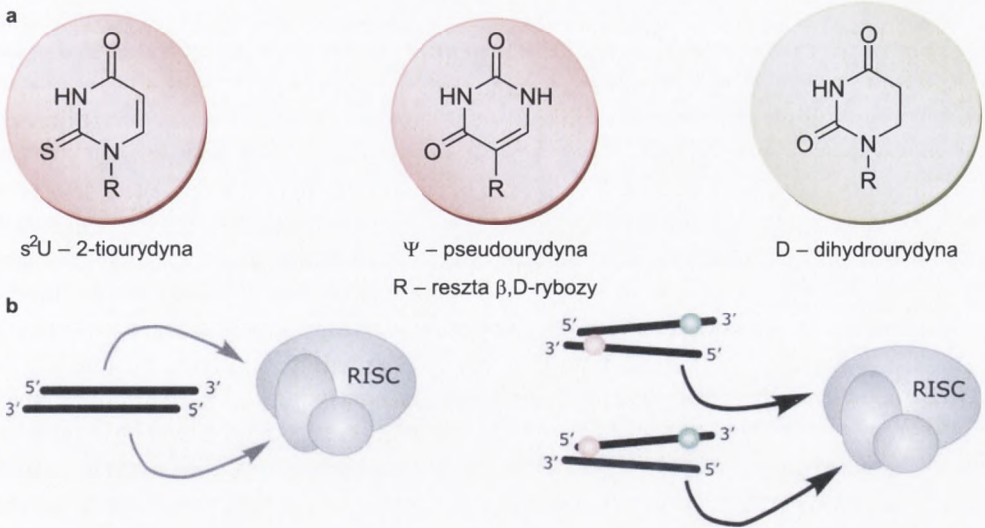
Większość prowadzonych obecnie badań klinicznych (tab.) wykorzystuje syntetyczne siRNA. Częstotki te, ze względu na wielkość i polianionowy charakter, nie są zdolne do przenikania przez błony cytoplazmatyczne bez pomocy transporterów. Ponadto są łatwo hydrolizowane przez nukleazy komórkowe, broniące organizm przed obcym materiałem genetycznym. Trzecim ograniczeniem dla wdrożenia technologii siRNA do zastosowań praktycznych są obserwowane efekty uboczne. Źródłem tych niepożądanych efektów są niespecyficzne wyciszenia genów (tzw. *off-target silencing*) oraz indukcja wydzielania interferonu przez siRNA zawierające sekwencje immunostymulujące (z motywem CpG). Wprowadzanie modyfikacji chemicznych do syntetycznych siRNA pozwala przewyciężyć część z wymienionych trudności. Skutecznym zabezpieczeniem cząsteczek RNA przed hydrolizą nukleolityczną są modyfikacje wiązania fosfodiesterowego atomem siarki lub borowodorem (36-38) oraz pozycji C2' pierścienia rybozy np. grupami 2'-OME oraz 2'-F. (39-42). Wzmoczone przenikanie przez błony komórkowe jest osiągnięte przez koniugowanie



siRNA z grupami lipofilowymi (np. z grupą cholesterolową (43)). Łączenie siRNA z peptydami będącymi ligandami receptorów tkankowych (44,45) lub z przeciwciałami dla tych receptorów (46) umożliwia transport tkankowospecyficzny. Dużym osiągnięciem, opublikowanym w „Nature” w lipcu 2007 r., było opracowanie warunków formulacji siRNA z peptydem, zapewniającym selektywny transport do neuronów po podaniu dożylnym (47). Peptyd ten pochodzi z glikoproteiny otoczki wirusa wścieklizny, i umożliwia efektywne przekraczanie bariery krew-mózg.

Kolejnym wyzwaniem w technologii RNAi jest poznanie przyczyn powstawania obserwowanych efektów ubocznych i ograniczenie ich skutków. Niespecyficzność cząsteczek siRNA do pewnego stopnia może być ograniczona poprzez dobór sekwencji docelowych. Do tego celu mogą służyć stale uaktualniane algorytmy selekcji, dostępne w sieci Internet (48-51). Jednakże nawet starannie zaprojektowane siRNA mogą powodować obniżenie lub podwyższenie poziomu ekspresji genów innych niż docelowy. Takie niespecyficzne efekty zostały zaobserwowane w szeregu badań z użyciem mikromacierzy DNA (52-57). W większości cytowanych doniesień zdemontowano wyraźną zależność poziomu efektów ubocznych od stężenia użytych siRNA. Fakt ten daje nadzieję na przezwyciężenie problemu niespecyficznych wyciszeń poprzez udoskonalanie cząsteczek siRNA (np. na drodze modyfikacji chemicznych) w taki sposób, aby osiągnąć wysoką skuteczność działania przy minimalnej dawce. Przyczyną zmian w poziomie ekspresji genów *off-target* może być częściowa komplementarność 5'-końca nici wiodącej siRNA (region *seed*) do innych niż docelowe mRNA. Istnieje także niebezpieczeństwo włączenia do aktywnego kompleksu białkowego RISC nici sensowej siRNA, (a zatem komplementarnej do nici zaprojektowanej jako wiodąca). W naszych badaniach zaproponowaliśmy oryginalne podejście do zwiększania termodynamicznej asymetryczności dupleksu poprzez wprowadzanie naturalnych, zmodyfikowanych nukleozydów (2-tiourydyny  $s^2U$ , pseudourydyny  $\Psi$  lub dihydrourydyny D) w terminalnych pozycjach obu nici siRNA. Wspomniano już, że pożądane jest wprowadzenie zróżnicowania termodynamicznego w taki sposób, aby koniec 5' nici wiodącej był mniej zaangażowany w wiązania Watsona-Cricka. Założenie to można zrealizować przez umieszczenie jednostki D w pozycji 19 nici sensowej („otwarcie” końca 5' dupleksu) oraz wprowadzenie jednostek  $s^2U$  i  $\Psi$  na 3'-końcu nici antysensowej lub 5'-końcu nici sensowej (zwiększenie termodynamicznej trwałości tego końca dupleksu) (rys. 4) (58). W naszych badaniach wskazujemy, że zwiększenie zróżnicowania trwałości termodynamicznej końców dupleksów przez wprowadzenie pojedynczych zmodyfikowanych nukleozasid zwiększa specyficzność i aktywność siRNA. Modyfikacje takie mogą znaleźć zastosowanie do zwiększenia aktywności allelospecyficznych siRNA. Selekcja nici wiodącej takiego dupleksu nie może być zaplanowana przez wybór odpowiedniej sekwencji zgodnie z algorytmem wyszukiwarki, gdyż siRNA musi być skierowane na obszar mRNA zawierający mutację punktową.





