

УДК 577.21

Невирусные методы доставки и терапевтическое применение малых интерферирующих РНК

Н. А. Никитенко*, В. С. Прасолов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

*E-mail: nanthalia@gmail.com

Поступила в редакцию 18.02.2013

РЕФЕРАТ Интерференция РНК является удобным инструментом регуляции экспрессии генов. Результаты детального изучения молекулярных механизмов РНК-интерференции открывают перспективы использования этого подхода в терапии различных заболеваний человека. Эффективная доставка малых интерферирующих РНК (siРНК) к клеткам-мишеням представляет собой серьезную проблему, поэтому необходима разработка новых систем доставки siРНК к своим потенциальным мишеням, а также способов защиты этих нестабильных молекул от деградации в условиях *in vivo*. В данном обзоре рассмотрены различные виды химических модификаций siРНК, а также невирусные векторы для их доставки на основе природных и синтетических полимеров, липидов, пептидов и неорганических соединений. Описаны преимущества, недостатки и перспективы применения этих методов в клинической практике.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА интерференция РНК, малые интерферирующие РНК, невирусные системы доставки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РНК-и – интерференция РНК; дцРНК – двухцепочечная РНК; siРНК – малая интерферирующая РНК; shРНК – малая шпилечная РНК; miРНК – микроРНК; RISC – РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RNA-induced silencing complex); НЧ – наночастица.

ВВЕДЕНИЕ

Интерференция РНК (РНК-и) – эволюционно консервативный механизм регуляции экспрессии генов. Использование интерферирующих РНК открывает возможности для развития новых методов профилактики и лечения различных заболеваний человека [1]. Последние достижения биологии и медицины расширили спектр предполагаемых терапевтических мишеней. В настоящее время проходят клинические испытания препаратов, основанных на принципе РНК-и и предназначенных для применения при инфекционных, генетических и онкологических заболеваниях. Такие лекарственные средства, как терапевтические рибозимы, аптамеры и малые интерферирующие РНК (siРНК), широко применяются в различных областях научных исследований, а также в терапии и диагностике заболеваний человека. Следует отметить, что интерферирующие РНК потенциально иммуногенны, обладают невысокой стабильностью и нуждаются в эффективных и безопасных средствах доставки в клетки-мишени. Тем не менее обнадеживающие результаты клинических испытаний показывают, что эти барьеры можно преодолеть путем усовершенствования синтетических носителей и химических модификаций РНК [2]. В данном обзоре рассмотрены различные способы невирусной доставки интерферирующих РНК, а также

их преимущества, недостатки и перспективы применения в клинической практике. Разумеется, в достаточно коротком обзоре невозможно остановиться на детальном описании каждого из этих методов. Нашей целью было указать на многообразие уже апробированных и разрабатываемых способов доставки siРНК, что позволит заинтересованному читателю быстро сориентироваться в данной проблеме. Надеемся, что наша работа будет интересна широкому кругу читателей журнала *Acta Naturae*.

МЕХАНИЗМ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Сигналом к началу РНК-интерференции служит появление в клетке экзогенной (вирусной или синтетической, введенной в ходе эксперимента) либо эндогенной (продукт транскрипции собственных генов) двухцепочечной РНК (дцРНК). Минимальный размер дцРНК, достаточный для индукции интерференции, – 21 п.н. Скорее всего, такое ограничение защищает от деградации собственную клеточную мРНК с короткими внутримолекулярными самокомплементарными структурами [3, 4].

После проникновения дцРНК в клетку фермент Dicer, относящийся к семейству РНКаз III (*рис. 1*), распознает и нарезает ее [5, 6]. Этот эволюционно консервативный белок обнаружен у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, низшего гриба *Neurospora cras-*

