

УДК 577.218

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ siРНК И НЕВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ ИХ ДОСТАВКИ

© 2012 г. К. В. Глебова¹, А. В. Марахонов¹, А. В. Баранова^{1,2}, М. Ю. Скоблов^{1*}

¹Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук, Москва, 115478 Россия

²School of Systems Biology, George Mason University, Fairfax, VA 22003 USA

Поступила в редакцию 12.09.2011 г.

Принята к печати 10.10.2011 г.

Ген-направленная терапия с помощью малых интерферирующих РНК (siРНК) обладает огромным потенциалом и в будущем, несомненно, займет одну из лидирующих позиций среди других методов лечения различного рода заболеваний и расстройств. На пути успешного внедрения этого метода в клинику стоит проблема разработки эффективных систем адресной доставки siРНК. Для конструирования таких систем необходимо детальное понимание взаимодействий между siРНК, системами ее доставки и биологическими организмами. Данный обзор посвящен свойствам терапевтических siРНК и невирусных систем ее доставки.

Ключевые слова: РНК-интерференция, siРНК, доставка siРНК.

THERAPEUTIC siRNAs AND NON-VIRAL SYSTEMS FOR THEIR DELIVERY, by K. V. Glebova¹, A. V. Marakhonov¹, A. V. Baranova^{1,2}, M. Yu. Skoblov^{1*} (¹Research Center for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia; *e-mail: mskoblov@generesearch.ru; ²School of Systems Biology, George Mason University, Fairfax, VA 22003 USA). Gene-directed therapy with small interfering RNA (siRNA) has a tremendous potential and in the future will undoubtedly occupy one of the leading positions among other therapeutic methods. The lack of efficient and targeted delivery vectors delays the successful implementation of this method in clinic. To develop such systems, one needs a comprehensive insight into the processes of interactions between siRNAs, its delivery systems and an organism. This review covers properties of therapeutic siRNAs and non-viral systems for their delivery.

Keywords: RNA interference, siRNA, delivery of siRNA.

ВВЕДЕНИЕ

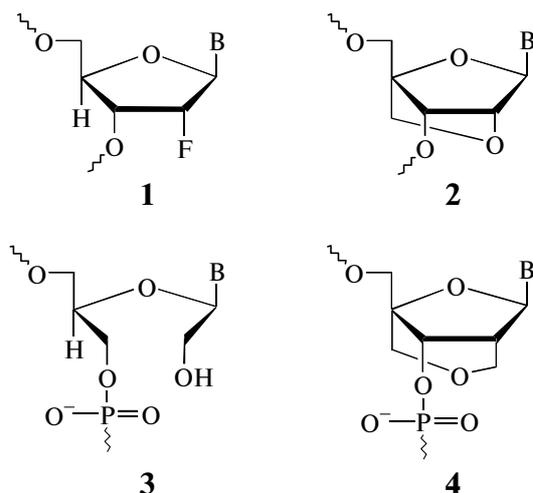
Конечную цель исследований по разработке препаратов для ген-направленной терапии можно условно определить как создание лекарственных средств, которые будут адресно доставляться в клетки и специфично инактивировать экспрессию целевых генов. Создание таких препаратов, способных лечить широкий спектр заболеваний, в настоящее время для биотехнологических компаний представляет своего рода “священный Грааль”. Многие успешные шаги в этом направлении уже сделаны. Так, в качестве препаратов, специфично подавляющих активность гена, уже много лет используют антисмысловые олигонуклеотиды (АСОН) и малые интерферирующие РНК

(siРНК). У каждого из этих подходов есть преимущества и недостатки, но в целом обе эти технологии готовы к применению.

К сожалению, не столь оптимистичны результаты в области доставки этих препаратов в целевые клетки. На сегодняшний день успех достигнут лишь для случаев локальной доставки siРНК в определенные органы: глаз, легкие, ЦНС, мышцы. Глаз оказался самым удобным органом для локальной доставки. Первым официально разрешенным FDA (Food and Drug Administration; Управление по контролю качества продуктов и лекарств) ген-направленным лекарством стал фосфотиоатный антисмысловый препарат витравен (фомивирсен), предназначенный для лечения

Принятые сокращения: apoB – аполипопротеин В; АСОН – антисмысловые олигонуклеотиды; АФП – альфа-фетопротейн; ГК – гиалуроновая кислота; ПЭГ – полиэтиленгликоль; РЭС – ретикулоэндотелиальная система; ЭПУ – эффект проницаемости и удерживания; ЭФР – эпидермальный фактор роста; CPPs (cell penetrating peptides) – проникающие в клетку пептиды; FDA (Food and Drug Administration) – управление по контролю качества продуктов и лекарств; LNA (locked nucleic acids) – заблокированные нуклеиновые кислоты; RISC (RNA-induced silencing complex) – индуцированный РНК комплекс сайленсинга; siРНК – малые интерферирующие РНК; VEGFR (receptor for vascular endothelial growth factor) – рецептор фактора роста сосудистого эндотелия.

* Эл. почта: mskoblov@generesearch.ru



Примеры химических модификаций остатка сахара и фосфатного остова siРНК. 1 – 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F); 2 – LNA (заблокированные нуклеиновые кислоты); 3 – UNA (“незапертые” аналоги нуклеиновых оснований); 4 – CRN (конформационно ограниченные нуклеотиды).

воспаления сетчатки, вызываемого цитомегаловирусом у больных СПИД. Препараты на основе siРНК против mРНК рецептора фактора роста VEGFR-1 в настоящее время проходят вторую фазу клинических испытаний в качестве средства лечения влажной формы возрастной макулярной дегенерации. Эти исследования ведутся одновременно двумя компаниями; “Acuity Pharmaceuticals” и “siRNA Therapeutics”. Дело в том, что mРНК VEGFR-1 представляет собой весьма удобную мишень, так как она активно экспрессируется прямо в сосудах и поэтому легкодоступна.

Над основной задачей – сделать доставку адресной – сейчас бьются все ведущие биотехнологические компании и научные лаборатории, работающие в данной области. Одной из ведущих компаний в этой области, “siRNA Therapeutics”, были сформированы требования, предъявляемые к средствам доставки; основные из них – это “неприемлемость” вирусных методов доставки, а также вариантов на основе плазмидной ДНК [1]. Эти ограничения связаны с потенциальной мутагенностью этих систем доставки и их способностью индуцировать онкогенез и иммунный ответ [2]. Среди других требований, предъявляемых к свойствам носителя, обеспечивающего эффективную доставку, можно выделить низкую токсичность, биodeградируемость, эффективное проникновение в клетку, эффективный выход из эндосомы, адресность доставки. Значительное внимание уделяют и дизайну самих молекул siРНК: должны быть сведены к минимуму нецелевые эффекты этих молекул, токсичность и их способность к индукции иммунного ответа.

На сегодняшний день в литературе описано большое число различных вариантов невирусной доставки siРНК. Не меньшая и, пожалуй, самая интересная часть вариантов относится к разряду коммерческой тайны биотехнологических компаний. Данный обзор посвящен рассмотрению характеристик siРНК и свойств разработанных к настоящему моменту средств доставки.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ДОСТАВЛЯЕМОЙ siРНК

Химические модификации siРНК

Так называемые незащищенные, или безоболочечные, siРНК (“naked siRNA”) обладают рядом недостатков, препятствующих их использованию в клинике. Главные из этих недостатков – нестабильность при действии нуклеаз, атакующих фосфодиэфирные связи, низкий уровень интернализации siРНК клетками и способность запускать иммунный ответ. Свойства siРНК могут быть отчасти улучшены в результате химических модификаций их фосфатных групп [3, 4], остатка сахара [5, 6] (рисунок), нуклеозидных оснований siРНК и конъюгирования, например, с липидами одной или обеих цепей siРНК [7–9]. Созданию стабильных модифицированных siРНК посвящено немало работ [10, 11], однако не все модификации оказались применимыми на практике, поскольку приводили к снижению или ингибированию эффективности siРНК.

Одна из основных химических модификаций антисмысловых нуклеотидов – замещение фосфодиэфирной связи на более устойчивую к действию нуклеаз фосфотиоатную. Эффективности siРНК, которые имеют фосфотиоатные связи на 5'- и 3'-концах смысловой и антисмысловой цепи, и интерферирующих РНК дикого типа сходны [12]. Брааш (D.A. Braasch) и сотр. [3] показали, что siРНК с фосфотиоатными модификациями остаются стабильными в 50%-ной сыворотке мыши при 37°C на протяжении более 72 ч. Однако в другой работе [10] установили, что олигонуклеотиды с большим количеством фосфотиоатных модификаций часто проявляют токсичность *in vivo*.

Альтернативный вид модификации, который позволяет повысить биологическую стабильность нуклеиновых кислот, – введение боранофосфатной связи. Свободный гидроксил концевых фосфатных групп каждой цепи РНК может быть замещен изоэлектронной частицей борана ($-BH_3$). Такие РНК в 300 раз более устойчивы к действию нуклеаз, чем немодифицированные молекулы, и более чем в 2 раза устойчивее фосфотиоатных производных. Холл с соавт. (A.H. Hall) [4] разработали новый метод синтеза стереорегулярных боранофосфатных siРНК и показали, что эффективность полученных siРНК значительно выше таковой для фосфотиоатных производных. В

2008 году такое боранофосфатное производное противоопухолевой siРНК использовано при получении химер с аптамерами для опухолеспецифичного подавления раковых рецепторов и модуляторов [13].