Rys. 4. (a) Struktury zmodyfikowanych nukleozydów, wbudowanych do cząsteczek siRNA; (b) Schemat wpływu modyfikacji na parametry termodynamiczne końców dupletu siRNA i wybór nici antysensowej do kompleksu RISC (58). Każda z nici symetrycznego siRNA może być rozpoznawana przez kompleks RISC jako nić wiodąca. Wprowadzenie  $s^2U$  lub  $\Psi$  na koniec 3' dupletu (zgodnie z polaryzacją nici *guide*) powoduje wzrost oddziaływań pomiędzy nićmi („zamknięcie dupletu”), zaś obecność D na końcu 5' dupletu obniża jego trwałość termodynamiczną („otwarcie dupletu”). W ten sposób wzrasta termodynamiczna asymetryczność siRNA i wybór nici wiodącej jest jednoznaczny.

## 5. siRNA w badaniach klinicznych

### 5.1. Choroby oczu

Obecnie najbardziej zaawansowane (II i III faza badań klinicznych) są testy cząsteczek siRNA hamujących neowaskularyzację w terapii mokrej postaci AMD. Omawiana jednostka chorobowa objawia się utratą wzroku u osób w podeszłym wieku, spowodowaną uszkodzeniem siatkówki (dokładnie plamki żółtej) przez nadmierne przerastające i pękające naczynia krwionośne. Najpowszechniej stosowaną terapią AMD jest operacja z użyciem lasera – metoda bardzo inwazyjna i rzadko skutkująca trwałym zatrzymaniem procesu utraty wzroku. Dotychczas najlepsze rezultaty uzyskano po zastosowaniu leków blokujących aktywność VEGF (np. wprowadzonego do leczenia oligonukleotydu o strukturze aptameru o nazwie Macugen). Podobną strategię przyjęto projektując siRNA do terapii AMD. W 2004 r. dwie konkurencyjne firmy ogłosiły początek badań klinicznych swoich siRNA. Cand5 z Acuity Pharmaceuticals (obecnie Opko), jest skierowane na mRNA białka VEGF. Natomiast celem dla 027siRNA z Sirna Therapeutics (przejętej przez Merck, współpracującej



obecnie z Allergan) jest mRNA receptora tego białka VEGFR. Wstępne wyniki są na tyle obiecujące, że obydwie związki zostały wprowadzone do dalszych faz badań klinicznych (odpowiednio II i III).

Kolejną firmą, która ogłosiła zakończenie wstępnych badań I fazy i rozpoczęcie II fazy badań klinicznych dla swojego siRNA w terapii AMD jest Atugen AG (we współpracy z firmami Silence Therapeutics, Quark Pharma i Pfizer). Podejście terapeutyczne w tym przypadku różni się od omówionego. Dupleksy siRNA skierowane są na gen RTP801, odkryty przez naukowców związanych z Quark Biotech (59). Gen ten ulega nadekspresji w warunkach niedotlenienia, stresu oksydacyjnego i niedokrwienia. Takie warunki pojawiają się w komórkach siatkówki podczas mikrowylewów w mokrej postaci AMD. Wstępne wyniki terapii, polegającej na iniekcji do ciała szklistego roztworu siRNA RTP801i-14, jak się wydaje, są bardziej obiecujące niż terapie skierowane na VEGF. Według komunikatu prezentowanego podczas „Keystone Symposium” w lutym 2007 r. badaną cząsteczką jest siRNA o tzw. tępych końcach, zawierające jednostki 2'-OMe w pozycjach naprzemiennych (co drugi nukleotyd). Miejscowe podawanie tego leku bezpośrednio do gałki ocznej pozwala na ograniczenie jego degradacji w płynach ogólnoustrojowych i zwiększa szansę na wprowadzenie tych siRNA na rynek farmaceutyczny. Lokalne podawanie leków do gałki ocznej wykorzystano już wcześniej w przypadku wspomnianych leków oligonukleotydowych, Vitravene i Macugen.

W trakcie redagowania tego przeglądu w „Nature” z kwietnia 2008 (452: 591-7) ukazała się publikacja, w której w wątpliwość poddano sekwencyjnie specyficzny mechanizm działania siRNA 027, prowadzący do wyciszenia genu VEGFR1. Sugeruje się raczej immunostymulujące działanie tego siRNA zachodzące poprzez aktywację receptora *toll-like* typu 3 (TLR3).

