

УДК 577.218

НЕВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ siРНК

© 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.

На сегодняшний день РНК-интерференция считается самым мощным и многообещающим инструментом ген-направленной терапии. Но для успешного применения siРНК в клинике необходимо решить ряд проблем, одна из которых разработка способа эффективной доставки siРНК. Данный обзор посвящен рассмотрению современных видов невирусных систем доставки siРНК.

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

TYPES OF NON-VIRAL DELIVERY SYSTEMS OF SMALL INTERFERING RNA, by K. V. Glebova¹, A. V. Marakhonov¹, A. V. Baranova, 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). To date, RNA interference remains the most powerful and promising tool for gene-targeted therapy. Several problems still have to be solved for its successful use in clinics. One of the main issues is the siRNA's efficient delivery. This review covers various types of non-viral siRNA delivery systems.

Keywords: RNA interference, siRNA, delivery of siRNA.

ВВЕДЕНИЕ

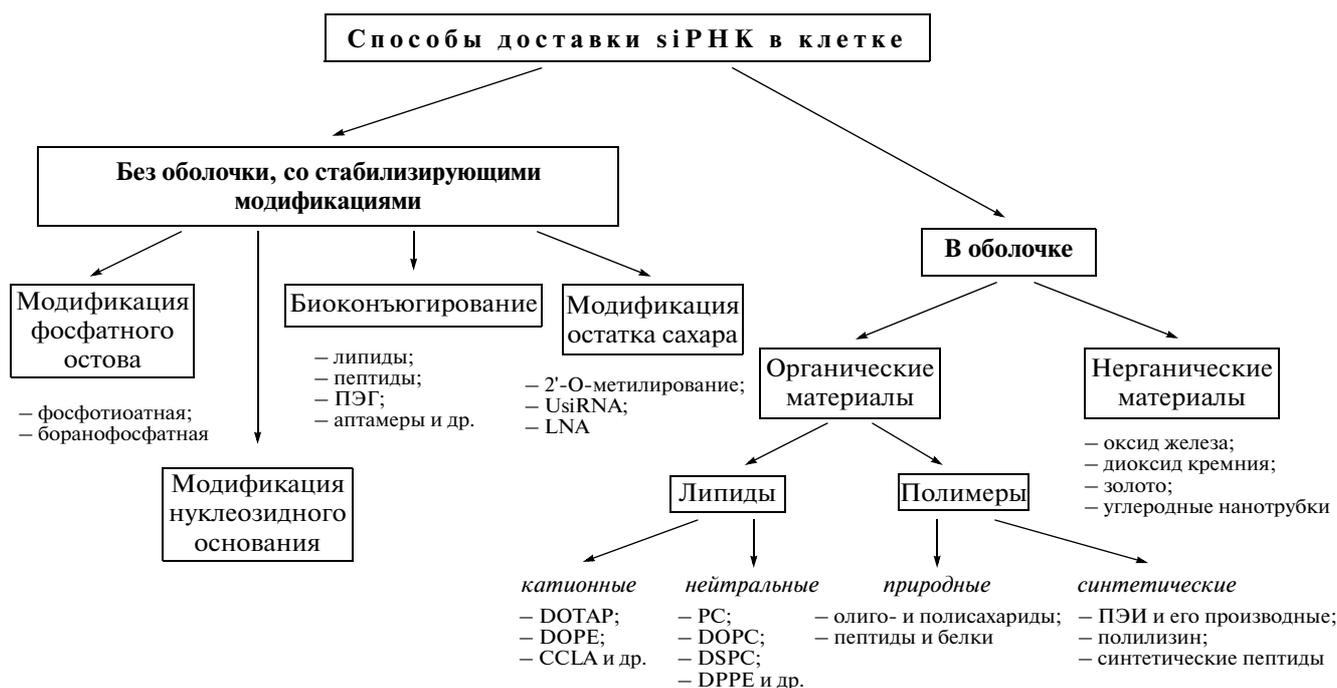
Поскольку в основе большинства заболеваний человека лежит изменение уровня продукции тех или иных белков, открытие явления РНК-интерференции, без сомнения, считается одной из наиболее значимых вех в развитии мировой науки и обладает огромным коммерческим потенциалом. Одна из основных проблем, стоящих на пути внедрения технологии малых интерферирующих РНК (siРНК) в клинику, — вопрос ее доставки в целевые клетки. Разработанные на настоящий момент системы доставки siРНК можно подразделить на две большие группы: вирусные и невирусные. Доставка siРНК с помощью вирусов осуществляется чрезвычайно эффективно вследствие присущей вирусам способности транспортировать генетический материал в клетки [1], однако потенциальная канцерогенность, способность индуцировать иммунный ответ, а также другие факторы, например, высокая стоимость произ-

водства [2], заставили исследователей сосредоточить внимание на системах невирусной доставки siРНК.

На рисунке представлены известные на настоящий момент способы невирусной доставки siРНК в клетки-мишени. Доставку siРНК без оболочки широко использовали на ранних этапах исследований явления РНК-интерференции [3, 4]. Тогда же разработаны различные способы модификации, позволяющие повысить стабильность и липофильность таких siРНК, а также снизить их иммунно-стимулирующую активность [3]. Способы модификации безоболоченной siРНК подробно рассмотрены в нашем обзоре “Терапевтические siРНК и невирусные системы их доставки” (№3, стр. 371–386), поэтому в данной работе основное внимание уделено методам доставки siРНК в оболочку. Как видно из приведенной схемы, оболочка может иметь органическое и неорганическое происхождение. В настоя-

Принятые сокращения: DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) — 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин; DOPE — диолеил-L-альфа-фосфатидилэтаноламин; DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane) — 1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан; GFP (green fluorescent protein) — зеленый флуоресцентный белок; JRed — красный флуоресцентный белок; siРНК — малые интерферирующие РНК; SWNTs (single-wall carbon nanotubes) — одностенные углеродные нанотрубки; TNF α — фактор некроза опухоли α ; МРТ — магнитная резонансная томография; ПЭГ — полиэтиленгликоль; ПЭИ — полиэтиленимин; ПАЭИ — полиамидоэтиленимин; ЦД — циклодекстрины; ЦДП — β -циклодекстрин-содержащие поликатионы.

* Эл. почта: mskoblov@generesearch.ru



Способы доставки siРНК в клетки.

щее время неорганические носители распространены мало, большая часть исследований с их использованием проводилась *in vitro*. Органические носители siРНК, наоборот, хорошо изучены и широко применяются, в том числе и в исследованиях *in vivo*. Большинство таких носителей было разработано в конце прошлого столетия, и применялись они для доставки ДНК в клетки. Позднее этот опыт “перенесли” на работы с siРНК.

Органические системы доставки включают липидные и полимерные носители, которые, в свою очередь, можно подразделить соответственно на катионные/нейтральные и природные/синтетические. Каждый из этих носителей обладает рядом преимуществ и недостатков (таблица), о которых речь пойдет ниже, поэтому в настоящее время лишь в редких случаях при приготовлении систем доставки siРНК используется один тип носителя. Комбинация нескольких материалов часто позволяет добиться лучшего результата, чем использование каждого из них по отдельности.

ЛИПИДНЫЕ СИСТЕМЫ

Липосомы используются для доставки нуклеиновых кислот уже более 25 лет, начиная с эпохальной работы Сориано (P. Soriano) с соавторами [5], где впервые показана способность нейтральных липосом транспортировать ген препроинсулина в печень. Вследствие технических трудностей, связанных с включением отрицательно заряженной ДНК в нейтральные липосомы, постепенно эти

носители были вытеснены катионными липосомами — их впервые использовали для доставки нуклеиновых кислот в клетки в 1989 г. [6].

КАТИОННЫЕ ЛИПОСОМЫ

Катионные липосомы — один из наиболее часто используемых носителей siРНК [7]. Положительный заряд катионных липосом способствует формированию компактных комплексов с полианионной нуклеиновой кислотой — так называемых липоплексов, размер которых варьирует от 200 до 300 нм, — а также взаимодействию последних с отрицательно заряженными клеточными мембранами. Наиболее часто для приготовления катионных липоплексов используется катионный липид *N*-[1-(2,3-диолеилокси)]-*N,N,N*-триметиламмоний пропан (DOTAP), а также его смеси с нейтральными липидами, такими как DOPE и холестерин.