Защита 2'-гидроксильных групп также представляет эффективный метод стабилизации siРНК [5]. В частности, для увеличения стабильности проводят модификацию 2'-позиции пентозных сахаров siРНК [5]. Часто используют 2'-О-метилирование (2'ОМе) [12, 14, 15]. Так показано, что при селективном включении в цепь дуплекса siРНК 2'ОМе-уридиновых или гуанозиновых нуклеотидов происходит полное выключение siРНК-зависимого иммунного ответа [16]. Вышеуказанная модификация может быть проведена без нарушения функциональной активности siРНК, доля модифицированных нуклеотидов при этом составляет 20%. При системной доставке 2'ОМе-модифицированная siРНК, направленная против аполипопротеина В (apoВ), в дозе 5 мкг/кг вызывала эффективный сайленсинг целевой мРНК у мышей, что приводило к существенному снижению apoВ и холестерина в сыворотке. Другие типы модификаций 2'-гидроксильных групп, в том числе 2'-фтор и 2'-О-(2-метоксиэтил), также применяли для предотвращения деградации siРНК [5, 12, 14, 15].

Еще один интересный вариант модификации – использование “заблокированных” нуклеиновых кислот (LNA – locked nucleic acids) [17, 18], представляющих собой семейство конформационно сходных нуклеотидных аналогов [19–21]. Такие молекулы содержат метиленовый мостик, соединяющий атом 2'-кислорода с атомом 4'-углерода в рибозном кольце (рисунок). Этот мостик “запирает” рибозное кольцо в 3'-эндо конформации. Как *in vitro*, так и *in vivo* было показано, что включение LNA в состав siРНК повышает устойчивость последних [6, 22, 23].

Важно отметить, что повышенная устойчивость модифицированной siРНК к деградации под действием нуклеаз не всегда приводит к эффективному и продолжительному подавлению активности целевого гена. Так, в работе Джулиан Лэйзер (J.M. Layzer) и соавт. [6] проведено сравнение биологической активности 2'-F-модифицированной и немодифицированной siРНК *in vitro* и *in vivo*. Полученные авторами данные свидетельствуют о том, что модифицированные siРНК функциональны, однако 2'-F-модификация не дает преимуществ ни в степени подавления экспрессии, ни в длительности этого подавления как в культуре клеток, так и на мышинной модели.

Как упоминалось выше, большинство вариантов модификаций непосредственно привнесены в мир siРНК-технологий из разработанной ранее химии АСОН. Поскольку прикладное применение

модифицированных siРНК ограничено давно существующими патентами, поиск новых вариантов модификаций продолжается и в настоящее время. Так, американская биотехнологическая компания “Marina Biotech” разработала технологию UsiRNA, где дуплекс siРНК состоит из модифицированных ациклических мономеров нуклеотидной природы, названных “unlocked nucleobase analogs” (UNAs). Разработчики утверждают, что такой вариант siРНК приводит к увеличению специфичности действия siРНК, обеспечивает устойчивость к нуклеазной деградации и понижает цитокиновый ответ [24].

Помимо модификации самой последовательности siРНК возможна их конъюгация с другими молекулами, придающими препарату желаемые свойства. Так, модификация siРНК проникающими в клетку пептидами (cell penetrating peptides – CPPs) [25, 26] повышает эффективность подавления экспрессии целевых генов. CPPs – это пептиды размером от 8 до 30 аминокислот, богатые аргинином. К ним относятся ТАТ [27–29], пенетратин (из *Antennapedia*) [30], транспортан (гибрид, полученный из гланина и мастопарана) [31] и синтетические полиаргининовые пептиды [32–34]. Эти пептиды взаимодействуют с отрицательно заряженными глюкозаминогликанами на клеточной поверхности [35, 36]. Ранее считалось, что CPPs проникают в клетку посредством слияния с мембраной; в последнее время показано, что они входят в клетку главным образом посредством макропиноцитоза [37–39]. При конъюгации CPPs со смысловой цепью siРНК образуются частицы размером менее 10 нм [40]. Следует отметить, что siРНК доставляется в клетку с помощью CPPs не только в виде конъюгатов [41], но и в виде нековалентных полиплексов [42, 43].

Повысить эффективность сайленсинга генов *in vivo* удается также при модификации siРНК полиэтиленгликолем (ПЭГ) [8, 44]. Роземой (D.V. Rozema) и др. [45] разработаны и успешно испытаны *in vivo* “динамические поликонъюгаты”: siРНК модифицировали кислотолabileными полимерами, содержащими ПЭГ и *N*-ацетилгалактозамин. В кислой эндосомальной среде такие комплексы разрушаются, высвобождая siРНК. При внутривенном введении динамические конъюгаты вызывали снижение уровня экспрессии целевых генов в печени мыши.

В исследованиях *in vitro* показано, что конъюгация siРНК с липофильными молекулами также может способствовать ее интернализации и, кроме того, улучшать фармакокинетику и тканевое биораспределение олигонуклеотидов. Эта стратегия тоже применена для доставки siРНК *in vivo*. Введение мышам ApoB-специфичной siРНК, 3'-конец смысловой цепи которой через синтетический пирролидоновый линкер конъю-

Достоинства и недостатки siРНК с модификациями различного типа

Тип модификации	Достоинства	Недостатки
боранофосфатная	— повышенная стабильность в сыворотке	— вследствие малого размера siРНК быстро выводится из организма
фосфотиоатная	— повышенная стабильность в сыворотке	— возможно проявление токсичности <i>in vivo</i> ; — вследствие малого размера siРНК быстро выводится из организма
2'-О-метилирование	— повышенная стабильность в сыворотке	— вследствие малого размера siРНК быстро выводится из организма
LNA	— повышенная стабильность в сыворотке	— вследствие малого размера siРНК быстро выводится из организма
UsiRNA	— увеличение специфичности действия siРНК; — повышенная устойчивость к нуклеазной деградации; — пониженный цитокиновый ответ	нет данных
конъюгация с CPPs	— повышение эффективности сайленсинга	нет данных
конъюгация с ПЭГ	— повышение эффективности сайленсинга	— могут возникать проблемы с выведением из организма; — могут быть токсичны
конъюгация с холестерином	— повышенная стабильность в крови; — повышенная эффективность интернализации siРНК клетками печени; — отсутствие иммунной стимуляции	нет данных

югирован с липофильным остатком холестерина, приводило к снижению экспрессии мРНК *apoB* в печени и тонкой кишке примерно на 60 и 75% соответственно [7]. Для эффективного сайленсинга были необходимы высокие дозы siРНК, однако авторы не наблюдали ни подавления экспрессии нецелевых генов, ни запуска иммунного ответа. Предполагается, что улучшение фармакокинетических свойств конъюгатов siРНК с холестерином по сравнению с немодифицированной siРНК обусловлено взаимодействием конъюгатов с сывороточными белками крови, что препятствует их деградации. В самом деле, при внутривенной инъекции мышам конъюгатов siРНК с холестерином и немодифицированных siРНК в дозе 50 мг/кг период их полужизни составлял соответственно 95 и 6 мин.

Конъюгаты siРНК с длинноцепочечными жирными кислотами (>18С) и производными желчных кислот использовали для подавления экспрессии генов *in vivo* в гепатоцитах [46]. Применяв подобную стратегию, Нишина (K. Nishina) и соавт. [47] модифицировали α -токоферолом 5'-конец 29-нуклеотидной антисмысловой цепи siРНК, направленной против *ApoB*. После отщепления α -токоферола в цитоплазме образовавшаяся цепь расщеплялась ферментом Dicer до 21-звенной siРНК. Внутривенное введение этого расщепляемого конъюгата приводило к значительному снижению уровня холестерина в крови.

Вышеприведенные данные свидетельствуют о том, что в то время как модификации фосфодиэфирной связи и рибозы в siРНК позволяют повысить только ее стабильность, конъюгация siРНК с различными молекулами позволяет модифицировать и другие ее характеристики, такие как эффективность действия и липофильность.

Модификации siРНК не всегда приводят к желаемому эффекту (таблица). Например, в исследованиях биотехнологической компании “Dharmacon Research” показано, что при модификации смысловой цепи siРНК антисмысловая цепь активнее загружается в комплекс RISC (RNA-induced silencing complex), что приводит к увеличению неспецифичности — подавлению экспрессии нецелевых мРНК [48]. Более подробно проблема специфичности действия siРНК будет раскрыта в следующем разделе.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ siРНК

Повышение избирательности действия siРНК по отношению к целевой РНК — задача не из простых. В литературе, посвященной РНК-интерференции, нередко можно встретить термин “off-target effects”, означающий, что помимо желаемого гена также подавляются и другие гены, а это приводит к искажению наблюдаемого эффекта. Как выяснилось, многие результаты ранее прове-

денных экспериментов с применением siРНК оказались неверными.

По отношению к целевой мРНК специфичные к ней siРНК — мощные регуляторы, поскольку расщепляют эту мРНК с помощью механизма РНК-интерференции. В отношении других, частично комплементарных мРНК, siРНК выступают в качестве ингибитора трансляции, причем этот эффект может одновременно проявляться в отношении тысяч генов [49].