## 5.2. Infekcje wirusowe

Geny wirusów są atrakcyjnym celem w strategiach antysensowych, chociaż i w tym przypadku możliwość praktycznego zastosowania technologii RNAi zależy od sposobu dostarczenia aktywnych cząsteczek do komórek. Stosunkowo łatwe do wdrożenia są terapie stosujące aplikację miejscową, np. skierowane na geny wirusów wywołujących zapalenie oskrzeli RSV (ang. *Respiratory Syncytial Virus*). Badania takie, prowadzone przez firmę Alnylam, dotyczą siRNA o symbolu ALN-RSV01 skierowanego na mRNA białka nukleokapsydu (N) wirusa RSV. Lek podawany jest w postaci aerozolu aplikowanego do nosa lub inhalowanego do dolnych dróg oddechowych. Po potwierdzeniu braku toksyczności tak przygotowanego preparatu (dwuletnie badania kliniczne I fazy, prowadzone równolegle w Europie i w Stanach Zjednoczonych), jesienią 2007 r. rozpoczęto badania kliniczne II fazy. W badaniach tych biorą udział zdrowi ochotnicy, poddawani kontrolowanemu zakażeniu RSV i następnie leczeni preparatem ALN-RSV01. Alnylam prowadzi również badania na etapie



przedklinicznym nad terapią skojarzonego zakażenia RSV i wirusem grypy (60). Podjęto także próby konstrukcji siRNA specyficznych dla najbardziej zjadliwych szczepów wirusa grypy, takich jak np. H5N1.

Trwają intensywne badania nad opracowaniem terapii RNAi przeciwko dwóm najgroźniejszym, a wciąż niepokonanym wirusom: HIV-1 i HBV (ang. *hepatitis B virus*). W przypadku zakażeń tymi wirusami droga do sukcesu jest jednak trudniejsza ze względu na konieczność aplikacji ogólnoustrojowej. W obszarze badań przedklinicznych udało się wywołać wyciszenie praktycznie wszystkich genów wirusa HIV-1 (61). Jednakże dopiero jeden (wspomniany już) wektor lentiwirusowy, kodujący kasetę shRNA, skierowaną na konserwatywną sekwencję mRNA genu *tat/rev* wirusa HIV-1 został dopuszczony przez FDA do badań na pacjentach. W terapii tej zakłada się transfekcję *ex vivo* leukocytów CD34+ pobranych od chorego i ponowne ich wprowadzenie do organizmu pacjenta (tab.). Wektor ten, wytworzony w firmie Benitec, ma istotną zaletę, gdyż koduje jednocześnie kilka sekwencji aktywnych, oprócz shRNA, także rybozym typu *hammerhead* i oligonukleotyd *decoy* białka Tat (tzw. sekwencję TAR). Inhibitory te skierowane są na trzy różne cele, co ma zapobiegać szybkiemu „uodpornianiu się” wirusa na terapeutyk (62). Zastosowany w tym wektorze rybozym jest skierowany na ludzki gen koreceptora cytokinowego CCR5 (ang. *chemokine (C-C motif) receptor 5*). Jest to przykład podejścia, w którym jako docelowe wybiera się geny gospodarza, kodujące białka biorące udział w procesach wnikania lub replikacji wirusów. Gen CCR5 jest obiecującym celem, ponieważ udowodniono, że delecja 32 nukleotydów w jego sekwencji powoduje odporność na infekcję HIV-1 (63).

Badania nad opracowaniem terapii przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B są na etapie przedklinicznym. Niedawno doniesiono o skutecznym zahamowaniu infekcji HBV u myszy po podaniu siRNA opłaszczonych nanocząsteczkami lipidowymi (64) (tab.). Do dupleksów tych wprowadzono modyfikacje chemiczne, zapewniające stabilność RNA w surowicy i ograniczające skutki uboczne działania siRNA (aktywację odpowiedzi interferonowej) (64). Interesujące są również badania, w których wykazano, że wektory AAV kodujące 49 różnych shRNA, skierowanych na 6 genów wirusowych, wywołują skuteczne zahamowanie infekcji HBV u młodych myszy (do 5 miesięcy) (34). Jednakże jednocześnie zaobserwowano bardzo poważne skutki uboczne zastosowanej terapii, łącznie ze śmiercią zwierząt w przypadku podania 23 z 49 testowanych konstruktów. Efekt ten zależał zarówno od sekwencji shRNA, jak i stosowanych dawek wektora. Przyczyny takiego wyniku autorzy upatrują w zbyt długiej i wysokiej ekspresji shRNA, która spowodowała nasycenie systemu RNAi i zakłócenie naturalnych szlaków mikroRNA w wątrobach myszy. Jest to istotna wskazówka dla projektowania nowych terapii z wykorzystaniem technologii RNAi, opartych na ekspresji wysoko wydajnych wektorów wirusowych.