Арнольд (A.S. Arnold) и коллеги [8] показали, что однократное внутривенное введение комплексов siРНК с DOTAP-липосомами (1 мг/кг) вызывает блокаду экспрессии β 1-адренорецептора и существенное снижение кровяного давления у спонтанно гипертензивных крыс в течение 12 сут. Важно отметить, что эффект, полученный при использовании липоплексов значительно превосходил тот, который наблюдался при применении β -блокаторов. В другой работе при использовании DOTAP для *in vivo* доставки siРНК, направленной против фактора некроза опухоли α

Достоинства и недостатки известных органических оболочек невирусных систем доставки siРНК

Тип носителя	Достоинства	Недостатки
Катионные липосомы	—биodeградируемость —повышенная эффективность взаимодействия с отрицательно заряженными мембранами клеток <i>in vitro</i> ; —возможность модификации поверхности липосом полимерами и нацеливающими агентами	—адсорбция на поверхности липосом отрицательно заряженных сывороточных белков; —способность к агрегации; —способность индуцировать иммунный ответ у хозяина; —цитотоксичность; —способность к индукции экспрессии случайных генов
Нейтральные липосомы	—биodeградируемость; —сниженная сорбция сывороточных белков; —возможность модификации поверхности липосом полимерами и нацеливающими агентами	—способность к агрегации; —способность индуцировать иммунный ответ у хозяина
Экзосомы	—биосовместимость и биodeградируемость; —возможность нацеливания	—времязатратный способ получения носителей; —высокая стоимость получения носителей; —невозможность автоматизации процесса производства
Полиплексы из ателоколлагена	—биосовместимость и биodeградируемость; —низкая иммуногенность; —низкая токсичность	нет данных
Полиплексы из циклодекстринов	—низкая иммуногенность; —возможность модификации полимерами и нацеливающими агентами	нет данных
Хитозан	—биodeградируемость; —мукоадгезивные свойства и способность проникать через слизистые оболочки; —повышенная эффективность взаимодействия с отрицательно заряженными мембранами клеток <i>in vitro</i>	нет данных
Пептиды и белки	—биodeградируемость; —возможность модификации нацеливающими агентами	нет данных
Полиэтиленимин и полилизин	—возможность модификации поверхности полимерами и нацеливающими агентами	—цитотоксичность; —способность индуцировать иммунный ответ у хозяина; —способность вызывать агрегацию тромбоцитов; —способность стимулировать эндотелиальные клетки легких

(TNF α), наблюдали ингибирование индуцированной липополисахаридом экспрессии TNF α у мышей [9].

Некоторые исследователи изучали способность коммерчески доступных катионных липидных составов, таких как липофектин, RNAifect (“Qiagen”), олигофектамин, липофектамин (Oligofectamine, Lipofectamine фирмы “Invitrogen”) и TransIT TCO (“Mirus”), улучшать доставку siРНК *in vitro*. Эффективность этих препаратов продемонстрирована в серии работ [10–13]. Положительные результаты получены и при их использовании в экспериментах *in vivo*. Так, Верма (U.N. Verma) и др. [14] показали, что siРНК, направленная против β -катенина и введенная с олигофектамином, существенно снижает экспрессию

соответствующего гена и ингибирует пролиферацию клеток рака толстой кишки в ксенотрансплантатах у бестимусных мышей.

С целью увеличения эффективности трансфекции siРНК при создании липосом используют также смеси DOTAP с другими катионными липидами. Чие (P.Y. Chien) и др. [15], например, разработали липосомы, состоящие из катионного аналога кардиолипина (CCLA) и DOPE (молярное отношение 1 : 2). Эти липосомы оказались в 7 раз более эффективными и менее токсичными, чем коммерческие DOTAP-липосомы (In Vivo GeneSHUTTLEtm) *in vitro* и *in vivo*. Введение комплексов siРНК, направленной против гена *c-raf*, с CCLA-липосомами мышам с ксенотрансплантатами клеток рака молочной железы человека приводило к подавлению

роста опухоли на 73% (по сравнению с животными, которым вводили незащищенную siРНК). Хоури (M. Houry) и др. [16] приготовили липосомы, содержащие катионный липид RPR209120 (2-(3-[бис-(3-амино-пропил)-амино]-пропиламино)-N-дитетрадецилкарбамоилметил-ацетамид) и DOPE в молярном соотношении 1 : 1. Для оценки эффективности разработанной системы доставки авторы вводили липосомы, содержащие siРНК против TNF α , мышам с артритом, индуцированным коллагеном. Показано, что системное введение таких липосом приводит к снижению секреции TNF α в кровь и ткани колена и, как следствие, к значительному снижению заболеваемости. Кроме того, в данной работе в качестве одного из компонентов системы доставки также использована плазмидная ДНК. Добавление ДНК-носителя в состав комплекса приводило к усилению эффекта: секреция TNF α в тканях колена блокировалась на 50–60% siРНК-липосомами и на 75% siРНК-липосомами, содержащими ДНК.

Для выявления роли кавеолина-1 в регуляции проницаемости сосудов легких Мияваки-Шимизу (K. Miyawaki-Shimizu) и соавт. [17] использовали siРНК, инкапсулированную в липосомы, состоящие из диметилдиокадециламмоний бромида и холестерина (молярное соотношение 1 : 1). Другие исследователи при конструировании комплексов липосом с siРНК использовали более сложные смеси липидов [18–21].

В поисках наиболее эффективной системы доставки Акинс (A. Akins) и соавт. [22] создали комбинаторную библиотеку, состоящую из 1200 липидоподобных молекул – липидоидов. Эти молекулы были получены путем конъюгации алкилакрилатов или алкилакриламидов с первичными или вторичными аминами по одностадийной схеме синтеза. Наиболее оптимальная система доставки, LNP01, состояла из липидоида 98N12-5(1), холестерина, полиэтиленгликоль-С14-глицерида (mPEG₂₀₀₀-С14), взятых в молярном соотношении 42 : 48 : 10. Анализ биораспределения показал, что LNP01 (3 мкг/кг siРНК) быстро распределяется, главным образом, в печень и селезенку (95% введенной дозы), и только 0.5% LNP01 найдено в легких. В этом же исследовании показано, что LNP01 можно вводить повторно через продолжительные периоды времени, при этом его эффективность *in vivo* сохраняется. Кроме того, при повторном введении мышам отрицательных эффектов не наблюдалось.

Важное преимущество липосом состоит в том, что их поверхность можно модифицировать полимерами. Подобные модификации способствуют увеличению времени циркуляции липосом в крови, снижению их агрегации и элиминирования ретикулоэндотелиальной системой. Модификация липосом нацеливающими агентами, в

свою очередь, позволяет проводить направленную доставку терапевтических агентов в клетки-мишени. Такой подход использован Пиролло (K.F. Pirollo) и соавт. [23]; они показали, что катионные липосомы, несущие фрагмент антитела к рецептору трансферрина, эффективно доставляют siРНК против гена *HER2* в опухолевые ксенотрансплантаты бестимусных мышей.

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что катионные липосомы проявляют высокую эффективность при системной доставке siРНК *in vivo*, однако их широкому клиническому использованию препятствуют проблемы токсикологического характера. Так, в ряде работ *in vitro* и *in vivo* показана токсичность катионных липидов [4, 24, 25]. Кроме того, установлено, что составы некоторых катионных липидов сами по себе вызывают экспрессию ряда генов [26], а также способствуют иммунному ответу на siРНК [27]. Для клинического использования катионных липосом в качестве средств доставки siРНК необходима разработка новых стабильных и нетоксичных липидов. С целью избежать токсичности проводят конъюгацию siРНК с такими носителями как пептиды, аптамеры и холестерин [28].

НЕЙТРАЛЬНЫЕ ЛИПОСОМЫ

Как упоминалось ранее, на начальном этапе разработки носителей для доставки ДНК в клетки использовали нейтральные липосомы, но позднее они были вытеснены катионными. Однако, в связи с обнаруженной в многочисленных исследованиях повышенной токсичностью катионных липосом, на нейтральные липосомы вновь стали смотреть как на перспективные носители нуклеиновых кислот [29].

Одним из наиболее важных достижений в области доставки siРНК считается разработка липосом на основе 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (DOPC), средний размер которых составляет 65 нм [30–34]. Такие липосомы могут осуществлять доставку siРНК *in vivo* в опухолевые клетки в 10 и 30 раз эффективнее, чем соответственно катионные DOTAP-липосомы и незащищенные siРНК [35]. Внутривенные (в.в.) или внутривентрикулярные (в.п.) инъекции комплексов siРНК с DOPC-липосомами в дозе 150 мкг/кг/сут. мышам с ксенотрансплантатами различных видов рака человека дважды в неделю приводили к значительному снижению экспрессии целевых генов (*EphA2*, *FAK*, *NRP2*, *IL-8* или *Bcl-2*), а также к уменьшению размеров опухолей [30–34]. Однократная инъекция комплекса siРНК с DOPC-липосомами (150 мкг/кг в.в. или в.п.) приводила к ингибированию экспрессии целевого белка на период более четырех суток [30].