В течение некоторого времени считалось, что неспецифическое подавление экспрессии нецелевых генов с помощью siРНК связано с несовершенством дизайна самой последовательности. Однако, несмотря на значительные усовершенствования в области биоинформатического дизайна последовательностей siРНК, которые позволили подбирать более специфичные siРНК [50–53], стало очевидно, что причина неспецифичности кроется еще в чем-то другом. Так, в 2006 году Бирмингем (A. Birmingham) и соавт. [54] показали, что списки экспериментально обнаруженных неспецифично подавляемых генов не совпадают со списками генов, предсказанных в качестве нецелевых мишеней с помощью компьютерных расчетов.

Одной из очевидных причин данного феномена может быть участие в процессах РНК-интерференции не только антисмысловой последовательности siРНК, но и комплементарной ей смысловой цепи. Известно, что для эффективной загрузки антисмысловой цепи в комплекс RISC необходимы 5'-фосфаты, находящиеся на концах цепей siРНК. Как только синтетическая siРНК попадает в клетку, происходит фосфорилирование ее 5'-концов киназой Clp1 [55]. Чен (P. Chen) и коллеги [56] показали, что если при синтезе siРНК на 5'-конец смысловой цепи ввести метильную группу, то в результате в комплекс RISC загружается только антисмысловая цепь siRNA, и это значительно снижает неспецифичность действия. Другой модификацией siРНК, понижающей неспецифичность, оказалось 2'-О-метилрибозильное замещение во второй позиции антисмысловой цепи siРНК. Авторы перепробовали много вариантов модификаций в различных позициях siРНК и выяснили, что только метильная модификация во втором положении антисмысловой цепи приводит к значительному уменьшению неспецифичности действия, не снижая при этом эффективности подавления экспрессии целевой мРНК [56].

Еще один фактор, значительно влияющий на специфичность, — концентрация используемой siРНК. При тщательном исследовании установлено, что нормальное функционирование siРНК зажато в следующих “концентрационных” рамках: высокая концентрация siРНК (100 нМ) обу-

словливает сильный неспецифический ответ большого количества генов, малая (0.1 нМ) — низкую эффективность подавления целевого гена [57]. Интересным выходом из ситуации оказался следующий вариант: использование в одном эксперименте смеси нескольких siРНК, подобранных к разным участкам целевого гена. При использовании такой смеси, содержащей умеренные концентрации каждого компонента (приблизительно по 20 нМ), наблюдали эффективное подавление целевого гена и довольно высокую специфичность.

СВОЙСТВА СИСТЕМ ДОСТАВКИ siРНК

Высокоэффективный и достоверный сайленсинг генов *in vitro* продемонстрирован во многих работах, однако *in vivo* эффективная РНК-интерференция наблюдается далеко не всегда. Этот феномен может быть объяснен целым рядом обстоятельств: быстрой деградацией siРНК под действием нуклеаз, плохой интернализацией siРНК клетками-мишенями, неэффективным высвобождением siРНК из эндосом в цитозоль [58]. Таким образом, встает вопрос о разработке систем доставки siРНК, которые, с одной стороны, должны быть биodeградируемыми, а с другой — устойчивыми к ферментативной деградации (что позволит увеличить время циркуляции siРНК), а также будут способствовать повышению эффективности интернализации siРНК клетками и последующему выходу siРНК в цитозоль с сохранением активности.

РАЗМЕР СИСТЕМ ДОСТАВКИ И ПРИРОДА НОСИТЕЛЯ

Размер носителя — это важный параметр, который необходимо учитывать при разработке систем доставки siРНК. Известно, что *in vivo* неупакованная siРНК быстро отфильтровывается почечными клубочками — для почечной фильтрации верхний предел размера частиц составляет приблизительно 40 кДа. Таким образом, малый размер систем доставки может быть выигрышным лишь в случае терапии, нацеленной на проксимальные клетки почечных канальцев [59].

С другой стороны, размер комплексов не должен быть слишком большим, чтобы не вызвать тромбообразования в капиллярах. Ли (W. Li) и соавт. [60], например, указывают, что при внутривенном введении систем доставки размер комплексов должен составлять менее 1 мкм для предотвращения эмболии и менее 100 нм — для предотвращения поглощения их ретикулоэндотелиальной системой (РЭС).

При системном введении в ходе транспорта к целевой ткани комплексы siРНК с носителями должны проникать через плотные контакты эндотелия капилляров. Известно, что транспорт

макромолекул диаметром более 4 нм через микрососуды в нормальных тканях ограничен [61]. Таким образом, многие носители, имеющие наноразмеры, тем не менее, не способны проникнуть через просветы сосудистого эндотелия и доставить siРНК к целевым клеткам.

Однако в определенных специализированных тканях организация эндотелия позволяет проникновение частиц довольно крупных размеров. Например, микрососуды печени и селезенки имеют довольно большие просветы между клетками эндотелия, достигающие 100–200 нм в диаметре [62]. Также весьма эффективен транспорт систем доставки через опухолевый эндотелий. Такой эффект обусловлен неплотной и неоднородной структурой опухолевого эндотелия и плохим лимфатическим дренажем. Этот феномен известен под названием “эффекта повышенной проницаемости и удерживания” (ЭПУ) [61, 63]. Опухоли гетерогенны по размеру просветов эндотелия. Например, в одном из исследований в опухолевом эндотелии обнаружены просветы диаметром от 100 до 700 нм [64], в другом – от 100 до 400 нм [65].

Очевидно, что супрамолекулярные носители siРНК могут быть использованы для доставки siРНК только в определенные типы опухолей и нормальных тканей, имеющих в эндотелии просветы большого размера. При этом диаметр пор в сосудах этих тканей позволяет установить ограничения на размер средств доставки siРНК. С точки зрения размера преимущество в этом случае получают конъюгаты siРНК с нацеливающими лигандами или CPPs. Малый размер таких конъюгатов будет способствовать более широкому их распределению в тканях по сравнению с другими системами доставки siРНК, размер которых значительно больше [66]. Однако в этом случае возрастает вероятность почечной фильтрации.

Ряд данных свидетельствует о том, что размер и природа систем доставки оказывают влияние на скорость и механизм их интернализации, а также на последующую внутриклеточную локализацию [67, 68]. Например, Реджман (J. Rejman) и др. [68] показали, что интернализация нефагоцитирующими клетками В16 микросфер диаметром менее 200 нм осуществляется посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза. С увеличением размера частиц происходит постепенное смещение механизма интернализации в сторону кавеоларного, который становится доминирующим при поглощении частиц размером 500 нм. Кроме того, частицы размером менее 200 нм накапливаются в окооядерном пространстве, в то время как частицы, имеющие 500 нм в диаметре, – на периферии клеток. В другом исследовании эта же группа ученых показала, что DOTAP (1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан)-липосомы интерна-

лизуются посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза, в то время как интернализация носителей на основе полиэтиленimina (ПЭИ) обеспечивается клатрин-опосредованным и кавеоларным эндоцитозом. Трансфекция клеток липосомами полностью блокируется ингибиторами клатрин-опосредованного эндоцитоза: хлорпромазином и низкой концентрацией иона K^+ в клетках, в то время как ингибирование кавеоларного пути генистеином и филипином не оказывает никакого действия. Трансфекцию носителями на основе ПЭИ, наоборот, ингибируют генистеин и филипин, но не ингибиторы клатрин-опосредованного эндоцитоза.

В работе Спагноу (S. Spagnou) и др. [69] показано, что интернализация комплексов siРНК с липосомами, полученными из N(1)-холестероилоксикарбонил-3,7-дiazанонан-1,9-диамина (CDAN) и диолеил-L-альфа-фосфатидилэтанолamina (DOPE), происходит медленнее, чем липосом из lipofectAMINE2000. После интернализации клетками частицы на основе CDAN и DOPE накапливались в диффузных малых нелизосомальных компартментах, а частицы на основе lipofectAMINE2000 собирались во внутриклеточных везикулах большего размера. Однако различий в эффективности подавления экспрессии генов при использовании siРНК-липосомов различных размеров (50–100 нм или 200–600 нм) авторы не наблюдали.

Поскольку каждый тип носителя формирует частицы определенного размера [40], выбор средства доставки siРНК, особенно *in vivo* при системном введении, должен осуществляться с учетом как характеристик эндотелия сосудов, снабжающих кровью целевую ткань, так и природы носителя siРНК.

ПОВЕРХНОСТНЫЙ ЗАРЯД

В исследованиях *in vitro* показано, что эффективность доставки siРНК может быть увеличена путем сообщения системе доставки положительного поверхностного заряда, который облегчает связывание частиц с отрицательно заряженными клеточными мембранами и индуцирует их поглощение клеткой [70]. Однако *in vivo*, особенно при системной доставке, положительный заряд становится, скорее, препятствием, поскольку в этом случае происходит адсорбция частиц на поверхности отрицательно заряженных сывороточных белков. Такие неспецифические взаимодействия приводят к образованию нейтральных комплексов [71].

Проблемы, связанные с сорбцией на сывороточных белках, хорошо изучены на примере липосом. Так, катионные липосомы обычно быстро выводятся из кровяного русла и депонируются в капиллярах легких [72, 73]. В этом процессе ос-

новную роль играет ассоциация липосом с белками плазмы, такими как IgG, комплемент С3 и фибронектин [74, 75]. На 1 моль липидов при этом приходится около 50 г белка. РЭС активно распознает крупные агрегаты липосом с белками плазмы и выводит их из кровяного русла [74]. С увеличением размера агрегатов повышается вероятность их элиминирования с помощью РЭС и происходит снижение эффективности их интернализации целевыми клетками. Сывороточный альбумин также может действовать как стерический барьер и ингибировать эндосомальную дестабилизацию и/или высвобождение siРНК [76].