### 5.3. Choroby nowotworowe

W wielu ośrodkach naukowych prowadzone są intensywne badania zarówno nad identyfikacją dobrych celów terapeutycznych (65), jak i nad zastosowaniem technik RNAi w terapii nowotworów (66). Odnotowano przykłady zmniejszenia wielkości guza w mysich modelach różnych nowotworów po podaniu siRNA bezpośrednio do zmienionej tkanki. Stosunkowo nieliczne są przykłady uzyskania podobnego efektu po aplikacji ogólnoustrojowej. Jednym z pierwszych jest zastosowanie nanocząsteczek zawierających cyklodekstryny i znacznik transferynowy, zapewniający specyficzny transport siRNA do komórek nowotworowych w modelu *in vivo* (67). Ta sama firma, Calando Pharmaceuticals, ogłosiła w maju 2007 r. planowane rozpoczęcie I fazy badań klinicznych nad siRNA, oznaczonym symbolem CALAA-01, skierowanym na podjednostkę M2 reduktazy rybonukleinowej (68). Lek podano dożylnie makakom jawańskim, należącym do naczelnych (69) i za pomocą obrazowania *in vivo* zbadano lokalizację nanocząsteczek cyklodekstrynowych oraz nanocząsteczek zawierających dodatkowo na powierzchni znacznik transferynowy (70). Nie stwierdzono istotnych różnic w lokalizacji obu tych nośników, natomiast wykazano, że siRNA zawierające znacznik transferynowy wykazują aktywność wyższą o około 50%. Prawdopodobną przyczyną zwiększonego potencjału tak przygotowanych siRNA jest skuteczniejsze ich wnikanie do komórek rakowych.

Głównym konkurentem Calando w poszukiwaniu leków RNAi w zakresie onkologii jest Silence Therapeutics (firma brytyjska znana wcześniej pod nazwą SR Pharma), która współpracuje z firmą Atugen. Firma ta zapowiedziała wprowadzenie do badań klinicznych cząsteczek siRNA podawanych w liposomach projektowanych dla ograniczenia angiogenezy, (71). Inną firmą liczącą się w wyścigu o przeciwnowotworowe siRNA jest Intradigm. Firma ta dysponuje technologią zapewniającą komórkowo-specyficzny transport siRNA (72) i pracuje nad zahamowaniem ekspresji genów białka VEGF i jego receptora, w celu ograniczenia procesu angiogenezy.

Interesujące podejście do terapii przeciwnowotworowej (z zastosowaniem oryginalnej techniki formulacji leków w formie areozoli) prezentuje konsorcjum złożone z firmy Antigen Express i Generex. Badacze pracujący w pierwszej z tych firm zidentyfikowali siRNA zdolne do wyciszenia ekspresji białka li, odpowiedzialnego za „powstrzymanie” komórek MHC klasy II od prezentacji własnych antygenów przez komórki nowotworowe. Obniżenie aktywności białka li umożliwia rozwinięcie odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom guza (73). Po obiecujących wynikach badań na mysich modelach różnych nowotworów firmy zapowiedziały szybkie rozpoczęcie badań klinicznych w Chinach.

Warte odnotowania są pionierskie badania prowadzone w Polsce przez zespół prof. Barciszewskiego we współpracy z Kliniką Neurochirurgii i Neurotraumatologii Akademii Medycznej w Poznaniu nad zastosowaniem RNAi w terapii guzów mózgu (74). Do badań kwalifikowani są pacjenci ze zdiagnozowanymi nowotworami mózgu – glejakami wielopostaciowymi. W tych przypadkach średnie przeżycie po opera-



cyjnym usunięciu guza wynosi 8-10 miesięcy, natomiast tych pacjentów, u których wystąpi wznowa – 8 tygodni. Zespół prof. Barciszewskiego stosuje iniekcję roztworu dwuniciowego RNA o długości 164 par zasad, homologicznego do genu tenascyny C. Gen docelowy ulega ekspresji głównie w trakcie rozwoju, natomiast w zróżnicowanych tkankach, tylko w tych z reakcją zapalną na infekcję oraz w nowotworzeniu. W przypadku glejaków poziom ekspresji tenascyny C dobrze koreluje ze stopniem rozwoju guza. Iniekcje z roztworu RNA o objętości 200  $\mu$ L podawano po operacji usunięcia guza w nacieki, których nie można usunąć chirurgicznie. Wstępne wyniki badań są bardzo obiecujące – nie zaobserwowano nawrotu nowotworu w miejscach podania RNA (także w przypadkach, gdy w rejonach odległych od miejsca iniekcji guz narastał ponownie) (74). Opublikowane wyniki mają charakter wstępny, a badania nad dopracowaniem metody trwają. Jest to jedyna jak dotąd praca, w której pokazano zastosowanie interferencji RNA w terapii guzów mózgu u ludzi.

#### 5.4. Choroby metaboliczne

Alnylam ogłosił bardzo obiecujące wyniki badań przedklinicznych z siRNA skierowanym na gen PCSK9 (ALN-PCS01) na makakach jawajskich, u których we krwi uzyskano obniżenie poziomu cholesterolu LDL o 30-40%. Zespół już wcześniej odnotował sukcesy na polu wyciszania innego genu związanego z metabolizmem cholesterolu – apolipoproteiny B w modelu mysim za pomocą dostarczanych dożylnie, siRNA modyfikowanych chemicznie i opłaszczonych liposomami (75). Planowane jest wprowadzenie siRNA skierowanego na gen PCSK9 do badań klinicznych w terapii hipercholesterolemii.

Otyłość i cukrzyca typu 2 są chorobami społecznymi o coraz większym zasięgu na świecie. Uzasadnione jest zatem, jak się wydaje, zainteresowanie firmy CytRx cząsteczkami siRNA, skierowanymi na gen RIP140. Gen ten został zidentyfikowany jako odpowiedzialny za otyłość u myszy będących na diecie wysokokalorycznej (76).