ДОРС-липосомы не индуцировали никаких патологических состояний или токсичности в нормальных клетках, включая фибробласты, клетки костного мозга и гемопоэтические клетки [7], что сделало их очень привлекательными объектами для дальнейших исследований и разработок.

Циммерман (T.S. Zimmermann) и соавт. [36] разработали липосомы, состоящие из дистеароил-глицерофосфатидилхолина (DSPC), дилинолеилдиметиламинопропана (DLinDMA), метокси-полиэтиленгликоль-карбамоил-димиристилокси-пропиламина (PEG-c-DMA) и холестерина. Размер этих частиц составлял 77–83 нм, и они были успешно использованы для системной доставки siРНК против гена *apoB* у мышей и нечеловекообразных приматов [36]. Однократное введение siРНК, инкапсулированной в такие липосомы (2.5 мг/кг), приводило к снижению экспрессии гена *apoB* в печени макака-крабеда (*Macaca fascicularis*) более чем на 90%. Это, в свою очередь, вызывало значительное снижение уровней холестерина и липопротеинов низкой плотности в крови. Данный эффект поддерживался в течение 11 сут после введения препарата. В течение этого периода у животных не наблюдалось токсичности или нецелевых эффектов. Следует отметить, что ПЭГилированные липосомы представляют собой клинически утвержденную систему доставки доксорубина [37, 38] и поэтому в перспективе могут быть использованы для доставки противоопухолевых siРНК. Однако при повторном введении таких препаратов необходимо учитывать, что эти носители могут стимулировать сильный иммунный ответ [39, 40].

Джадж (A.D. Judge) и соавт. [41] и Морриссей (D.V. Morrissey) с соавт. [42] для *in vivo* сайленсинга мРНК вируса гепатита В и гена *apoB*, соответственно, использовали носители, получившие название стабильных липидных частиц нуклеиновой кислоты (SNALPs, stable nucleic acid-lipid particles). При создании носителей для siРНК Морриссей (D.V. Morrissey) и соавт. оптимизировали методику спонтанного образования везикул, разработанную ранее Джеффсом (L.V. Jeffs) и др. [43]. Полученные носители состояли из липидного бислоя, содержащего смесь катионных и фузогенных липидов, покрытого растворимым конъюгатом ПЭГ с липидом (DSPC:Chol:PEG-C-DMA:DLinDMA в молярном соотношении 20 : 48 : 2 : 30). Бислой обеспечивал проникновение комплексов в клетку и высвобождение siРНК из эндосомы, а конъюгат ПЭГ с липидом формировал нейтральную гидрофильную оболочку и способствовал стабилизации образующихся частиц; при введении частиц ПЭГ-липидный конъюгат диссоциировал из SNALP. Существенный недостаток SNALP-доставки заключался в том, что она не обладала системой нацеливания, вследствие чего siРНК помимо органа-мишени (печени) попада-

ла в нецелевые клетки, что приводило к увеличению цитотоксичности [44].

Пир (D. Peer) и соавт. [45] показали, что многослойные липосомы, состоящие из фосфатидилхолина, дипальмитоилфосфатидилэтаноламина (DPPE) и холестерина, эффективно защищают инкапсулированную siРНК от деградации РНКазами и способствуют интернализации в клетки в ходе рецептор-опосредованного эндоцитоза. Системное введение siРНК против циклина D1, инкапсулированной в такие липосомы, приводило к подавлению пролиферации лейкоцитов и экспрессии цитокинов Т-хелперами. Для нацеливания на определенные субпопуляции лейкоцитов такие липосомы модифицировали антителами к интегрину $\beta 7$, что приводило к эффективному сайленсингу при низких дозах терапевтического агента (2.5 мг/кг) и к незначительным нецелевым и токсическим эффектам.

Недавно сконструированы так называемые “сэндвич-комплексы”, в которых siРНК заключена между катионным “кором”, состоящим из DOTAP, и внешним липидным бислоем 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин-N-(полиэтиленгликоля) и фосфатидилхолина [46]. Такие комплексы оставались в токе крови более 20 ч после инъекции.

В заключение этого раздела хочется отметить чрезвычайно интересную работу. Алварец-Эрвити (L. Alvarez-Erviti) и соавт. [47] для доставки siРНК в мозг мыши использовали экзосомы, полученные из дендритных клеток костного мозга мышей. Размер этих частиц составлял около 80 нм и для их нацеливания использовали экзосомальный белок Lamp2b, слитый с нейрон-специфичным RVG-пептидом, следуя следующей схеме: дендритные клетки предварительно трансфицировали плазмидой, кодирующей вышеуказанный конъюгат; эндосомы, полученные из этих клеток, также несли конъюгат на своей поверхности, их загрузку проводили методом электропорации. Такие нацеленные экзосомы, введенные внутривенно, специфичным образом доставляли siРНК, направленную против гена *GAPDH*, в нейроны и микроглию мозга, что приводило к нокдауну целевого гена.

ПОЛИМЕРНЫЕ СИСТЕМЫ

При создании систем доставки siРНК могут быть использованы различные виды катионных полимеров, однако их спектр гораздо уже, чем для полимерных носителей, предназначенных для доставки ДНК [48]. Все эти полимеры можно подразделить на природные – хитозан, ателоколлаген, циклодекстрин, и синтетические – полиэтиленмин (ПЭИ), поли(L-лизин) и дендримеры.

При взаимодействии siРНК с катионными полимерами в растворе самопроизвольно формируются тороидные или стержневидные комплексы размером 100–300 нм, получившие название полиплексов.

ПРИРОДНЫЕ ПОЛИМЕРЫ

Олиго- и полисахариды

Ателоколлаген стал первым полимерным биоматериалом, который использовали в качестве носителя для доставки siРНК *in vivo* [49]. Этот полимер представляет собой производное коллагена типа I, получаемое из дермы телят посредством обработки пепсином. Ателоколлаген обладает очень низкой иммуногенностью и токсичностью, поскольку обработка пепсином приводит к удалению с N- и C-концов молекулы коллагена так называемых телопептидов, ответственных за иммуногенность молекулы [50, 51]; при этом способность к биодegradации и биосовместимость сохраняются. При низкой температуре полимер находится в жидком состоянии, что упрощает формирование комплексов с siРНК [52]. Размер полиплексов зависит от соотношения нуклеиновой кислоты и ателоколлагена. При высокой концентрации ателоколлагена комплекс может существовать в течение длительного времени, что считается важным преимуществом. С другой стороны, при низкой концентрации ателоколлагена размер комплексов составляет 100–300 нм, что считается приемлемым для системного введения. Для проверки того, может ли ателоколлаген быть использован для сайленсинга генов *in vivo*, Минакучи (Y. Minakuchi) и соавт. [53] использовали бестимусных мышей с опухолевыми клетками, продуцирующими люциферазу. Подкожные инъекции комплексов ателоколлагена с siРНК, направленной против люциферазы, вызывали ингибирование экспрессии люциферазы в опухолевых клетках ксенотрансплантатов у мышей. Для оценки эффективности системной доставки siРНК с помощью ателоколлагена Такешита (F. Takeshita) и соавт. [54] использовали мышиную модель опухоли простаты человека с метастазами в грудной клетке, челюстях и ногах. Авторы показали, что комплексы эффективно доставляются в опухоли через 24 ч после инъекции и могут оставаться интактными, по меньшей мере, трое суток. Важно отметить, что указанные комплексы не индуцировали иммунного ответа. Другая группа исследователей [55] показала, что радиоактивно-меченая siРНК в смеси с ателоколлагеном находилась в опухолях по меньшей мере 1 неделю и оставалась интактной. Кавата (E. Kawata) и др. [56] использовали полиплексы ателоколлагена с siРНК против гена *PLK-1* в метастатической модели рака легкого в печени мыши. Авторы показали значительное ингибирование роста опухоли в печени

без усиления врожденного иммунного ответа даже спустя 70 суток после начала десятидневного лечения, что свидетельствует о длительном ингибировании опухолевого роста.