Для ограничения взаимодействий с белками сывотки поверхностный заряд может быть маскирован покрытием носителя siРНК гидрофильными полимерами, такими как ПЭГ, (поли)гидроксилпропилметакриламид или (поли)винилпирролидин [77]. Вышеуказанные полимеры формируют плотную гидрофильную сеть вокруг носителя и ограничивают его гидрофобное или электростатическое взаимодействие с внеклеточной средой, делая частицы “невидимыми” для РЭС. Это позволяет увеличить время циркуляции носителей в токе крови [78]. Однако использование гидрофильных полимеров, к сожалению, не может быть “панацеей”. Применение ПЭГ *in vivo* ограничивают проблемы, связанные с его полидисперсностью и экскрецией из организма (молекулы с высоким молекулярным весом могут накапливаться в печени, приводя к макромолекулярному синдрому) [79]. Кроме того, в литературе появляются данные о том, что ПЭГилированный компонент липосом может быть иммуногенным и способствовать образованию антител (особенно IgM) против второй дозы таких липосом [80]. При повторных инъекциях такие средства доставки могут проявлять неожиданные фармакокинетические свойства и, как следствие, обладать меньшей терапевтической эффективностью или даже обуславливать нежелательные побочные эффекты [81].

Весьма привлекательно использование в качестве маскирующего агента природного биополимера гиалуроновой кислоты (ГК). Отрицательный заряд ГК может быть использован для нейтрализации положительного заряда катионных липосомных или полимерных носителей [82]. ГК обладает хорошей биосовместимостью и способна повышать связывание siРНК с инкапсулирующими материалами [83]. Она защищает siРНК от нуклеазной дегградации, повышает стабильность катионных частиц *in vivo* и снижает их цитотоксичность. Кроме того, недавно показано, что печень, селезенка и некоторые опухолевые ткани экспрессируют рецептор ГК, что может быть использовано для рецептор-опосредованного нацеливания [84].

В том случае, если мишенью siРНК будут органы РЭС, например, селезенка или печень, системы доставки могут быть использованы без поверхностной модификации. Если же мишень находится вне РЭС, то носители должны обладать свойством “невидимости” для макрофагов [85].

На липосомных носителях сорбция заряженных сывороточных белков может быть ограничена посредством включения холестерина – количество связанного белка при этом снижается в 4 раза, что приводит к увеличению времени полужизни липосом в токе крови (от нескольких секунд до 5 ч) [74].

Еще одной альтернативой может быть использование систем доставки с поверхностным зарядом, близким к нейтральному [86, 87]. Некоторые авторы, однако, отмечают, что нейтральные полимерные носители в солевых физиологических условиях быстро формируют большие агрегаты, которые уже не эффективны как средства доставки и могут даже проявлять токсичность *in vivo* вследствие развития эмболии легких [88].

Обобщая вышеприведенные данные, можно отметить, что и нейтральные, и заряженные носители siРНК имеют как преимущества, так и недостатки. В настоящее время не наблюдается “перевеса” в какую-либо сторону и поэтому до сих пор применяют оба типа носителей.

АДРЕСНОСТЬ ДОСТАВКИ siРНК И СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ siРНК *in vivo*

Одно из самых важных свойств систем доставки – это возможность ее “нацеливания”, так как для эффективного лечения система должна доставлять siРНК к пораженному органу или ткани. Первые ген-направленные препараты – АСОН – не имели системы доставки вообще. Проблему адресности доставки частично удавалось обойти на этапе определения мишени. Так, в случае лечения опухолей АСОН подбирали к опухолеспецифичному гену, экспрессия которого в нормальных здоровых тканях практически отсутствовала. Далее АСОН синтезировали так, что они были устойчивы к действию ДНКаз, и вводили в организм в большой дозе. С течением времени препараты находили свою мишень. Данный подход применяется и в настоящее время. Один из первых ген-направленных препаратов – Genasense® (генасенс), разработанный фирмой “Genta”, – прошел все три фазы клинических испытаний при лечении различных злокачественных заболеваний и в настоящее время проходит регистрацию в FDA в качестве лекарственного средства.

Подобный подход может быть использован и для доставки siРНК, если ткань доступна для местной терапии, например, при поверхностных опухолях или поражениях кожи. Введение siРНК

in vivo осуществляется непосредственно в целевую ткань с помощью ряда способов. Например, интраназальное введение широко используется для доставки препаратов в легкие [89–91]. В перспективе эта стратегия может быть использована при лечении астмы, муковисцидоза, ишемии-реперфузии и респираторных вирусных инфекций. При лечении макулярной дегенерации или диабетического отека зоны желтого пятна в настоящее время активно применяют внутриглазные инъекции. Широко используется и метод электропорации. Этот подход применим для различных типов тканей, таких как мышцы, кожа, опухоли [92]. Различные участки ЦНС, включая развивающуюся нервную трубку и спинной мозг, пренатальный и постнатальный мозг могут быть электропорированы, по крайней мере, на модельных животных. Для доставки siРНК в ЦНС также проводят внутривентрикулярную, интра-текальную или внутривентрикулярную инфузию siРНК в буферном изотоническом растворе [93–96]. Эффективность действия препаратов siРНК в местной терапии уже продемонстрирована при вирусных инфекциях (респираторной и вагинальной), глазных болезнях, расстройствах нервной системы, раке и воспалительных заболеваниях кишечника [91, 97–104].

Локальная доставка препаратов siРНК имеет существенные достоинства: простой состав упаковки, отсутствие необходимости нацеливания препарата, а также возможность использования низких доз, что ограничивает внутриклеточный дозозависимый иммунный ответ. Локальная доставка в целевую ткань обеспечивает высокие локальные концентрации siРНК, снижение дозы, необходимой для достижения эффективного сайленсинга и, таким образом, снижение стоимости лечения. К преимуществам этого подхода также можно отнести высокую скорость биораспределения лекарственного препарата и развития его действия, возможность быстрого изменения дозы, а также использование локального способа введения при терапии широкого круга заболеваний. Однако доставка siРНК в целевые клетки и ткани при системном введении представляет сложную задачу, поскольку в этом случае необходимы высокоэффективные стратегии, обеспечивающие большое время полужизни siРНК и ее интернализацию преимущественно в клетки-мишени. Свойство нацеленности при этом играет ключевую роль. Интернализация в целевые клетки обеспечивается посредством модификации носителей различными нацеливающими агентами: пептидами, белками или их фрагментами и другими молекулами, распознающими специфические рецепторы на поверхности отдельных клеточных популяций [105].

В качестве лигандов, например, могут быть использованы антитела или их фрагменты [100, 106,

107]. Эти лиганды обычно зафиксированы на цепях ПЭГ, что облегчает связывание между рецептором, расположенным на клеточной поверхности, и системой доставки siРНК и способствует интернализации последней в клетку. Фрагменты антител коммерчески более доступны, чем антитела, что связано с особенностями методов их получения. К преимуществам использования фрагментов антител также следует отнести их сниженное взаимодействие с нецелевыми клетками и высокую эффективность проникновения в ткани [10].

Известно, что на поверхности гепатоцитов экспрессируются рецепторы асиалогликопротеинов (ASGPR) – гликозилированных белков, на конце углеводных цепей которых отсутствуют остатки сиаловой кислоты и экспонированы остатки галактозы. Таким образом, нацеленные на гепатоциты системы доставки могут быть галактозилированы [108].

Рецепторы трансферрина или фолатные рецепторы локализованы на различных типах клеток, но обычно гиперэкспрессируются опухолевыми клетками, поэтому при создании систем доставки siРНК в опухолевые клетки трансферрин или фолат могут выступать в качестве лигандов для нацеливания [109]. Другими лигандами, которые нацелены на опухолевые клетки, могут быть пептиды с аргинил-глицил-аспартатным (RGD) мотивом. Эти пептиды связываются с интегринами – гетеродимерными рецепторами клеточной адгезии, которые экспрессируются на активированных эндотелиальных клетках и опухолевой сосудистой сети [110]. В качестве нацеливающего вектора для доставки препаратов в опухолевые клетки также можно использовать некоторые факторы роста, гормоны и онкофетальные белки, в частности, альфа-фетопротеин (АФП). Преимущество их использования заключается в отсутствии иммуногенных свойств, высокой аффинности к рецепторам и высоком уровне экспрессии рецепторов на опухолевых клетках. Так, показано, что рецепторы АФП экспрессируются на поверхности подавляющего большинства опухолевых клеток независимо от типа опухоли, в то время как в нормальных клетках взрослого организма они отсутствуют или присутствуют в незначительных количествах. Положительные результаты получены также при использовании конъюгатов эпидермального фактора роста (ЭФР) и рецептор-связывающего фрагмента ЭФР вместе с противоопухолевыми препаратами.

Следует упомянуть, что в том случае, если целевая клетка или ткань принадлежит опухоли и/или расположена в РЭС, проводить нацеливание системы доставки необязательно. Для клеток, находящихся в РЭС, активация макрофагов и системы комплемента приведет к накоплению системы доставки в РЭС. Для опухолевых клеток,

находящихся вне РЭС, будет достигаться пассивное нацеливание вследствие ЭПУ. В основе этого эффекта, как уже упоминалось выше, лежат особенности васкуляризации опухолей, которые обычно не встречаются в нормальной сосудистой ткани. Эти характеристики включают высокую плотность сосудов, обусловленную интенсивным ангиогенезом, их повышенную проницаемость вследствие увеличенной продукции сосудистых медиаторов, дефектную сосудистую архитектуру и недостаток лимфатического дренажа [111, 112]. Показано, что эффект ЭПУ наблюдается не менее чем через 6 ч после введения препарата [111].