#### 5.5. Choroby układu nerwowego

Żadna z firm farmaceutycznych, jak dotychczas, nie ogłosiła rozpoczęcia badań klinicznych w obszarze schorzeń centralnego układu nerwowego. Przyczyną trudności w opracowaniu skutecznej terapii opartej na siRNA jest transport tak dużych związków przez barierę krew-mózg. W licznych badaniach, przeprowadzonych na zwierzętach, potwierdzono skuteczność technik RNAi w wyciszaniu genów w neuronach, jednak opierały się one głównie na dostarczeniu miejscowym, aktywnych cząsteczek (iniekcja bezpośrednio do mózgu). W najbliższym czasie można się spodziewać przełomu w rozwoju metod specyficznego transportu siRNA, zwłaszcza po



ukazaniu się cytowanej już wcześniej pracy (46), dotyczącej zastosowania formułacji w RNA z peptydem pochodzenia wirusowego.

Jednym z potencjalnie obiecujących celów terapeutycznych dla zastosowań RNAi jest gen *SOD1*, którego mutacja punktowa wywołuje stwardnienie zanikowe boczne. Badania w modelu mysim nad allelospecyficznym siRNA, aplikowanym miejscowo prowadzi zespół związany z firmą CytRx (77) (tab.). Wiele ośrodków jest zaangażowanych w badania w obszarze chorób neurodegeneracyjnych. Nasze laboratorium ma udział w opracowaniu potencjalnej terapii choroby Alzheimera (AD), opartej na hipotezie kaskady amyloidowej. Zgodnie z tą hipotezą przyczyną degradacji neuronów, prowadzącej do demencji, jest powstawanie w przestrzeniach międzykomórkowych płytek złożonych głównie z peptydu zwanego beta-amyloidem (AB42). Potencjalnymi celami terapeutycznymi są zatem białka uczestniczące w jego sekrecji – m.in. beta-sekretaza (białko BACE1) (78-81).

## 6. Perspektywy wykorzystania mikroRNA w terapii

W miarę poznawania funkcji różnych miRNA odkryto, że zaburzenia w poziomie ich ekspresji są związane z rozwojem niektórych chorób. Rozważając terapie wykorzystujące tę wiedzę można przyjąć dwie strategie: eliminowanie cząsteczek miRNA, które ulegają nadekspresji w stanach patologicznych („anty-miRNA”) lub dodawanie dodatkowych kopii tych miRNA, których niedobór powoduje zaburzenia w komórce. Przykładem firmy rozwijającej badania w kierunku wyciszenia miRNA, które ulega nadekspresji w komórkach nieprawidłowo funkcjonującej wątroby (miR-122 regulujące około 100 genów zaangażowanych w metabolizm cholesterolu) jest Santaris Pharma. Firma ta zapowiada zastosowanie podejścia „anty-miR-122” w terapii zakażenia HCV oraz w hipercholesterolemii. Badane przez tę firmę cząsteczki to analogi oligonukleotydów złożone z jednostek DNA i LNA. Oligonukleotydy stabilizowane różnymi modyfikacjami chemicznymi mają za zadanie blokowanie aktywności miRNA na zasadzie komplementarności (bez aktywacji RNazy H) (82). Innym rozważanym podejściem do obniżenia ilości niepożądanego mikroRNA w komórce jest blokowanie pri-miRNA za pomocą oligonukleotydu TFO (ang. *triplex forming oligonucleotide*). Strategia taka jest obiecująca, zwłaszcza w przypadku policistronowych pri-miRNA, takich jak np. miR-17-92, ulegających nadekspresji w kilku nowotworach. Jedno takie pri-miRNA staje się źródłem całej rodziny efektorowych cząsteczek miRNA, regulujących ekspresję jednego genu.

Drugie z wymienionych podejść terapeutycznych (zwiększenie ilości konkretnego miRNA w komórce) może znaleźć zastosowanie w leczeniu kilku rodzajów nowotworów, jednak jest trudniejsze do osiągnięcia. Dostarczenie jednoniciowych oligonukleotydów, mających uzupełnić poziom brakującego miRNA jest trudniejsze niż podanie dupleksów siRNA, ze względu na ich niską trwałość chemiczną i enzymatyczną. Bardziej prawdopodobne, jak się wydaje, jest wykorzystanie do tego celu



wektorów kodujących cząsteczki prekursorowe pre-miRNA. W tym przypadku istotne jest zachowanie odpowiedniego poziomu ekspresji takiego transgenu, ze względu na wspomniane ryzyko zaburzenia działających poprawnie szlaków miRNA poprzez wysycenie komponentów białkowych mechanizmu RNAi. Największe znaczenie limitujące ma prawdopodobnie eksportyna 5, odpowiedzialna za transport pre-miRNA z jądra do cytoplazmy (82). Obecnie manipulowanie poziomami naturalnie występujących miRNA pozostaje raczej w sferze śmiałych projektów. Poza ograniczeniami wspólnymi z technologią siRNA także obecny stan wiedzy limituje wybór celów i możliwość przewidzenia efektów ubocznych. Jedna cząsteczka miRNA bierze z jednej strony udział w regulacji ekspresji kilku genów, a z drugiej jeden gen może być regulowany przez różne miRNA. Zmiana ilości konkretnego miRNA może doprowadzić zatem do trudnej do przewidzenia, złożonej odpowiedzi komórki lub efekt może być niezauważalny w fenotypie, bo zostanie zrekompensowany aktywnością innych miRNA (82).