Другие природные полимеры, используемые в качестве носителей siРНК, – это циклодекстрины (ЦД). Они представляют собой ряд природных циклических олигосахаридов, состоящих из 6, 7 или 8 мономеров D(+)-глюкозы, связанных α -1,4-гликозидными связями и называемых, соответственно, α -, β - или γ -ЦД [57]. Внутри частиц ЦД находится гидрофобная внутренняя полость глубиной около 7.0 Å с внутренним диаметром около 4.5, 7.0 и 8.5 Å для α -, β -, и γ -ЦД соответственно, которая может связывать различные неорганические/органические/биологические молекулы и ионы в водном растворе и твердом состоянии [57]. Благодаря уникальной способности ЦД формировать комплексы внутри полостей и другим благоприятным физико-химическим и биологическим характеристикам природные ЦД и их производные используют в качестве систем доставки с целью получения комплексов, обладающих повышенной растворимостью и стабильностью [58]. Ху-Лискован (S. Hu-Lieskovan) и др. [59] использовали систему доставки на основе β -циклодекстрина-содержащих поликатионов (ЦДП). Ранее показано, что ЦДП самособираются с siРНК, формируя коллоидные частицы размером около 50 нм в диаметре, при этом концевые имидазольные группы ЦДП способствуют внутриклеточному трафику частиц и высвобождению нуклеиновых кислот [60]. ЦДП защищают siРНК от деградации, поэтому отпадает необходимость химической модификации нуклеиновой кислоты. В вышеуказанной работе коллоидные частицы – с целью их использования в биологических жидкостях – стабилизировали посредством модификации поверхности полиэтиленгликолем (ПЭГ). Некоторые цепи ПЭГ содержали направляющий лиганд – трансферрин – для специфического взаимодействия с рецепторами клеточной поверхности. Системное введение липоплексов ЦДП с siРНК против продукта гена *EWS-FLI1* приводило к значительному снижению роста опухоли в мышиную модели саркомы Эвинга [59]. При долговременных инъекциях низких объемов препарата в хвостовую вену не наблюдалось никаких отклонений ни по содержанию IL-12 и IFN- α , ни по функциональному состоянию почек и печени, ни патологии основных органов. Комплексы siРНК с ЦДП обладают очень низкой иммуногенностью даже в тех случаях, когда используются siРНК с известными иммуностимуляторными мотивами [61].

Природный полисахарид хитозан успешно используют при интраназальном способе введения препаратов siРНК, поскольку он обладает мукоадгезивными свойствами и способностью проникать через слизистые оболочки [62]. Его дополни-

тельными преимуществами считают положительный заряд и биодegradуемость. Эффективное подавление экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP) *in vivo* наблюдали в бронхиолярных клетках эпителия GFP-трансгенных мышей после интраназального введения комплексов siРНК с хитозаном [63]. Показано, что частицы на основе хитозана обеспечивают высокоэффективную и безопасную доставку siРНК также и при внутривенном введении [64]. В данном исследовании комплексы siРНК, направленной против гена *RhoA*, и частиц полиизогекилцианоакрилата, покрытых хитозаном, вводили внутривенно бестимусным мышам с ксенотрансплантатами агрессивного рака молочной железы (MDA-MB-231). Такая обработка приводила к ингибированию роста опухоли на 90%, при этом токсических эффектов не наблюдали.

Пептиды и белки

Еще одна категория систем доставки основана на пептидах и белках, которые также способны доставлять siРНК *in vivo*. Например, Кумар (P. Kumar) и коллеги [65] для доставки siРНК в мозг использовали 29-членный пептид — производное фрагмента аминокислотной последовательности гликопротеина вируса бешенства, — про который известно, что он специфически взаимодействует с ацетилхолиновыми рецепторами на поверхности нервных клеток. В вышеуказанной работе этот пептид модифицировали, фланкировав его с С-конца пятью остатками Arg, и затем смешивали с siРНК в молярном соотношении 10 : 1. Внутривенная инъекция таких комплексов приводила к эффективному подавлению экспрессии GFP у трансгенных мышей и гена *SOD1* у мышей Balb/c дикого типа. Примечательно, что сайленсинг генов наблюдали только в мозге, но не в печени или селезенке, что свидетельствует о селективной доставке. Кроме того, повторное введение не вызывало ни индукции воспалительных цитокинов, ни продукции антипептидных антител.

Способность катионного полиамина протамина образовывать комплексы с нуклеиновыми кислотами также использовали при конструировании средств доставки siРНК. Сонг (E. Song) и др. [66] получили конъюгаты протамина, фрагмента антитела (Fab), специфичного к белку оболочки HIV-1 gp160, и siРНК, направленных против генов *c-myc*, *MDM2* или *VEGF*. При использовании такого носителя siРНК специфически доставлялись в опухолевые клетки меланомы мышей B16, экспрессирующие gp160.

Пир (D. Peer) и др. [67] сконструировали химерный белок антитело-протамин для специфичной доставки siРНК в активированные лейкоциты. Для этого авторы использовали фрагмент вариабельной цепи антитела, специфически

распознающего конформационные изменения рецептора LFA-1, происходящие при активации лейкоцита.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМЕРЫ

Полиэтиленимин и его производные

Из синтетических полимеров, используемых для доставки нуклеиновых кислот в клетки, наиболее изучен полиэтиленимин (ПЭИ) [68–70]. В исследованиях чаще всего используют высоко-разветвленный ПЭИ с молекулярным весом 25 кДа [71]. Комплексы нуклеиновых кислот с носителями на его основе способны эффективно трансфицировать клетки *in vitro* и *in vivo* [72]. В комплексах с ПЭИ нуклеиновая кислота защищена гораздо лучше, чем в комплексах с другими поликатионами, такими как поли-L-лизин. Предполагают, что это обусловлено высокой плотностью положительного заряда ПЭИ и его способностью к эффективному образованию комплексов с нуклеиновыми кислотами [73]. Однако с увеличением плотности положительного заряда полимера возрастает и его токсичность — это один из факторов, ограничивающих применение ПЭИ *in vivo*.

Эффективность средств доставки на основе ПЭИ и их цитотоксические эффекты в значительной степени зависят от характеристик используемого материала, таких как молекулярный вес, степень разветвленности, плотность положительного заряда, буферная емкость полимера; а также от содержания ДНК, размера частиц и дзета-потенциала [74, 75]. Так, в одной из работ [2] синтезирован ряд ПЭИ-полимеров с различными молекулярными массами и степенями разветвленности и проведена оценка эффективности их действия *in vitro* и *in vivo* как средств доставки нуклеиновых кислот. В другой работе [76] установлено, что модификация ПЭИ, в частности сукцинирование, приводит к снижению их токсичности в 10 раз по сравнению с немодифицированным полимером.

Группой Кима (D.H. Kim) [77] разработан нетоксичный водорастворимый полимер на основе разветвленного ПЭИ (1.8 кДа) и холестерилхлорформиата. Этот полимер образует с siРНК комплексы размером около 100 нм и препятствует ее деградации. Эффективность такого полимера в качестве средства доставки siРНК в раковые клетки продемонстрирована в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [78].

В качестве носителя siРНК также были использованы новые полиамидоэтиленимины (ПАЭИ), полученные путем сополимеризации цистамин бис-акриламида и триэтилететрамина [79]. Из-за наличия дисульфидных связей в структуре такой модифицированный носитель (SS-ПАЭИ)

приобретает способность к дестабилизации в присутствии восстанавливающих агентов. При физиологических условиях и весовом соотношении носитель/siРНК 3 : 1 или более авторы наблюдали формирование стабильных комплексов. В электрическом поле и в среде с восстановителем дитиотреитолом происходило полное высвобождение siРНК из комплекса. Это позволило предположить, что полученные комплексы также эффективно будут дестабилизироваться и в клетке, высвобождая siРНК в цитозоль. Затем провели сравнение эффективности носителей на основе линейного ПЭИ (25 кДа) и модифицированного SS-ПАЭИ для доставки siРНК против гена *VEGF* в клетки карциномы простаты человека, РС-3. При использовании SS-ПАЭИ в качестве носителя супрессия *VEGF* была выражена значительно сильнее, чем в случае линейного ПЭИ. Полученный результат свидетельствовал в поддержку гипотезы об эффективной дестабилизации SS-ПАЭИ-носителей в клетках.

Эффективность доставки siРНК восстанавливаемой полимерной системой подтверждена и другими исследователями [80]. Синтезировав различные производные ПЭИ, связанные дисульфидными связями (SS-ПЭИ), авторы оценили возможность их использования в качестве носителей siРНК. В этих экспериментах показано, что SS-ПЭИ способствуют высвобождению siРНК в цитоплазму клеток и облегчают ее доступность для RISC. Авторы высказали предположение, что разработка полимеров на основе ПЭИ, представляющих собой комбинацию разветвления высокой плотности и расщепляемых восстановлением связей, может стать перспективным направлением в усовершенствовании средств доставки siРНК.