Еще один способ направленной доставки siРНК в клетку основан на использовании химер аптамеров и siРНК [113]. Аптамеры представляют собой одноцепочечные последовательности нуклеиновых кислот, образующие трехмерную структуру, способную с высокой аффинностью взаимодействовать с целевыми молекулами [114]. Направленная доставка siРНК в целевые клетки обеспечивается за счет взаимодействия аптамера со специфическим рецептором на клеточной поверхности. В настоящее время исследования систем доставки на основе аптамеров проводятся, в основном, *in vitro*, и лишь один аптамер использован для направленной доставки siРНК *in vivo*. Дасси (J. Dassi) с соавт. [115] и МакНамара (J. McNamara) с соавт. [116] для селективной доставки siРНК в раковые клетки использовали аптамер, специфически связывающийся с антигеном, экспрессированным на клетках рака простаты.

Обобщая вышеприведенные данные, можно сказать, что для доставки генно-направленных препаратов в настоящее время используется, в основном, системное введение, поскольку для локального способа введения доступны лишь некоторые ткани. В связи с этим проблема нацеливания, как уже упоминалось выше (см. раздел "Введение"), приобретает особенно важное значение. Основные усилия исследователей сейчас сосредоточены на поиске пар лиганд-рецептор, которые были бы специфичны для каждого типа клеток-мишеней. Ряд таких пар уже предложен, и сейчас проводятся испытания *in vivo* средств доставки, модифицированных соответствующими нацеливающими агентами [117–120].

СОВМЕСТИМОСТЬ СИСТЕМ ДОСТАВКИ siРНК С КОМПОНЕНТАМИ КРОВИ

При разработке систем доставки siРНК необходимо принимать во внимание совместимость материалов наночастиц с компонентами крови. При введении в ток крови частицы находятся в прямом контакте с миллиардами клеток и молекул: тромбоцитами, лейкоцитами, белками плазмы и цитокинами, индуцируя при этом иммунный ответ, который приводит к тромбозу, гемоли-

зу, адгезии белков плазмы, активации или ингибированию системы комплемента и секреции патологических клеточных факторов [83]. Недавно в нескольких исследованиях показано, что повышенные дозы комплексов siРНК с липосомами, вводимые внутривенно мышам, могут индуцировать ряд гематологических и серологических реакций, включая острую нейтропению и тромбоцитопению, а также повышение уровня сывороточных трансаминаз (что свидетельствует о повреждении клеток печени). Еще при разработке систем доставки ДНК установили, что носители на основе катионных липосом могут индуцировать эритроцитолит [121] и слияние эритроцитов [122]. С тех пор прошло более 10 лет, но проблема совместимости средств доставки генетического материала с компонентами крови по-прежнему остается нерешенной, хотя некоторый прогресс все-таки достигнут. Так, в одном из исследований [123] показано, что гадолиниевые частицы, покрытые фолатом и ПЭГ, не приводят к агрегации тромбоцитов и активации нейтрофилов. Кроме того, еще на заре разработки систем доставки было замечено, что использование векторов на основе низкомолекулярного хитозана не вызывает гемолиза [124]. Сейчас только сделаны первые шаги в направлении повышения биобезопасности средств доставки, и для полной оценки совместимости разрабатываемых носителей с компонентами крови необходимы всесторонние исследования на молекулярном уровне.

СТАБИЛЬНОСТЬ СИСТЕМ ДОСТАВКИ siРНК

Способность сохранять стабильность в токе крови считается важнейшим параметром каждой системы доставки siРНК. На стабильность комплексов siРНК с носителем решающее влияние оказывают процессы агрегации и разложения частиц. Скорости агрегации и разложения, в свою очередь, определяются природой и структурой носителя, поверхностным зарядом комплексов, а также их размером. К сожалению, исследователи, характеризуя новые разрабатываемые системы доставки siРНК, не всегда корректно подходят к определению данного параметра. Оценку стабильности систем доставки необходимо проводить в условиях, приближенных к физиологическим, например, в цельной крови, поскольку в этом случае взаимодействие системы доставки со всеми компонентами крови определяет размер и заряд частиц и, как следствие, время их полужизни.

НЕДОСТАТКИ СИСТЕМ ДОСТАВКИ siРНК

Токсикогеномика и геносовместимость

Традиционно считалось, что системы доставки лекарственных препаратов, используемых в экс-

периментах с siРНК, биологически и “генетически” инертны [125]. Однако при исследовании экспрессии генов с помощью микрочипов показано, что катионные липиды и катионные полимеры, часто используемые при конструировании различных систем доставки, могут индуцировать изменения генной экспрессии в биологических системах [125,128]. Вот почему при создании новых систем доставки важно проверять их “геносовместимость” — в экспериментах по изучению подавления экспрессии генов с помощью siРНК системы доставки не должны значительно увеличивать нецелевые эффекты и/или неблагоприятно влиять на экспрессию генов-мишеней.

Способность компонентов систем доставки оказывать влияние на экспрессию генов может быть использована при создании генотерапевтических препаратов нового поколения. В основе действия этих препаратов может лежать согласованное действие siРНК и системы ее доставки. Это открывает возможности для разработки новых систем доставки с требуемой биологической активностью (например, противораковой). Если этот подход будет успешным, то разработка таких систем доставки может оказать значительное влияние на использование и распространение в клинике генного сайленсинга, опосредованного интерферирующей РНК.

Стимуляция иммунного ответа

Способность siРНК и ее носителей индуцировать иммунный ответ — одна из основных проблем, ограничивающих применение препаратов на основе siРНК в клинике. Изначально считалось, что дуплексы siРНК короче 30 п.н. достаточно малы и поэтому не распознаются иммунной системой и не способны стимулировать неспецифический интерфероновый ответ [129]. Однако последующие исследования показали, что препараты siРНК могут активировать клетки иммунной системы как *in vivo*, так и *in vitro* [130–132]. Такие стимулирующие эффекты обусловлены либо самими олигонуклеотидами (последовательностью или структурой siРНК), либо их носителями (например, катионными липидами), используемыми для их доставки *in vivo*.

В настоящее время известно, что определенные мотивы цепи (например, такие как 5'-UGU-GU-3' и 5'-GUCCUCAA-3') способны связывать Toll-подобные рецепторы (TLRs), что, в свою очередь, приводит к индукции синтеза интерферонов и интерлейкинов клетками *in vivo* и *in vitro* [130, 131, 133]. Механизмы siРНК-активации иммунной системы хорошо исследованы и подробно рассмотрены в обзорах Маркеса и Вильямса (J.T. Marques, B.R.G. Williams) [134] и Роббинса (M. Robbins) и др. [135]. Частично эта проблема может быть решена с помощью химической моди-

фикации последовательностей siРНК. Так, например, включение 2'-ОМе в смысловую или антисмысловую цепь siРНК приводит к блокированию иммунного ответа, опосредованного Toll-подобными рецепторами 7- и 8-го типов [130, 135].

Ряд данных свидетельствует о том, что системы доставки siРНК также могут вносить существенный вклад в активацию иммунной системы и индуцируют синтез цитокинов *in vivo*. В 2003 году Сиуд (M. Sioud) и др. [131] показали, что комплексы siРНК с DOTAP-липосомами (соотношение заряда “-”/“+” варьировали от 1 : 2 до 2 : 1), введенные внутривенно мышам, при дозе siРНК 5 нмоль могут активировать иммунную систему. Это наблюдение согласуется с тем фактом, что после внутривенного введения мышам комплексов siРНК с катионными липосомами в дозе 50 мг в их легких и селезенке происходит активация транскрипционного фактора STAT1 [136]. В работе Джедж (A.D. Judge) и соавт. [132] показано, что липосомные системы доставки на основе различных катионных липидов, в том числе и ПЭГилованных, в дозах менее 0.05 мг/кг способны индуцировать у мышей сильный цитокиновый ответ. Противоположные результаты получены группой Ге (Q. Ge) и соавт. [137], которые показали, что комплекс siРНК с PEI (120 мг/мышь) (соотношение заряда “-”/“+” 5 : 1) не индуцировал синтеза интерферона- α . Интерфероновый ответ *in vivo* не наблюдали и в тех случаях, когда siРНК ковалентно прикрепляли к холестерину [138] или инкапсулировали в липидные бислои [139]. Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что для выявления взаимосвязей между технологией приготовления лекарственных препаратов (дозой siРНК, соотношением компонентов в комплексах, типом используемых полимеров) и активацией иммунного ответа *in vivo* необходимы дальнейшие исследования.

Следует отметить, что способность siРНК и систем ее доставки индуцировать иммунный ответ в организме может быть использована в терапевтических целях. Например, разработана модификация, которая позволяет получить бифункциональные siРНК с двумя типами активностей: провоспалительной и супрессирующей (для целевого гена) [140]. Авторы обнаружили, что введение неспаренных уридинов в сопровождающую цепь приводит к повышению иммуностимуляторной активности клеток иммунной системы человека. Такая модификация не оказывала влияния на эффективность подавления экспрессии целевого гена. Повышение продукции цитокинов при введении неспаренных уридинов в siРНК приводило к повышению устойчивости клеток к заражению вирусом леса Семлики. Разработанный подход авторы считают применимым для любой последовательности siРНК и в перспекти-

ве предлагают использовать его в антивирусной терапии для усиления терапевтического эффекта.