## 7. Podsumowanie

Interferencja RNA to niewątpliwie jedno z najważniejszych odkryć ostatnich lat, które otworzyło wiele możliwości zastosowań w medycynie. Rzeczywisty postęp spowodowany tym odkryciem będziemy mogli ocenić już w ciągu kilku najbliższych lat, w czasie których spodziewana jest rejestracja pierwszych leków opartych na technologii RNAi. Liczba nowych terapii prawdopodobnie będzie się sukcesywnie zwiększać, w miarę poznawania naturalnych funkcji krótkich RNA w naszych organizmach i ich roli w powstawaniu różnych stanów patologicznych. Obiecujące są wstępne wyniki badań klinicznych po miejscowym zastosowaniu siRNA, jednak dopóki pierwsze cząsteczki nie przejdą pomyślnie III fazy badań klinicznych zainteresowania firm farmaceutycznych tą technologią będą ograniczone. Podstawowym problemem, ograniczającym praktyczne zastosowania terapii opartych na RNAi, pozostaje opracowanie skutecznych sposobów specyficznego transportu aktywnych cząsteczek do tkanek. Zastosowanie nanocząsteczek opłaszczonych ligandami dla receptorów powierzchniowych, specyficznych dla danego typu komórek, do tej pory budzi największe nadzieje na podawanie cząsteczek siRNA ogólnoustrojowo. Innym zagadnieniem do rozwiązania jest przedłużenie czasu trwania efektu wyciszenia. Opracowanie bezpiecznych wektorów zapewniających stabilną ekspresję siRNA umożliwiłoby uniknięcie częstego podawania leku i zmniejszyłoby ryzyko wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej organizmu. Obydwa wymienione wyzwania są podejmowane przez wiele zespołów badawczych zarówno zajmujących się chemią kwasów nukleinowych, jak i chemią polimerów, mogących tworzyć nanocząsteczki. Także w obszarze konstrukcji wektorów możliwych do zastosowania w terapii genowej daje się zauważyć duże ożywienie i postępy w testowaniu nowych metod wywoływania ekspresji shRNA w komórkach ssaków. Jedną z bardziej oryginalnych innowacji w tej dziedzinie jest tzw. „baktorefek-



cja" (83). Polega ona na dostarczeniu plazmidów, kodujących wyciszające cząsteczki do organizmu ssaka razem z pożywieniem zawierającym niepatologiczne bakterie. Mikroorganizmy wraz z plazmidami wchłaniane są przez komórki nabłonka jelit (np. *E. coli*) (84) lub samodzielnie wnikają do wnętrza komórek (np. *L. monocytogenes*) (85). Bakterie są następnie niszczone z użyciem odpowiedniego antybiotyku, a uwolnione setki plazmidów ulegają ekspresji. Skuteczność takiego podejścia pokazano w myszach, których jelita zostały w wyniku opisanego terapii uwolnione od groźnych polipów (nielezione polipy uzłośliwiają się do nowotworów) (84).

Po przewyżczeniu wspomnianych problemów możliwości zastosowań terapeutycznych RNAi będą ograniczone wyłącznie wiedzą na temat genetycznych przyczyn chorób.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu CRP/POL04-01 pt. *Beta-site APP cleaving enzyme (BACE) as therapeutic target for prevention of Alzheimer's disease* finansowanego przez ICGBE i projektu PBZ-MNiSW-07/I/2007 pt. *Modulacja aktywności wyciszającej krótkich interferujących RNA (siRNA) za pomocą modyfikacji chemicznych* finansowanego ze środków MNiSzW na naukę w latach 2008-2010. Jedną z autorek (Katarzyna Kubiak (Sipa)) otrzymywała w 2007 r. stypendium L'Oreal Polska dla Kobiet i Nauki przy wsparciu Polskiego Komitetu ds. UNESCO.

## Literatura

1. van der Krol A. R., Mur L. A., de Lange P., Mol J. N., Stuitje A. R., (1990), *Plant Mol. Biol.*, 14, 457-466.
2. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R., (1990), *Plant Cell*, 2, 279-289.
3. Romano N., Macino G., (1992), *Mol. Microbiol.*, 6, 3343-3353.
4. Fire A., Xu Si Q., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., (1998), *Nature*, 391, 806-813.
5. Elbashir S., Lendeckel W., Tuschl T., (2001a), *Genes Dev.*, 15, 188-200.
6. Elbashir S. M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W., Tuschl T., (2001b), *EMBO J.*, 20, 6877-6888.
7. Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T., (2001), *Nature*, 411, 494-498.
8. Caplen N. J., Parrish S., Imani F., Fire A., Morgan R. A., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 9742-9747.
9. Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V., (1993), *Cell*, 75, 843-854.
10. Rane S., Sayed D., Abdellatif M., (2007), *Cell Cycle*, 6, 1850-1855.
11. Hammond S. M., (2005), *FEBS Lett.*, 579, 5822-5829.
12. Collins R. E., Cheng X., (2005), *FEBS Lett.*, 579, 5841-5849.
13. Mathieu O., Bender J., (2004), *J. Cell. Sci.*, 117, 4881-4888.
14. Maniatakis E., Mourelatos Z., (2005) *Genes Dev.*, 19, 2979-2990.
15. Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S. D., (2003), *Cell*, 115, 209-216.
16. Olsen P. H., Ambros V., The (1999), *Dev. Biol.*, 216, 671-680.
17. Zeng Y., Wagner E. J., Cullen B. R., (2002), *Mol. Cell.*, 9, 1327-1333.
18. Chan S. P., Slack F. J., (2006), *RNA Biol.*, 3, 97-100.
19. Song J. J., Smith S. K., Martienssen R. A., Hannon G. J., Joshua-Tor L., (2004), *Science*, 305, 1434-1437.
20. Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G., Tuschl T., (2004), *Mol. Cell*, 15, 185-197.