Шиффелерс (R.M. Schiffelers) и соавт. [81] приготовили ПЭГилированные носители на основе ПЭИ с RGD (Arg-Gly-Asp) пептидами, связанными с дистальными концами ПЭГ. Размер полученных комплексов составлял 70–100 нм при молярном соотношении аминокрупп (ПЭИ) и фосфатов (нуклеиновая кислота), N : P = 2 : 1. Такие частицы оставались стабильными в течение 9 сут. Внутривенное введение бестимусным мышам с нейробластомой N2A комплексов siРНК, направленной против гена *VEGFR2*, с такими носителями приводило к ингибированию экспрессии белка, а также ангиогенеза и скорости роста опухоли. Ким (S.H. Kim) и соавт. [82] сравнили эффективность доставки siРНК с помощью мицелл полиэлектролита на основе ПЭИ с таковой для незащищенной siРНК. Показано, что взаимодействие между ПЭГилированной siРНК, направленной против гена *VEGF*, и полиэтиленмином приводит к спонтанному образованию сложных полиэлектролитных мицелл, в которых внутреннее ядро siРНК и ПЭИ окружено оболоч-

кой ПЭГ. Такие мицеллы вводили внутривенно самкам бестимусных мышей с ксенотрансплантами рака опухоли простаты. Установлено, что такие инъекции приводили к ингибированию экспрессии гена *VEGF* в опухолевой ткани на 86% по сравнению с незащищенной siРНК, которая не вызывала сайленсинга. Стоит заметить, что иммунного ответа на введенные препараты не наблюдали.

Полилизин

Носители на основе полилизина давно используют для доставки нуклеиновых кислот, в частности ДНК, в клетки [83]. Размер комплексов полилизина с плазмидами составляет примерно 20–30 нм [84, 85]. После открытия siРНК опыт, полученный при работе с плазмидами, использовали при конструировании средств доставки siРНК. Носители на основе немодифицированного полилизина оказались малоэффективными для доставки siРНК в клетки [86]. Модификации полилизиновых носителей позволили разработать более эффективные системы доставки siРНК. Одна из таких модификаций – гистицирование (более подробно рассмотрено в обзоре [87]). Лизин важен для связывания с РНК [83], а гистидин, как было показано ранее в экспериментах с ДНК, играет важную роль в забуферивании кислой среды эндосом, что приводит к их разрушению и высвобождению нуклеиновой кислоты [88]. Более того, оказалось, что соотношение His и Lys, а также их распределение может оказывать влияние на доставку нуклеиновой кислоты [89]. Недавно Стивенсон (M. Stevenson) и коллеги [90] продемонстрировали, что способные к восстановлению гистидин-лизиновые полимеры низкой молекулярной массы могут быть эффективными носителями siРНК *in vitro*.

Мейер (M. Meyer) и др. [91] получили конъюгат, основу которого составлял ПЭГилированный полилизин. Для предотвращения внеклеточной диссоциации к конъюгату через восстанавливаемые дисульфидные связи пришивали литический пептид меллитин, маскированный диметилмалеиновым ангидридом, и siРНК. В экспериментах на клетках этот конъюгат работал лучше, чем комплексы siРНК-полимер, образованные посредством ионных взаимодействий. Однако в исследованиях *in vivo* на мышах (инъекцию делали в хвостовую вену) наночастицы оказались токсичными для печени и легких.

Также разработаны средства доставки на основе пептидов, состоящих из остатков Lys и His [87]. Основное преимущество этих пептидов перед гистидин-лизиновыми полимерами состоит в том, что они более однородны. Разветвленные пептиды с высоким соотношением His/Lys оказались наиболее эффективными средствами доставки

siРНК *in vitro* и *in vivo* [92]. Системное введение комплексов siРНК, направленной против гена *Raf-1*, приводило к ингибированию роста MDA-MB435 опухолевых ксенотрансплантатов у мышей [93]. Комплексы проявляли низкую токсичность в нормальных тканях. Ян (Z. Yan) и соавт. [94] также провели успешную апробацию *in vivo* носителя на основе разветвленного гистидин-лизинового пептида как средства для доставки siРНК, направленной против гена *RHBDF1* (*human rhomboid family-1 gene*), в клетки опухолей MDA-MB-435 и 1483 в ксенотрансплантатах у бестимусных голых мышей.

СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Системы доставки на основе неорганических материалов стали применяться сравнительно недавно и пока не находят широкого применения. Тем не менее, нам представляется интересным отметить некоторые из них.

Магнитные частицы наноразмеров: супермагнитные частицы оксида железа и магнитные частицы тетраоксида железа — широко используются в магнитной резонансной томографии (МРТ) в качестве контрастирующих агентов [95]. Ядерные магнитные кристаллы могут быть включены в наночастицы siРНК, а МРТ может использоваться для мониторинга динамики распределения препарата и периода его полужизни [96]. Другое преимущество использования магнитных наночастиц для доставки ген-направленных агентов состоит в том, что лекарственный препарат может направляться к специфическим сайтам с помощью внешнего магнита.

Мезоморфные [97] и полостные [98] частицы диоксида кремния недавно также стали рассматривать в качестве потенциальных материалов для наносистем. Поры и полости этих материалов легко вмещают молекулы siРНК. Материалы из диоксида кремния, как правило, токсичны, но их токсичность может быть уменьшена путем модификации поверхности, например, ПЭИ [99].

Углеродные нанотрубки подразделяют на одностенные (*single-wall carbon nanotubes*, SWNTs) и мультистенные (MWNTs). Для облегчения взаимодействия с отрицательно заряженной siРНК и увеличения стабильности наночастиц углеродные нанотрубки химически модифицируют соединениями с положительно заряженными звеньями. Химически модифицированные SWNTs использовали в качестве носителей siРНК, нацеленной на обратную транскриптазу теломеразы, в модели опухоли у мышей [100]. Показано, что SWNT-носители, модифицированные 1,6-диаминогексаном, успешно доставляют siРНК против супрессора цитокиновой сигнализации 1

(SOCS1) *in vitro*, и *in vivo* [101]. Подеста (J.E. Podesta) и др. установили, что MWNTs, модифицированные аминокислотами (MWNT-NH⁺), с siTOX siРНК при внутриопухолевом введении мышам снижают скорость роста опухолей и увеличивают выживаемость животных [102].

Наночастицы из золота (*gold nanoparticles*, GNPs), или так называемые нанотрубки (*gold nanorods*, GNRs), — это биосовместимый материал. Поверхностные свойства этих частиц могут быть легко изменены таким образом, что их положительно заряженные поверхности позволяют им легко прикрепляться к отрицательно заряженным siРНК посредством электростатических взаимодействий. Недавно комплексы GNR-DARPP-32siRNA использовали для снижения экспрессии ключевых белков (DARPP-32, ERK и PP-1) допаминергического сигнального пути в мозге [103]. После введения GNRs/siРНК, направленной против DARPP, в допаминергических нейронах экспрессия DARPP-32 и других ключевых эффекторов, таких как ERK и PP-1, расположенных ниже в сигнальном каскаде, снижалась. В этом исследовании показано, что наночастицы GNRs/siРНК могут эффективно проникать через гематоэнцефалический барьер и существенно снижать экспрессию DARPP-32 в клетках допаминергических нейронов.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОСТАВКИ siРНК В КЛЕТКИ

Для оптимизации существующих и разработки новых технологий доставки siРНК в целевые клетки/ткани необходимы исследования механизмов взаимодействия siРНК и ее носителей с клетками, способов их интернализации, а также последующего высвобождения siРНК в цитозоль. Эти исследования позволят расширить понимание механизмов биораспределения siRNA и систем их доставки, а также в будущем разработать носители siРНК с высокой эффективностью доставки — для использования в медицине.

Традиционные стратегии для оценки эффективности доставки siРНК в клетки включают мониторинг siРНК, меченных флуоресцентными красителями, или котрансфекцию с репортерными плазмидами [104–106]; клетки в этих случаях отбирают, соответственно, по интенсивности флуоресцентного сигнала или по устойчивости к действию антибиотиков. Эти методы позволяют провести единовременную селекцию клеток, для которых эффективность сайленсинга оказалась высокой, но не учитывают клетки со средней эффективностью, которые также могут быть интересны для исследования. Более того, быстрое выцветание органических флуорофоров и ограниченный выбор доступных в настоящее время репортеров затрудняют отслеживание siРНК в

долговременных или комплексных исследованиях. Красители, традиционно используемые для мечения siРНК, обычно теряют половину интенсивности флуоресцентного сигнала в течение 5–10 с [107, 108]. При использовании флуоресцентных репортерных плазмид, продолжительно экспрессирующихся в клетках, для обнаружения функционального белка может потребоваться не менее двух часов после транскрипции [109]. Следует также отметить, что вследствие ограниченной доступности флуорофоров и репортерных белков, имеющих неперекрывающиеся спектры эмиссии, методы скрининга трансфекции, используемые в настоящее время, не приспособлены для одновременного мониторинга различных молекул siРНК.

Чен (А.А. Chen) и коллеги [110] разработали метод мониторинга доставки siРНК, где в качестве многоцветных биологических зондов использовали комплексы siРНК, содержащей флуоресцеин на 5'-конце смысловой цепи, с полупроводниковыми квантовыми элементами. С помощью таких флуоресцентных комплексов можно отслеживать доставку нуклеиновых кислот, сортировать клетки по уровню трансфекции и отбирать субпопуляции клеток со сходной эффективностью сайленсинга. По сравнению с комплексами, в которых задействованы репортерные плазмиды и siРНК с мечеными концами, комплексы флуоресцеин-меченой siРНК с полупроводниковыми квантовыми элементами обладают повышенной фотостабильностью и легко настраиваемыми оптическими свойствами, варьируемыми в широком спектре неперекрывающихся цветов.