Наличие у siРНК бифункциональной активности показано и в других работах [141, 142]. Например, обнаружено, что siРНК с трифосфатом на 5'-концах, направленная против Vcl-2, вызывает массивный апоптоз клеток меланомной опухоли в метастазах легких *in vivo* [142]. 5'-Трифосфаты распознавались белком Rig-I, который активировал дендритные клетки и, таким образом, вызывал интерфероновый ответ. Этот ответ в комбинации с нокдауном гена Vcl-2 и приводил к апоптозу раковых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для разработки новых перспективных систем доставки, а также улучшения свойств уже существующих необходимо более глубокое понимание взаимодействий между носителями, siРНК и биологической средой. Физико-химические свойства комплексов модифицированной или немодифицированной siРНК с ее носителями чрезвычайно важны для оценки возможности доставки в ткань и предотвращения поглощения комплексов другими нецелевыми тканями. Размер, поверхностный заряд и 3-D морфология могут оказывать сильное влияние на распределение комплексов и их фармакокинетику. Например, на образование и стабильность комплексов оказывают действие такие факторы как длина siРНК и ее модификация, природа носителя, соотношение количеств siРНК и носителя, а также буферы, используемые для их приготовления. Часто в исследованиях приводят биофизические свойства (размер, заряд и т.д.) комплексов siРНК с носителями, но существенный недостаток таких работ заключается в том, что получены эти частицы в нефизиологических условиях. И лишь в двух работах биофизические свойства частиц исследовали в присутствии либо липидных мембран различного состава [143], либо сыворотки крови и взаимодействующих с носителями белков [144]. Нам не известны работы, в которых биофизические свойства комплексов siРНК с их носителями изучали в цельной крови. Такие исследования позволили бы многое узнать о взаимодействиях комплексов с компонентами крови и в дальнейшем определить направление, в котором следует вести разработки по получению улучшенных носителей и более стабильных частиц, предназначенных для клинического применения. При более глубоком понимании природы и механизмов взаимодействия между комплексами siРНК с носителями и биологическими системами использование siРНК в клинике при лечении различных заболеваний станет реальностью.

Авторы приносят благодарность организаторам сайта www.molbiol.ru за помощь в сборе литературы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Areas of Interest for RNA Therapeutics. http://www.siRNA.com/partnering_opportunities/interest.html.
2. Kim E.J., Shim G., Kim K., Kwon I.C., Oh Y.K., Shim C.K. 2009. Hyaluronic acid complexed to biodegradable poly L-arginine for targeted delivery of siRNAs. *J. Gene Med.* **11**, 791–803.
3. Braasch D.A., Paroo Z., Constantinescu A., Ren G., Oz O.K., Mason R.P., Corey D.R. 2004. Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1139–1143.
4. Hall A.H., Wan J., Shaughnessy E.E., Ramsay Sh.B., Alexander K.A. 2004. RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5991–6000.
5. Chiu Y.L., Rana T.M. 2003. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA.* **9**, 1034–1048.
6. Layzer J.M., McCaffrey A.P., Tanner A.K., Huang Z., Kay M.A., Sullenger B.A. 2004. In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA.* **10**, 766–771.
7. Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavigne G., Pandey R.K., Racie T., Rajeev K.G., Röhl I., Toudjarska I., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Kotliansky V., Limmer S., Manoharan M., Vornlocher H.P. 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* **432**, 173–178.
8. de Paula D., Bentley M.V., Mahato R.I. 2007. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. *RNA.* **13**, 431–456.
9. Behlke M.A. 2008. Chemical modification of siRNAs for *in vivo* use. *Oligonucleotides.* **18**, 305–319.
10. Ikeda Y., Taira K. 2006. Ligand-targeted delivery of therapeutic siRNA. *Pharm. Res.* **23**, 1631–1640.
11. Bumcrot D., Manoharan M., Kotliansky V., Sah D.W. 2006. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 711–719.
12. Amarzguioui M., Holen T., Babaie E., Prydz H. 2003. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucl. Acids Res.* **31**, 589–595.
13. Shaw B.R., Moussa L., Sharaf M., Cheek M., Dobrikov M. Boranophosphate siRNA-aptamer chimeras for tumor-specific downregulation of cancer receptors and modulators. 2008. *Nucl. Acids Symp. Ser. (Oxf.)* **52**, 655–656.
14. Czauderna F., Fechtner M., Dames S., Aygun H., Klippel A., Pronk G.J., Giese K., Kaufmann J. 2003. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* **31**, 2705–2716.
15. Prakash T.P., Allerson C.R., Dande P., Vickers T.A., Sioufi N., Jarres R., Baher B.F., Swayze E.E., Griffey R.H., Bhar B. 2005. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. *J. Med. Chem.* **48**, 4247–4253.

16. Judge A.D., Bola G., Lee A.C., MacLachlan I. 2006. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing *in vivo*. *Mol. Ther.* **13**, 494–505.
17. Elmen J., Thonberg H., Ljungberg K., Frieden M., Westergaard M., Xu Y., Wahren B., Liang Z., Orum H., Koch T., Wahlestedt C. 2005. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucl. Acids Res.* **33**, 439–447.
18. Laursen M.M., Pakula M.B., Gao S., Fluiter K., Mook O.R., Baas F., Langklaer N., Wengel S.L., Wengel J., Kjems J., Bramsen J.B. 2010. Utilization of unlocked nucleic acid (UNA) to enhance siRNA performance *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Biosyst.* **6**, 862–870.
19. Obika S., Nanbu D., Hari Y., Andoh J., Morio K., Doi T., Imanishi T. 1998. Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O,4'-methyleneribonucleosides. *Tetrahedron Lett.* **39**, 5401–5404.
20. Koshkin A.A., Singh S.K., Nielsen P., Rajwanshi V.K., Kumar R., Meldgaard M., Olsen C.E., Wengel J. 1998. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron.* **54**, 3607–3630.
21. Singh S.K., Nielsen P., Koshkin A.A., Wengel J. 1998. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *J. Chem. Commun.* **4**, 455–456.
22. Fluiter K., Mook O.R., Baas F. 2009. The therapeutic potential of LNA-modified siRNAs: reduction of off-target effects by chemical modification of the siRNA sequence. *Methods Mol. Biol.* **487**, 189–203.
23. Mook O.R., Baas F., de Wissel M.B., Fluiter K. 2007. Evaluation of locked nucleic acid-modified small interfering RNA *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 833–843.
24. UsiRNA Technology http://www.marinabio.com/usinra_technology.
25. Moschos S.A., Jones S.W., Perry M.M., Williams A.E., Erjefalt J.S., Turner J.J., Barnes P.J., Sproat B.S., Gait M.J., Lindsay M.A. 2007. Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48–60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjug. Chem.* **18**, 1450–1459.
26. Muratovska A., Eccles M.R. 2004. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett.* **558**, 63–68.
27. Futaki S. 2002. Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms. *Int. J. Pharm.* **245**, 1–7.
28. Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y. 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **276**, 5836–5840.
29. Melikov K., Chernomordik L.V. 2005. Arginine-rich cell penetrating peptides: from endosomal uptake to nuclear delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2739–2749.
30. Derossi D., Calvet S., Trembleau A., Brunissen A., Chassaing G., Prochiantz A. 1996. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* **271**, 18188–18193.
31. Pooga M., Hallbrink M., Zorko M., Langel U. 1998. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* **12**, 67–77.
32. Cohen J.L., Almutairi A., Cohen J.A., Bernstein M., Brody S.L., Schuster D.P., Fréchet J.M. 2008. Enhanced cell penetration of acid-degradable particles functionalized with cell-penetrating peptides. *Bioconjug. Chem.* **19**, 876–881.
33. Deshayes S., Morris M.C., Divita G., Heitz F. 2005. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1839–1849.
34. Futaki S., Ohashi W., Suzuki T., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Harashima H., Sugiura Y. 2001. Stearilated arginine-rich peptides: a new class of transfection systems. *Bioconjug. Chem.* **12**, 1005–1011.
35. Console S., Marty C., Garcia-Echeverria C., Schwendener R., Ballmer-Hofer K. 2003. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) “protein transduction domains” promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **278**, 35109–35114.
36. Zhang W., Smith S.O. 2005. Mechanism of penetration of Antp(43–58) into membrane bilayers. *Biochemistry.* **44**, 10110–10118.
37. Futaki S., Nakase I., Tadokoro A., Takeuchi T., Jones A.T. 2007. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 784–787.
38. Nakase I., Niwa M., Takeuchi T., Sonomura K., Kawabata N., Koike Y., Takehashi M., Tanaka S., Ueda K., Simpson J.C., Jones A.T., Sugiura Y., Futaki S. 2004. Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther.* **10**, 1011–1022.
39. Nakase I., Tadokoro A., Kawabata N., Takeuchi T., Katoh H., Hiramoto K., Negishi M., Nomizu M., Sugiura Y., Futaki S. 2007. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry.* **46**, 492–501.
40. Tokatlian T., Segura T. 2010. siRNA applications in nanomedicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2**, 305–315.
41. Eguchi A., Meade B.R., Chang Y.C., Fredrickson C.T., Willert K., Puri N., Dowdy S.F. 2009. Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nat. Biotechnol.* **27**, 567–571.
42. Kim W.J., Christensen L.V., Jo S., Yockman J.W., Jeong J.H., Kim Y.H., Kim S.W. 2006. Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Mol. Ther.* **14**, 343–350.
43. Kumar L.D., Clarke A.R. 2007. Gene manipulation through the use of small interfering RNA (siRNA): from *in vitro* to *in vivo* applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 87–100.