21. Liu J., Carmell M. A., Rivas F. V., Marsden C. G., Thomson J. M., Song J. J., Hammond S. M., Joshua-Tor L., Hannon G. J., (2004), *Science*, 305, 1437-1441.
22. Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Luhrmann R., Tuschl T., (2002), *Cell*, 110, 563-574.
23. Schwarz D. S., Hutvagner G., Haley B., Zamore P. D., (2002), *Mol. Cell.*, 10, 537-548.
24. Chendrimada T. P., Gregory R. I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R., (2005), *Nature*, 436, 740-744.
25. Lee Y., Hur I., Park S. Y., Kim Y. K., Suh M. R., Kim V. N., (2006), *EMBO J.*, 25, 522-532.
26. Schwarz D. S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P. D., (2003), *Cell*, 115, 199-208.
27. Parker J. S., Roe S. M., Barford D., (2005), *Nature*, 434, 663-666.
28. Ma J. B., Yuan Y. R., Meister G., Pei Y., Tuschl T., Patel D. J., (2005), *Nature*, 434, 666-670.
29. Miller V. M., Xia H., Marrs G. L., Gouvion C. M., Lee G., Davidson B. L., Paulson H. L., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 7195-7200.
30. Wadhwa R., Kaul S. C., Miyagishi M., Taira K., (2004), *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 6, 367-372.
31. Amarzguioui M., Rossi J. J., Kim D., (2005), *FEBS Lett.*, 579, 5974-5981.
32. Zentilin L., Giacca M., (2004), *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 5, 341-347.
33. Clayton J., (2004), *Nature*, 431, 599-605.
34. Grimm D., Streetz K. L., Jopling C. L., Storm T. A., Pandey K., Davis C. R., Marion P., Salazar F., Kay M. A., (2006), *Nature*, 441, 537-541.
35. <http://www.benitec.com/PRDownloads/HIV-study-in-humans-130607.pdf>
36. Li Z. Y., Mao H., Kallick D. A., Gorenstein D. G., (2005), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329, 1026-1030.
37. Braasch D. A., Paroo Z., Contantinescu A., Ren G., Oz O. K., Mason R. P., Corey D. R., (2004), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 1139-1143.
38. Hall A. H. S., Wan J., Shaughnessy E. E., Ramsay Shaw B., Alexander K. A., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, 5991-6000.
39. Prakash T. P., Allerson C. R., Dande P., Vickers T. A., Sioufi N., Jarres R., Baker B. F., Swayze E. E., Griffey R. H., Bhat B., (2005), *J. Med. Chem.*, 48, 4247-4253.
40. Amarzguioui M., Holen T., Babaie E., Prydz H., (2003), *Nucleic Acids Res.*, 31, 589-595.
41. Braasch D. A., Jensen S., Liu Y., Kaur K., Arar K., White M. A., Corey D. R., (2003), *Biochemistry*, 42, 7967-7975.
42. Chiu Y. L., Rana T. M., (2003), *RNA*, 9, 1034-1048.
43. Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constein R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavine G., Pandey R. K., Racie T., Rajeev K. G., Rohl I., Toudjarska I., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Koteliensky V., Limmer S., Manoharan M., Vornlocher H. P., (2004), *Nature*, 432, 173-178.
44. Zhang Y., Boado R., Pardridge W., (2003), *J. Gene Med.*, 5, 1039-1045.
45. Pardridge W. M., (2004), *Expert Opin. Biol. Ther.*, 4, 1103-1113.
46. 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.
47. Kumar P., Wu H., McBride J. L., Jung K-E., Kim M. H., Davidson B. L., Lee S. K., Shankar P., Manjunath N., (2007), *Nature*, 448, 39-45.
48. <http://www.dharmacon.com/sidesign>
49. [http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)
50. <http://www.cluster-1.mpi-cbg.de/Deqor/deqor.html>
51. Naito Y., Yamada T., Ui-Tei K., Morishita S., Saigo K., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, W124-129.
52. Jackson A. L., Linsley P. S., (2004), *Trends Genet.*, 20, 521-524.
53. Jackson A. L., Bartz S. R., Schelter J., Kobayashi S. V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsley P. S., (2003), *Nat. Biotech.*, 21, 635-637.
54. Chi J. T., Chang H. Y., Wang N. N., Chang D. S., Dunphy N., Brown P. O., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6343-6346.
55. Semizarov D., Frost L., Sarthy A., Kroeger P., Halbert D. N., Fesik S. W., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6347-6352.