Медарова (Z. Medarova) и др. [111] для доставки и наблюдения siРНК в опухолях (при системном введении) использовали зонд на основе наночастиц. Они получили магнитные частицы, покрытые аминированными декстранами и меченные флуоресцентным красителем Cy5.5. К этим частицам через два различных линкера присоединены siРНК и катионный пептид, способствующий интернализации комплексов клеткой. На двух различных моделях опухолей показана принципиальная возможность наблюдения и контроля за поглощением опухолью таких зондов *in vivo* с использованием МРТ и оптического анализа изображений.

В последнее время для определения эффективности доставки siРНК в клетки широко используют флуоресцентные реагенты, такие как siGLO® (например, siGLO Green and siGLO Red фирмы “Thermo Scientific Dharmacon”, США). Эти индикаторы трансфекции представляют собой флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые локализуются в ядре и позволяют провести визуальную оценку интернализации siРНК

клетками млекопитающих. Эти реагенты используют в экспериментах для определения оптимальных условий трансфекции siRNA, для отслеживания индивидуально трансфицированных клеток и для мониторинга относительной эффективности доставки при котрансфекции с siRNA.

Хочется также упомянуть о работе, которая сделана в нашей лаборатории [112]. Нами разработана модельная система контроля стабильности siРНК и ее проникновения в клетку, созданная на основе вектора p2FP-RNAi (“Евроген”, Россия). Этот вектор содержит открытые рамки считывания (ORF) для двух репортерных флуоресцентных белков, TurboGFP и JRed (красный флуоресцентный белок), которые находятся под контролем сильных конститутивных промоторов. Нуклеотидная последовательность, кодирующая JRed, слита с ORF, кодирующей N-конец белка Neo^r, определяющего устойчивость к неомицину. Экспрессию JRed-Neo^r регистрируют по флуоресценции в красной области видимого спектра света и устойчивости к неомицину, что позволяет проводить селекцию трансформантов с использованием антибиотика G-418. По соотношению сигналов красной/зеленой флуоресценции можно судить об эффективности действия исследуемой siРНК *in vivo*. Для оценки сохранности siРНК, а также степени ее деградации нами использована система флуорохром/гаситель флуоресценции – Cy5/ВНQ-3. В этой системе интенсивность флуоресцентного сигнала пропорциональна степени деградации siРНК, при этом сохраняется возможность нормирования сигнала “флуорохрома деградации”, встроенного в siРНК, к уровню сигналов от “флуорохромов наличия” (TurboGFP и JRed). Разработанная система успешно апробирована на линии клеток эмбриональной почки человека НЕК 293.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря усилиям многих групп исследователей в настоящее время достигнуты значительные успехи в разработке систем доставки siРНК. Как уже было отмечено в этом обзоре, в настоящее время создано много невирусных носителей и разработано множество подходов, которые позволяют осуществить высокоэффективную доставку siРНК к мишеням, повышенная экспрессия которых связана с какими-либо заболеваниями. Ряд терапевтических препаратов на основе siРНК сейчас проходит клинические испытания [113–115]. Согласно данным, приведенным на сайте службы американского Национального института здравоохранения за 2010 год, большая часть этих исследований направлена на лечение глазных болезней, одно – на лечение дисфункции почек, еще три – на лечение онкологических заболеваний [116].

Хотя высокоэффективные и селективные системы доставки siРНК для определенных типов клеток уже существуют, об их универсальности говорить пока не приходится. Наиболее перспективными с точки зрения универсальности, по нашему мнению, следует считать системы на основе природных полимеров, сочетающих в себе такие важные характеристики как биосовместимость и биodeградируемость, низкая иммуногенность и токсичность, а также возможность модификации поверхности носителя для повышения специфичности “нацеливания”. Ряд перспективных носителей, отличающихся высокой эффективностью доставки siРНК в клетки, проходит доклинические испытания. Исследования, направленные на усовершенствование существующих носителей и разработку новых, также развиваются довольно быстрыми темпами, поэтому можно ожидать, что в ближайшее десятилетие универсальная высокоэффективная система доставки siРНК в клетки будет создана и станет основой для долгожданного внедрения технологии РНК-интерференции в клинику.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aigner A.J. 2006. Delivery systems for the direct application of siRNAs to induce RNA interference (RNAi) *in vivo*. *Biomed. Biotechnol.* **4**, 71659.
- 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.
- Bumcrot D., Manoharan M., Koteliensky V., Sah D.W. 2006. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 711–719.
- 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.
- Soriano P., Dijkstra J., Legrand A., Spanjer H., Lodos-Gagliardi D., Roerdink F., Scherphof G., Nicolau C. 1983. Targeted and nontargeted liposomes for *in vivo* transfer to rat liver cells of a plasmid containing the preproinsulin I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 7128–7131.
- Felgner P.L., Ringold G.M. 1989. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature.* **337**, 387–388.
- Ozpolat B., Sood A.K., Lopez-Berestein G. 2010. Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *J. Intern. Med.* **267**, 44–53.
- Arnold A.S., Tang Y.L., Qian K., Shen L., Valencia V., Phillips M.I., Zhang Y.C. 2007. Specific beta1-adrenergic receptor silencing with small interfering RNA lowers high blood pressure and improves cardiac function in myocardial ischemia. *J. Hypertens.* **25**, 197–205.
- Sorensen D.R., Leirdal M., Sioud M. 2003. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J. Mol. Biol.* **327**, 761–766.
- Peng P.H., Huang H.S., Lee Y.J., Chen Y.S., Ma M.C. 2009. Novel role for the delta-opioid receptor in hypoxic preconditioning in rat retinas. *J. Neurochem.* **108**, 741–754.
- Murata M., Takanami T., Shimizu S., Kubota Y., Horiuchi S., Habano W., Ma J.X., Sato S. 2006. Inhibition of ocular angiogenesis by diced small interfering RNAs (siRNAs) specific to vascular endothelial growth factor (VEGF). *Curr. Eye Res.* **31**, 171–180.
- Baker-Herman T.L., Fuller D.D., Bavis R.W., Zabka A.G., Golder F.J., Doperalski N.J., Johnson R.A., Watters J.J., Mitchell G.S. 2004. BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Nat. Neurosci.* **7**, 48–55.
- Nakamura H., Siddiqui S.S., Shen X., Malik A.B., Pulido J.S., Kumar N.M., Yue B.Y. 2004. RNA interference targeting transforming growth factor-beta type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis. *Mol. Vis.* **10**, 703–711.
- Verma U.N., Surabhi R.M., Schmaltieg A., Becerra C., Gaynor R.B. 2003. Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1291–1300.
- Chien P.Y., Wang J., Carbonaro D., Lei S., Miller B., Sheikh S., Ali S.M., Ahmad M.U., Ahmad I. 2005. Novel cationic cardiolipin analogue-based liposome for efficient DNA and small interfering RNA delivery *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Ther.* **12**, 321–328.
- Khoury M., Louis-Pence P., Escriou V., Noel D., Largeau C., Cantos C., Scherman D., Jorgensen C., Apparailly F. 2006. Efficient new cationic liposome formulation for systemic delivery of small interfering RNA silencing tumor necrosis factor alpha in experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* **54**, 1867–1877.
- Miyawaki-Shimizu K., Predescu D., Shimizu J., Broman M., Predescu S., Malik A.B. 2006. siRNA-induced caveolin-1 knockdown in mice increases lung vascular permeability via the junctional pathway. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **290**, L405–413.
- Chono S., Li S.D., Conwell C.C., Huang L. 2008. An efficient and low immunostimulatory nanoparticle formulation for systemic siRNA delivery to the tumor. *J. Control. Release.* **131**, 64–69.
- Wu S.Y., McMillan N.A. 2009. Lipidic systems for *in vivo* siRNA delivery. *AAPS J.* **11**, 639–652.
- Judge A.D., Robbins M., Tavakoli I., Levi J., Hu L., Fronda A., Ambegia E., McClintock K., MacLachlan I. 2009. Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 661–673.
- Carmona S., Jorgensen M.R., Kolli S., Crowther C., Salazar F.H., Marion P.L., Fujino M., Natori Y., Thanou M., Arbutnot P., Miller A.D. 2009. Controlling HBV replication *in vivo* by intravenous administration of triggered PEGylated siRNA-nanoparticles. *Mol. Pharm.* **6**, 706–717.
- Akinc A., Zumbuehl A., Goldberg M., Leshchiner E.S., Busini V., Hossain N., Bacallado S.A., Nguyen D.N.,