44. Oishi M., Nagasaki Y., Itaka K., Nishiyama N., Kataoka K. 2005. Lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate through acid-labile beta-thiopropionate linkage to construct pH-sensitive polyion complex micelles achieving enhanced gene silencing in hepatoma cells. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1624–1625.
45. Rozema D.B., Lewis D.L., Wakefield D.H., Wong S.C., Klein J.J., Roesch P.L., Bertin S.L., Reppen T.W., Chu Q., Blokhin A.V., Hagstrom J.E., Wolff J.A. 2007. Dynamic polyconjugates for targeted *in vivo* delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 12982–12987.
46. Wolfrum C., Shi S., Jayaprakash K.N., Jayaraman M., Wang G., Pandey R.K., Rajeev K.G., Nakayama T., Charrise K., Ndungo E.M., Zimmermann T., Kotliansky V., Manoharan M., Stoffel M. 2007. Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1149–1157.
47. Nishina K., Unno T., Uno Y., Kubodera T., Kanouchi T., Mizusawa H., Yokota T. 2008. Efficient *in vivo* delivery of siRNA to the liver by conjugation of alpha-tocopherol. *Mol. Ther.* **16**, 734–740.
48. Dharmacon RNAi Technologies <http://www.dharmacon.com/PopUpTemplate.aspx?id=1033>.
49. Check Hayden E. 2008. Thousands of proteins affected by miRNAs. *Nature.* **454**, 562.
50. Hung C.F., Lu K.C., Cheng T.L., Wu R.H., Huang L.Y., Teng C.F., Chanq W.T. 2006. A novel siRNA validation system for functional screening and identification of effective RNAi probes in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**, 707–720.
51. Алшедди Т., Васин Л., Медури Р., Рандава М., Глазко Г., Баранова А.В. Высокоспецифичные малые интерферирующие РНК (siРНК): систематический подход к дизайну с помощью алгоритма CRM. 2008. *Молекуляр. биология.* **42**, 150–162.
52. Tilesi F., Fradiani P., Soggi V., Willems D., Ascenzioni F. 2009. Design and validation of siRNAs and shRNAs. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **11**, 156–164.
53. Baranova A., Bode J., Manyam G., Emelianenko M. 2011. An efficient algorithm for systematic analysis of nucleotide strings suitable for siRNA design. *BMC Res. Notes.* **27**, 168.
54. Birmingham A., Anderson E.M., Reynolds A., Ilsley-Tyree D., Leake D., Fedorov Y., Baskerville S., Maksimova E., Robinson K., Karpilow J., Marshall W.S., Khvorova A. 2006. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat. Methods.* **3**, 199–204.
55. Weitzer S., Martinez J. 2007. hClp1: a novel kinase revitalizes RNA metabolism. *Cell Cycle.* **6**, 2133–2137.
56. Chen P.Y., Weinmann L., Gaidatzis D., Pei Y., Zavanian M., Tuschl T., Meister G. 2008. Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA.* **14**, 263–274.
57. Off-Target Effects: Disturbing the Silence of RNA interference (RNAi): http://www.dharmacon.com/uploadedFiles/Home/Support_Center/Technical_Reviews/off-target-tech-review.pdf.
58. Kirchoff F. 2008. Silencing HIV-1 *in vivo*. *Cell.* **134**, 566–568.
59. Leng Q., Woodle M.C., Lu P.Y., Mixson A.J. 2009. Advances in systemic siRNA delivery. *Drugs Future.* **34**, 721.
60. Li W., Szoka Jr.F.C. 2007. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm. Res.* **24**, 438–449.
61. Juliano R., Bauman J., Kang H., Ming X. 2009. Biological barriers to therapy with antisense and siRNA oligonucleotides. *Mol. Pharm.* **6**, 686–695.
62. Scherphof G.L. 1991. *In vivo* behavior of liposomes: Interactions with the mononuclear phagocyte system and implications for drug targeting. In: *Handbook of Experimental Pharmacology.* Ed. Juliano R.L. Berlin: Springer-Verlag, **100**, 285–300.
63. Shim M.S., Kwon Y.J. 2010. Efficient and targeted delivery of siRNA *in vivo*. *FEBS J.* **277**, 4814–4827.
64. Jang S.H., Wientjes M.G., Lu D., Au J.L. 2003. Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharm. Res.* **20**, 1337–13350.
65. Cho-Rock J., Yoo J., Jang Y.J., Kim S., Chu I.-S., Yeom Y.I., Choi J.Y., Im D.-S. 2006. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PTTG1 inhibits liver cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology.* **43**, 1042–1052.
66. Juliano R., Alam M.R., Dixit V., Kang H. 2008. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* **36**, 4158–4171.
67. Khalil I.A., Kogure K., Akita H., Harashima H. 2006. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* **58**, 32–45.
68. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **377**, 159–169.
69. Spagnou S., Miller A.D., Keller M. 2004. Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry.* **43**, 13348–13356.
70. Tong A.W., Jay C.M., Senzer N., Maples P.B., Nemunaitis J. 2009. Systemic therapeutic gene delivery for cancer: crafting Paris' arrow. *Curr. Gene Ther.* **9**, 45–60.
71. Zelphati O., Uyechi L.S., Barron L.G., Szoka Jr.F.C. 1998. Effect of serum components on the physicochemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1390**, 119–133.
72. Li S., Huang L. 1997. *In vivo* gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther.* **4**, 891–900.
73. Liu F., Qi H., Huang L., Liu D. 1997. Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection *in vivo* via intravenous administration. *Gene Ther.* **4**, 517–523.
74. Oja C.D., Semple S.C., Chonn A., Cullis P. 1996. Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1281**, 31–37.
75. Semple S.C., Chonn A., Cullis P. 1996. Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. *Biochemistry.* **35**, 2521–2525.

76. David S., Pitard B., Benoît J.P., Passirani C. 2010. Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery. *Pharmacol. Res.* **62**, 100–114.
77. Ogris M., Wagner E. 2002. Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug Discov. Today.* **7**, 479–485.
78. Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Trubetskoy V., Torchilin V., Langer R. 1994. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science.* **263**, 1600–1603.
79. Veronesi F.M., Pasut G. 2005. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today.* **10**, 1451–1458.
80. Guo J., Fisher K.A., Darcy R., Cryan J.F., O'Driscoll C. 2010. Therapeutic targeting in the silent era: advances in non-viral siRNA delivery. *Mol. Biosys.* **6**, 1143–1161.
81. Ishida T., Kiwada H. 2008. Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. *Int. J. Pharm.* **354**, 56–62.
82. Kim E.J., Shim G., Kim K., Kwon I.C., Oh Y.K., Shim C.K. 2009. Hyaluronic acid complexed to biodegradable poly L-arginine for targeted delivery of siRNAs. *J. Gene Med.* **11**, 791–803.
83. Wang Y., Li Z., Han Y., Liang L.H., Ji A. 2010. Nanoparticle-based delivery system for application of siRNA *in vivo*. *Curr. Drug Metab.* **11**, 182–196.
84. Jiang G., Park K., Kim J., Kim K.S., Hahn S.K. 2009. Target specific intracellular delivery of siRNA/PEI-HA complex by receptor mediated endocytosis. *Mol. Pharm.* **6**, 727–737.
85. de Martimprey H., Vauthier C., Malvy C., Couvreur P. 2009. Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: oligonucleotides and siRNA. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **71**, 490–504.
86. Kircheis R., Schuller S., Brunner S., Ogris M., Heider K.H., Zauner W., Wagner E.J. 1999. Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery *in vivo*. *Gene Med.* **1**, 111–120.
87. Pitard B., Oudrhiri N., Lambert O., Vivien E., Masson C., Wetzler B., Hauchecorne M., Scherman D., Rigaud J.L., Vigneron J.P., Lehn J.M., Lehn P. 2001. Sterically stabilized BGTC-based lipoplexes: structural features and gene transfection into the mouse airways *in vivo*. *Gene Med.* **3**, 478–487.
88. Pack D.W., Hoffman A.S., Pun S., Stayton P.S. 2005. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discovery.* **4**, 581–593.
89. Howard K.A., Rahbek U.L., Liu X., Damgaard C.K., Glud S.Z., Andersen M.O., Hovgaard M.B., Schmitz A., Nyengaard J.R., Besenbacher F., Kjems J. 2006. RNA interference *in vitro* and *in vivo* using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol. Ther.* **14**, 476–484.
90. Zhang X., Shan P., Jiang D., Noble P.W., Abraham N.G., Kappas A., Lee P.J. 2004. Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 10677–10684.
91. Bitko V., Musiyenko A., Shulyayeva O., Barik S. 2005. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat. Med.* **11**, 50–55.
92. de Vry J., Martínez-Martínez P., Losen M., Temel Y., Steckler T., Steinbusch H.W., de Baets M.H., Prickaerts J. 2010. *In vivo* electroporation of the central nervous system: a non-viral approach for targeted gene delivery. *Prog. Neurobiol.* **92**, 227–44.
93. Makimura H., Mizuno T.M., Mastaitis J.W., Agami R., Mobbs C.V. 2002. Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC Neurosci.* **3**, 18.
94. Thakker D.R., Natt F., Hüsken D., Maier R., Müller M., van der Putten H., Hoyer D., Cryan J.F. 2004. Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain by using nonviral RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 17270–17275.
95. Thakker D.R., Hüsken D., van der Putten H., Maier R., Hoyer D., Cryan J.F. 2005. siRNA-mediated knockdown of the serotonin transporter in the adult mouse brain. *Mol. Psychiatry.* **10**, 782–789, 714.
96. Dorn G., Patel S., Wotherspoon G., Hemmings-Mieszcak M., Barclay J., Natt F.J., Martin P., Bevan S., Fox A., Ganju P., Wishart W., Hall J. 2004. siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucl. Acids Res.* **32**, e49.
97. Emerson M.V., Lauer A.K. 2007. Emerging therapies for the treatment of neovascular age-related macular degeneration and diabetic macular edema. *BioDrugs.* **21**, 245–257.
98. Tompkins S.M., Lo C.Y., Tumpey T.M., Epstein S.L. 2004. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 8682–8686.
99. Chae S.S., Paik J.H., Furneaux H., Hla T. 2004. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by *in vivo* RNA interference. *J. Clin. Invest.* **114**, 1082–1089.
100. 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. Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat. Biotechnol.* **23**, 709–717.
101. Wu S.Y., McMillan N.A. 2009. Lipidic systems for *in vivo* siRNA delivery. *AAPS J.* **11**, 639–652.
102. Palliser D., Chowdhury D., Wang Q.Y., Lee S.J., Bronson R.T., Knipe D.M., Lieberman J. 2006. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature.* **439**, 89–94.
103. Azuma M., Ritprajak P., Hashiguchi M. 2010. Topical application of siRNA targeting cutaneous dendritic cells in allergic skin disease. *Methods Mol. Biol.* **623**, 373–381.
104. Takanashi M., Oikawa K., Sudo K., Tanaka M., Fujita K., Ishikawa A., Nakae S., Kaspar R.L., Matsuzaki M., Kudo M., Kuroda M. 2009. Therapeutic silencing of an endogenous gene by siRNA cream in an arthritis model mouse. *Gene Ther.* **16**, 982–989.
105. Manjunath N., Dykxhoorn D.M. 2010. Advances in synthetic siRNA delivery. *Discov. Med.* **9**, 418–430.
106. Pirollo K.F., Rait A., Zhou Q., Hwang S.H., Dagata J.A., Zon G., Hogrefe R.I., Palchik G., Chang E.H. 2007. Materializing the potential of small interfering RNA