56. Persengiev S. P., Zhu X., Green M. R., (2004), *RNA*, 10, 12-18.
57. Sledz C. A., Holko M., de Veer M. J., Silverman R. H., Williams B. R. G., (2003), *Nat. Cell Biol.*, 5, 834-839.
58. Sipa K., Sochacka E., Kaźmierczak-Barańska J., Maszewska M., Janicka M., Nowak G., Nawrot B., (2007), *RNA*, 13, 1301-1316.
59. Shoshani T., Faerman A., Mett I., Zelin E., Tenne T., Gorodin S., Moshel Y., Elbaz S., Budanov A., Chajut A., Kalinski H., Kamer I., Rozen A., Mor O., Keshet E., Leshkowitz D., Einat P., Skaliter R., Feinstein E., (2002), *Mol. Cel. Biol.*, 22, 2283-2293.
60. Bitko V., Musiyenko A., Shulyayeva O., Barik S., (2005), *Nature Med.*, 11, 50-55.
61. Rossi J. J., (2006), *Biotechniques*, 40, 25-29.
62. Li M. J., Kim J., Li S., Zaia J., Yee J. K., Anderson J., Akkina R., Rossi J. J., (2005), *Mol. Ther.*, 12, 900-909.
63. Huang Y., Paxton W. A., Wolinsky S. M., Neumann A. U., Zhang L., He T., Kang S., Ceradini D., Jin Z., Yazdanbakhsh K., Kunstman K., Erickson D., Dragon E., Landau N. R., Phair J., Ho D. D., Koup R. A. (1996), *Nat. Med.*, 2, 1240-1243.
64. Morrissey D. V., Lockridge J. A., Shaw L., Blanchard K., Jensen K., Breen W., Hartsough K., Macheemer L., Radka S., Jadhav V., Vaish N., Zinnen S., Vargeese C., Bowman K., Shaffer C. S., Jeffs L. B., Judge A., Mac Lachlan I., Polisky B., (2005), *Nat. Biotechnol.*, 23, 1002-1007.
65. Iorns E., Lord C. J., Turner N., Ashworth A., (2007), *Nature Rev.*, 6, 556-558.
66. Pai S. I. Lin Y. Y., Macaes B., Meneshian A., Hung C. F., Wu T. C., (2006), *Gene Ther.*, 13, 464-477.
67. Hu-Lieskovan S., Heidel J. D., Bartlett D. W., Davis M. E., Triche T. J., (2005), *Cancer Res.*, 65, 8984-8992.
68. Heidel J. D., Liu J. Y., Yen Y., Zhou B., Heale B. S., Rossi J. J., Bartlett D. W., Davis M. E., (2007), *Clin. Cancer Res.*, 13, 2207-2215.
69. Heidel J. D., Yu Z., Liu J. Y., Rele S. M., Liang Y., Zeidan R. K., Kornbrust D. J., Davis M. E., (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104, 5715-5721.
70. Bartlett D. W., Su H., Hildebrandt I. J., Weber W. A., Davis M. E., (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104, 15549-15554.
71. Santel A., Aleku M., Keil O., Endruschat J., Esche V., Fisch G., Dames S., Löffler K., Fechtner M., Arnold W., Giese K., Klippel A., Kaufmann J., (2006), *Gene Ther.*, 13, 1222-1234.
72. Schiffelers R. M., Ansari A., Xu J., Zhou Q., Tang Q., Storm G., Molema G., Lu P. Y., Scaria P. V., Woodle M. C., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, e149.
73. Xu M., Lu X., Kallinteris N. L., Wang Y., Wu S., von Hofe E., Gulfo J. V., Humphreys R. E., Hillman G. G., (2004), *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 6, 160-165.
74. Zukiel R., Nowak S., Wyszko E., Rolle K., Gawrońska I., Barciszewska M. Z., Barciszewski J., (2006), *Cancer Biol. Ther.*, 5, 1002-1007.
75. Zimmermann T. S., Lee A. C., Akinc A., Bramlage B., Bumcrot D., Fedoruk M. N., Harborth J., Heyes J. A., Jeffs L. B., John M., Judge A. D., Lam K., McClintock K., Nechev L. V., Palmer L. R., Racie T., Röhl I., Seiffert S., Shanmugam S., Sood V., Soutschek J., Toudjarska I., Wheat A. J., Yaworski E., Zedalis W., Koteliansky V., Manoharan M., Vornlocher H. P., MacLachlan I., (2007), *Nature*, 441, 111-113.
76. Powelka A. M., Seth A., Virbasius J. V., Kiskinis E., Nicoloso S. M., Guilherme A., Tang X., Straubhaar J., Cherniack A. D., Parker M. G., Czech M. P., (2006), *J. Clin. Invest.*, 116, 125-136.
77. Ding H. L., Schwarz D. S. Keene A., Affar E., Fenton L., Xia X. G., Shi Y., Zamore P. D., Xu Z. S., (2003), *Aging Cell*, 2, 209-217.
78. Kao S., Krichevsky A., Kosik K., Tsai L., (2004), 279, 1942-1949.
79. Nawrot B., Sipa K., Widera K., Antoszczyk A., Sierant M., Wojcik M., Maszewska M., (2005), *Proceedings of JMMC*, Eds. P. Ettmayer, G. Ecker, Medimond S.r.l., Vienna, 49-54.
80. Nawrot B., (2004), *Acta Biochim. Pol.*, 51, 431-444.
81. Nawrot B., Antoszczyk S., Maszewska M., Kuwabara T., Warashina M., Taira K., Stec W. J., (2003), *Eur. J. Biochem.*, 270, 3962-3970.
82. Esau C. C., Monia B. P., (2007), *Adv. Drug Discov. Rev.*, 59, 101-114.
83. Palfy R., Gardlik R., Hodosy J., Behuliak M., Resko P., Radvansky J., Celec P., (2006), *Gene Ther.*, 13, 101-105.



84. Xiang S., Fruehauf J., Li C. J., (2006), *Nat. Biotechnol.*, 24, 697-702.
85. Hense M., Domann E., Krusch S., Wachholz P., Dittmar K. E., Rohde M., Wehland J., Chakraborty T., Weiss S., (2001), *Cell Microbiol.*, 3, 599-609.
86. Kleinman M. E., Yamada K., Takeda A., Chandrasekaran V., Nozaki M., Baffi J. Z., Albuquerque R. J., Yamasaki S., Itaya M., Pan Y., Appukuttan B., Gibbs D., Yang Z., Karikó K., Ambati B. K., Wilgus T. A., DiPietro L. A., Sakurai E., Zhang K., Smith J. R., Taylor E. W., Ambati J., (2008), *Nature*, 452, 591-597.