- Fuller J., Alvarez R., Borodovsky A., Borland T., Consten R., de Fougerolles A., Dorkin J.R., Narayanannair J.K., Jayaraman M., John M., Koteliansky V., Manoharan M., Nechev L., Qin J., Racie T., Raitcheva D., Rajeev K.G., Sah D.W., Soutschek J., Toudjarska I., Vornlocher H.P., Zimmermann T.S., Langer R., Anderson D.G. 2008. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat. Biotechnol.* **26**, 561–569.
23. Pirolo 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.
 24. Gilmore I.R., Fox S.P., Hollins A.J., Sohail M., Akhtar S. 2004. The design and exogenous delivery of siRNA for post-transcriptional gene silencing. *J. Drug Target.* **12**, 315–340.
 25. Gilmore I.R., Fox S.P., Hollins A.J., Akhtar S. 2006. Delivery strategies for siRNA-mediated gene silencing. *Cur. Drug Deliv.* **3**, 147–155.
 26. Omid 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.* **11**, 311–323.
 27. 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.
 28. Ikeda Y., Taira K. 2006. Ligand-targeted delivery of therapeutic siRNA. *Pharm. Res.* **23**, 1631–1640.
 29. Leng Q., Woodle M.C., Lu P.Y., Mixson A.J. 2009. Advances in systemic siRNA delivery. *Drugs Future.* **34**, 721.
 30. Landen C.N.Jr., Chavez-Reyes A., Bucana C., Schmandt R., Deavers M.T., Lopez-Berestein G., Sood A.K. 2005. Therapeutic EphA2 gene targeting *in vivo* using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res.* **65**, 6910–6918.
 31. Halder J., Kamat A.A., Landen C.N.Jr., Han L.Y., Lutgendorf S.K., Lin Y.G., Merritt W.M., Jennings N.B., Chavez-Reyes A., Coleman R.L., Gershenson D.M., Schmandt R., Cole S.W., Lopez-Berestein G., Sood A.K. 2006. Focal adhesion kinase targeting using *in vivo* short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4916–4924.
 32. Gray M.J., van Buren G., Dallas N.A., Xia L., Wang X., Yang A.D., Somcio R.J., Lin Y.G., Lim S., Fan F., Mangala L.S., Arumugam T., Logsdon C.D., Lopez-Berestein G., Sood A.K., Ellis L.M. 2008. Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 109–120.
 33. Merritt W.M., Lin Y.G., Spannuth W.A., Fletcher M.S., Kamat A.A., Han L.Y., Landen C.N., Jennings N., de Geest K., Langley R.R., Villares G., Sanguino A., Lutgendorf S.K., Lopez-Berestein G., Bar-Eli M.M., Sood A.K. 2008. Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth. *J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 359–372.
 34. Ozpolat B., Akar U., Tekedereli I., Lopez-Berestein G. 2008. Targeted silencing of Bcl-2 by liposomal siRNA-nanovectors leads to autophagic and apoptotic cell death in *in vivo* breast cancer models. *Proc. AACR.* 4928.
 35. Gewirtz A.M. 2007. On future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow. *J. Clin. Invest.* **117**, 3612–3614.
 36. 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. 2006. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* **441**, 111–114
 37. Gabizon A.A., Shmeeda H., Zalipsky S. 2006. Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. *J. Liposome Res.* **16**, 175–183.
 38. Sharpe M., Easthope S.E., Keating G.M., Lamb H.M. 2002. Polyethylene glycol-liposomal doxorubicin: a review of its use in the management of solid and haematological malignancies and AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Drugs.* **62**, 2089–2126.
 39. Ishida T., Wang X., Shimizu T., Nawata K., Kiwada H. 2007. PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner. *J. Control. Release.* **122**, 349–355.
 40. Semple S.C., Harasym T.O., Clow K.A., Ansell S.M., Klimuk S.K., Hope M.J. 2005. Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 1020–1026.
 41. 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.
 42. Morrissey D.V., Lockridge J.A., Shaw L., Blanchard K., Jensen K., Breen W., Hartsough K., Machemer L., Radka S., Jadhav V., Vaish N., Zinnen S., Vargeese C., Bowman K., Shašer C.S., Ješs L.B., Judge A., MacLachlan I., Polisky B. 2005. Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1002–1007.
 43. Jeffs L.B., Palmer L.R., Ambegia E.G., Giesbrecht C., Ewanick S., MacLachlan I. 2005. A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA. *Pharm. Res.* **22**, 362–372.
 44. 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.
 45. 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.

46. Yagi N., Manabe I., Tottori T., Ishihara A., Ogata F., Kim J.H., Nishimura S., Fujiu K., Oishi Y., Itaka K., Kato Y., Yamauchi M., Nagai R. 2009. A nanoparticle system specifically designed to deliver short interfering RNA inhibits tumor growth *in vivo*. *Cancer Res.* **69**, 6531–6538.
47. Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H., Betts C., Likhalsky S., Wood M.J. 2011. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* **29**, 341–345.
48. Midoux P., Pichon C., Yaouanc J.J., Jaffrès P.A. 2009. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 166–178.
49. Ashihara E., Kawata E., Maekawa T. 2010. Future prospect of RNA interference for cancer therapies. *Curr. Drug Targets.* **11**, 345–360.
50. Ochiya T., Nagahara S., Sano A., Itoh H., Terada M. 2001. Biomaterials for gene delivery: atelocollagen-mediated controlled release of molecular medicines. *Curr. Gene Ther.* **1**, 31–52.
51. Sano A., Maeda M., Nagahara S., Ochiya T., Honma K., Itoh H., Miyata T., Fujioka K. 2003. Atelocollagen for protein and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 1651–1677.
52. Takeshita F., Ochiya T. 2006. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci.* **97**, 689–696.
53. Minakuchi Y., Takeshita F., Kosaka N., Sasaki H., Yamamoto Y., Kouno M., Honma K., Nagahara S., Hanai K., Sano A., Kato T., Terada M., Ochiya T. 2004. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* **32**, e109.
54. Takeshita F., Minakuchi Y., Nagahara S., Honma K., Sasaki H., Hirai K., Teratani T., Namatame N., Yamamoto Y., Hanai K., Kato T., Sano A., Ochiya T. 2005. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 12177–12182.
55. Takei Y., Kadomatsu K., Yuzawa Y., Matsuo S., Muramatsu T. 2004. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res.* **64**, 3365–3370.
56. Kawata E., Ashihara E., Kimura S., Takenaka K., Sato K., Tanaka R., Yokota A., Kamitsuji Y., Takeuchi M., Kuroda J., Tanaka F., Yoshikawa T., Maekawa T. 2008. Administration of PLK-1 small interfering RNA with atelocollagen prevents the growth of liver metastases of lung cancer. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2904–2912.
57. Chen Y., Liu Y. 2010. Cyclodextrin-based bioactive supramolecular assemblies. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 495–505.
58. Uekama K., Hirayama F., Irie T. 1998. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem. Rev.* **98**, 2045–2076.
59. 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.
60. Davis M.E., Pun S.H., Bellocq N.C., Reineke T.M., Popielarski S.R., Mishra S., Heidel J.D. 2004. Self-assembling nucleic acid delivery vehicles via linear, water-soluble, cyclodextrin-containing polymers. *Curr. Med. Chem.* **11**, 179–197.
61. Heidel J.D., Yu Z., Liu J.Y., Rele S.M., Liang Y., Zeidan R.K., Kornbrust D.J., Davis M.E. 2007. Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 5715–5721.
62. Illum L. 2003. Nasal drug delivery—possibilities, problems and solutions. *J. Control. Release.* **87**, 187–198.
63. 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.
64. Pille J.Y., Li H., Blot E., Bertrand J.R., Pritchard L.L., Opolon P., Maksimenko A., Lu H., Vannier J.P., Soria J., Malvy C., Soria C. 2006. Intravenous delivery of anti-RhoA small interfering RNA loaded in nanoparticles of chitosan in mice: safety and efficacy in xenografted aggressive breast cancer. *Hum. Gene Ther.* **17**, 1019–1026.
65. Kumar P., Wu H., McBride J.L., Junq K.E., Kim M.H., Davidson B.L., Lee S.K., Shankar P., Manjunath N. 2007. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature.* **448**, 39–43.
66. 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.
67. 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.
68. Urban-Klein B., Werth S., Abuharbid S., Czubayko F., Aigner A. 2005. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA *in vivo*. *Gene Ther.* **12**, 461–466.
69. Thomas M., Lu J.J., Ge Q., Zhang C., Chen J., Klibanov A.M. 2005. Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 5679–5684.
70. Read M.L., Singh S., Ahmed Z., Stevenson M., Briggs S.S., Oupicky D., Barrett L.B., Spice R., Kendall M., Berry M., Preece J.A., Logan A., Seymour L.W. 2005. A versatile reducible polycation-based system for efficient delivery of a broad range of nucleic acids. *Nucl. Acids Res.* **33**, e86.
71. Fischer D., Bieber T., Li Y., Elsasser H.P., Kissel T. 1999. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm. Res.* **16**, 1273–1279.