- via a tumor-targeting nanodelivery system. *Cancer Res.* **67**, 2938–2943.
107. Peer D., Zhu P., Carman C.V., Lieberman J., Shimaoka M. 2007. Selective gene silencing in activated leukocytes by targeting siRNAs to the integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 4095–4100.
108. Sato A., Takagi M., Shimamoto A., Kawakami S., Hashida M. 2007. Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration of galactosylated cationic liposomes in mice. *Biomaterials.* **28**, 1434–1442.
109. Hu-Lieskovan S., Heidel J.D., Bartlett D.W., Davis M.E., Triche T.J. 2005. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* **65**, 8984–8992.
110. 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. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucl. Acids Res.* **32**, e149.
111. Maeda H. 2001. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **41**, 189–207.
112. Greish K. 2010. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. *Methods Mol. Biol.* **624**, 25–37.
113. Zhou J., Rossi J.J. 2010. Aptamer-targeted cell-specific RNA interference. *Silence.* **1**, 4.
114. Gold L., Polisky B., Uhlenbeck O., Yarus M. 1995. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 763–797.
115. Dassie J.P., Liu X.Y., Thomas G.S., Whitaker R.M., Thiel K.W., Stockdale K.R., Meyerholz D.K., McCaffrey A.P., McNamara J.O., Giangrande P.H. 2009. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat. Biotechnol.* **27**, 839–849.
116. McNamara J.O., Andrechek E.R., Wang Y., Viles K.D., Rempel R.E., Gilboa E., Sullenger B.A., Giangrande P.H. 2006. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1005–1015.
117. Peer D., Park E.J., Morishita Y., Carman C.V., Shimaoka M. 2008. Systemic leukocyte-directed siRNA delivery revealing cyclin D1 as an anti-inflammatory target. *Science.* **319**, 627–630.
118. Zhang Y., Zhang Y.F., Bryant J., Charles A., Boado R.J., Pardridge W.M. 2004. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 3667–3677.
119. Watanabe T., Umehara T., Yasui F., Nakagawa S., Yano J., Ohgi T., Sonoke S., Satoh K., Inoue K., Yoshida M., Kohara M. 2007. Liver target delivery of small interfering RNA to the HCV gene by lactosylated cationic liposome. *J. Hepatol.* **47**, 744–750.
120. Chen Y., Sen J., Bathula S.R., Yang Q., Fittipaldi R., Huang L. 2009. Novel cationic lipid that delivers siRNA and enhances therapeutic effect in lung cancer cells. *Mol. Pharm.* **6**, 696–705.
121. Senior J.H., Trimble K.R., Maskiewicz R. 1991. Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1070**, 173–179.
122. Sakurai F., Nishioka T., Saito H., Baba T., Okuda A., Matsumoto O., Taga T., Yamashita F., Takakura Y., Hashida M. 2001. Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: the role of the neutral helper lipid. *Gene Ther.* **8**, 677–686.
123. Oyewumi M.O., Yokel R.A., Jay M., Coakley T., Mumper R.J. 2004. Comparison of cell uptake, biodistribution and tumor retention of folate-coated and PEG-coated gadolinium nanoparticles in tumor-bearing mice. *J. Control Release.* **95**, 613–626.
124. Richardson S.C., Kolbe H.V., Duncan R. 1999. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *Int. J. Pharm.* **178**, 231–243.
125. Akhtar S., Benter I. 2007. Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 164–182.
126. Hollins A.J., Omidi Y., Benter I.F., Akhtar S. 2007. Toxicogenomics of drug delivery systems: Exploiting delivery system-induced changes in target gene expression to enhance siRNA activity. *J. Drug Target.* **15**, 83–88.
127. Omidi Y., Hollins A.J., Drayton R.M., Akhtar S. 2005. Polypropylenimine dendrimer-induced gene expression changes: the effect of complexation with DNA, dendrimer generation and cell type. *J. Drug Target.* **13**, 431–443.
128. Omidi Y., Hollins A.J., Benboubetra M., Drayton R., Benter I.F., Akhtar S. 2003. Toxicogenomics of non-viral vectors for gene therapy: a microarray study of lipofectin- and oligofectamine-induced gene expression changes in human epithelial cells. *J. Drug Target.* **6**, 311–323.
129. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* **411**, 494–498.
130. Hornung V., Guenther-Biller M., Bourquin C., Ablasser A., Schlee M., Uematsu S., Noronha A., Manoharan M., Akira S., de Fougerolles A., Endres S., Hartmann G. 2005. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* **11**, 263–270.
131. Sioud M., Sørensen D.R. 2003. Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 1220–1225.
132. Judge A.D., Sood V., Shaw J.R., Fang D., McClintock K., MacLachlan I. 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* **23**, 457–462.

133. Kariko K., Bhuyan P., Capodici J., Weissman D. 2004. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J. Immunol.* **172**, 6545–6549.
134. Marques J.T., Williams B.R.G. 2005. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat. Biotech.* **23**, 1399–1405.
135. Robbins M., Judge A., MacLachlan I. 2009. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides.* **19**, 89–102.
136. Ma Z., Li J., He F., Wilson A., Pitt B., Li S. 2005. Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 755–759.
137. Ge Q., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H.N., Chen J. 2004. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 8676–8681.
138. Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavigne G., Pandey R.K., Racie T., Rajeev K.G., Röhl I., Toudjarska I., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Koteliensky V., Limmer S., Manoharan M., Vornlocher H.P. 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* **432**, 173–178.
139. 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., Koteliensky V., Manoharan M., Vornlocher H.P., MacLachlan I. 2006. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* **441**, 111–114.
140. Gantier M.P., Tong S., Behlke M.A., Irving A.T., Lappas M., Nilsson U.W., Latz E., McMillan N.A., Williams B.R. 2010. Rational design of immunostimulatory siRNAs. *Mol. Ther.* **18**, 785–795.
141. Furset G., Sioud M. 2007. Design of bifunctional siRNAs: combining immunostimulation and gene-silencing in one single siRNA molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 642–649.
142. Poeck H., Besch R., Maihoefer C., Renn M., Tormo D., Morskaya S.S., Kirschnek S., Gaffal E., Landsberg J., Hellmuth J., Schmidt A., Anz D., Bscheider M., Schwerdt T., Berking C., Bourquin C., Kalinke U., Kremmer E., Kato H., Akira S., Meyers R., Häcker G., Neuenhahn M., Busch D., Ruland J., Rothenfusser S., Prinz M., Hornung V., Endres S., Tüting T., Hartmann G. 2008. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat. Med.* **14**, 1256–1263.
143. Liu S., Shibata A., Ueno S., Huang Y., Wang Y., Li Y. 2006. Translocation of positively charged copoly(Lys/Tyr) across phospholipid membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**, 761–768.
144. Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggard T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K.A., Linse S. 2007. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 2050–2055.