72. Marschall P., Malik N., Larin Z. 1999. Transfer of YACs up to 2.3 Mb intact into human cells with polyethylenimine. *Gene Ther.* **6**, 1634–1637.
73. Godbey W.T., Barry M.A., Saggau P., Wu K.K., Mikos A.G. 2000. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* **51**, 321–328.
74. Harpe A.V., Petersen H., Li Y., Kissel T. 2000. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *J. Control. Release.* **69**, 309–322.
75. Kunath K., Harpe A.V., Fischer D., Petersen H., Bickel U., Voigt K., Kissel T. 2003. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and *in vivo* distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J. Control. Release.* **89**, 113–125.
76. Zintchenko A., Philipp A., Dehshahri A., Wagner E. 2008. Simple modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity. *Bioconjug. Chem.* **19**, 1448–1455.
77. Han S., Mahato R.I., Kim S.W. 2001. Water-soluble lipopolymer for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **12**, 337–345.
78. Kim D.H., Rossi J.J. 2007. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 173–184.
79. Jeong J.H., Christensen L.V., Yockman J.W., Zhong Z., Engbersen J.F., Kim W.J., Feijen J., Kim S.W. 2007. Reducible poly(amido ethylenimine) directed to enhance RNA interference. *Biomaterials.* **28**, 1912–1917.
80. Breunig M., Hozsa C., Lungwitz C.U., Watanabe K., Umeda I., Kato H., Goepferich A. 2008. Mechanistic investigation of poly(ethylene imine)-based siRNA delivery: disulfide bonds boost intracellular release of the cargo. *J. Control. Release.* **130**, 57–63.
81. Schifffers 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.
82. Kim S.H., Jeong J.H., Lee S.H., Kim S.W., Park T.G. 2008. Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. *J. Control. Release.* **129**, 107–16.
83. Leng Q., Woodle M.C., Lu P.Y., Mixson A.J. 2009. Advances in Systemic siRNA Delivery. *Drugs Future.* **34**, 721.
84. Perales J.C., Ferkol T., Beegen H., Ratnoff O.D., Hanson R.W. 1994. Gene transfer *in vivo*: sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 4086–4090.
85. Ferkol T., Perales J.C., Mularo F., Hanson R.W. 1996. Receptor-mediated gene transfer into macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 101–105.
86. Stevenson M., Ramos-Perez V., Singh S., Soliman M., Preece J.A., Briggs S.S., Read M.L., Seymour L.W. 2008. Delivery of siRNA mediated by histidine-containing reducible polycations. *J. Control. Release.* **130**, 46–56.
87. Midoux P., Pichon C., Yaouanc J.J., Jaffrès P.A. 2009. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 166–78.
88. Midoux P., Monsigny M. 1999. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug. Chem.* **10**, 406–411.
89. Chen Q.R., Zhang L., Stass S.A., Mixson A.J. 2001. Branched co-polymers of histidine and lysine are efficient carriers of plasmids. *Nucl. Acids Res.* **29**, 1334–1340.
90. Stevenson M., Ramos-Perez V., Singh S., Soliman M., Preece J.A., Briggs S.S., Read M.L., Seymour L.W. 2008. Delivery of siRNA mediated by histidine-containing reducible polycations. *J. Control. Release.* **130**, 46–56.
91. Meyer M., Dohmen C., Philipp A., Kiener D., Maiwald G., Scheu C., Ogris M., Wagner E. 2009. Synthesis and biological evaluation of a bioresponsive and endosomolytic siRNA-polymer conjugate. *Mol. Pharm.* **6**, 752–762.
92. Leng Q., Scaria P., Zhu J., Ambulos N., Campbell P., Mixson A.J. 2005. Highly branched HK peptides are effective carriers of siRNA. *J. Gene Med.* **7**, 977–986.
93. Leng Q., Scaria P., Lu P., Woodle M.C., Mixson A.J. 2008. Systemic delivery of HK Raf-1 siRNA polyplexes inhibits MDA-MB-435 xenografts. *Cancer Gene Ther.* **15**, 485–495.
94. Yan Z., Zou H., Tian F., Grandis J.R., Mixson A.J., Lu P.Y., Li L.Y. 2008. Human rhomboid family-1 gene silencing causes apoptosis or autophagy to epithelial cancer cells and inhibits xenograft tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 1355–1364.
95. Sun C., Lee J.S., Zhang M. 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1252–1265.
96. Lee J.H., Lee K., Moon S.H., Lee Y., Park T.G., Cheon J. 2009. All-in-one target-cell-specific magnetic nanoparticles for simultaneous molecular imaging and siRNA delivery. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 4174–4179.
97. Radu D.R., Lai C.Y., Jeftinija K., Rowe E.W., Jeftinija S., Lin V.S. 2004. A polyamidoamine dendrimer-capped mesoporous silica nanosphere-based gene transfection reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13216–13217.
98. Yang J., Lee J., Kang J., Lee K., Suh J.S., Yoon H.G., Huh Y.M., Haam S. 2008. Hollow silica nanocontainers as drug delivery vehicles. *Langmuir.* **24**, 3417–3421.
99. Xia T., Kovochich M., Liong M., Meng H., Kabehie S., George S., Zink J.I., Nel A.E. 2009. Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs. *ACS Nano.* **3**, 3273–3286.
100. Zhang Z., Yang X., Zhang Y., Zeng B., Wang S., Zhu T., Roden R.B., Chen Y., Yang R. 2006. Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled carbon nanotubes suppresses tumor growth. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4933–4939.
101. Yang R., Yang X., Zhang Z., Zhang Y., Wang S., Cai Z., Jia Y., Ma Y., Zheng C., Lu Y., Roden R., Chen Y.

2007. Retraction. Single-walled carbon nanotubes-mediated in vivo and in vitro delivery of siRNA into antigen-presenting cells. *Gene Ther.* **14**, 920.
102. Podesta J.E., Al-Jamal K.T., Herrero M.A., Tian B., Ali-Boucetta H., Hegde V., Bianco A., Prato M., Kostarelos K. 2009. Antitumor activity and prolonged survival by carbon-nanotube-mediated therapeutic siRNA silencing in a human lung xenograft model. *Small.* **5**, 1176–1185.
103. Bonoiu A.C., Mahajan S.D., Ding H., Roy I., Yong K.T., Kumar R., Hu R., Bergey E.J., Schwartz S.A., Prasad P.N. 2009. Nanotechnology approach for drug addiction therapy: gene silencing using delivery of gold nanorod-siRNA nanoplex in dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 5546–5550.
104. Manoharan M. 2004. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 570–579.
105. Chiu Y.L., Ali A., Chu C.Y., Cao H., Rana T.M. 2004. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chem. Biol.* **11**, 1165–1175.
106. Kumar R., Conklin D.S., Mittal V. 2003. High-throughput selection of effective RNAi probes for gene silencing. *Genome Res.* **13**, 2333–2340.
107. Wu X., Liu H., Liu J., Haley K.N., Treadway J.A., Larson J.P., Ge N., Peale F., Bruchez M.P. 2003. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **21**, 41–46.
108. Dahan M., Levi S., Luccardini C., Rostaing P., Riveau B., Triller A. 2003. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science.* **302**, 442–445.
109. Tsien R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509–544.
110. Chen A.A., Derfus A.M., Khetani S.R., Bhatia S.N. 2005. Quantum dots to monitor RNAi delivery and improve gene silencing. *Nucl. Acids Res.* **33**, e190.
111. Medarova Z., Pham W., Farrar C., Petkova V., Moore A. 2007. *In vivo* imaging of siRNA delivery and silencing in tumors. *Nat. Med.* **13**, 372–377.
112. Марахонов А.В., Сержанова В.А., Скоблов М.Ю., Баранова А.В. 2010. Разработка системы тестирования средств доставки siRNA. *Мед. генетика.* **9**, 12–15.
113. Марахонов А.В., Баранова А.В., Скоблов М.Ю. 2008. РНК-интерференция: фундаментальные и прикладные аспекты. *Мед. генетика.* **7**, 44–56.
114. Скоблов М.Ю. 2009. Перспективы технологий антисмысловой терапии. *Молекуляр. биология,* **43**, 984–998.
115. 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.
116. Medicine, U. S. N. L. O. A service of the U.S. National Institute of Health: ClinicalTrials.gov. (http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=siRNA&show_flds=Y [Accessed January 10, 2010]).