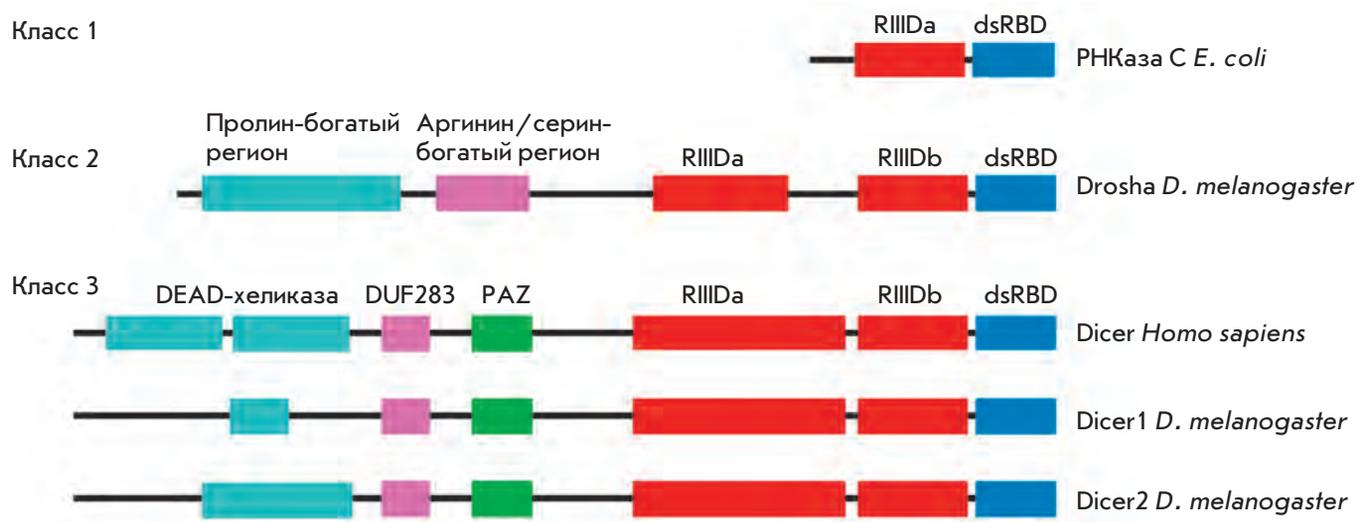


Рис. 1. Доменная структура РНКаз III [11]

sa, низших и высших растений и животных, включая млекопитающих, в том числе и человека [3, 4].

Молекула Dicer (*pus. 1*) содержит дцРНК-связывающий (double-stranded RNA-binding domain, dsRBD) домен, расположенный на С-конце, центральный домен PAZ, который связывается с дцРНК, имеющей два неспаренных нуклеотида на 3'-конце, и N-концевые домены – хеликазный домен DEAD-box и DUF283 (Domain of Unknown Function 283), которые не входят в число необходимых для работы Dicer *in vitro* [7, 8].

Dicer содержит также два РНКазных домена (RNase III domain – RIIID), формирующих внутримолекулярный псевдодимер, в котором оба каталитических сайта расположены близко друг к другу. Каждый домен разрезает одну из цепей дцРНК с образованием дуплексов с двумя неспаренными нуклеотидами на 3'-концах (*pus. 2*) [9–11].

У млекопитающих и *Caenorhabditis elegans* молекулы Dicer одного типа предназначены для процессинга и miРНК, и siРНК; у дрозофилы имеются два типа молекул Dicer: Dicer1 – для miРНК, Dicer2 – для siРНК. В результате работы Dicer образуются дцРНК длиной 21–25 н. (видоспецифический признак) с двумя неспаренными нуклеотидами на 3'-конце, несущие гидроксильные группы на 3'-концах и фосфатные группы на 5'-концах [12].

Следующий этап процесса интерференции – формирование RLC-комплекса (RISC-loading complex) [13]. Этот комплекс состоит из белков Dicer, TRBP (TAR RNA binding protein) и/или ПАСТ и фрагмента дцРНК у человека (у *Drosophila melanogaster* – Dicer1/LOQS и Dicer2/R2D2 для miРНК и siРНК

соответственно). Полагают, что термодинамически более стабильный конец дцРНК (имеющий большую температуру плавления) связывается с TRBP, а другой взаимодействует с Dicer [14]. По-видимому, такое расположение дцРНК в комплексе RLC определяет, какая из двух цепей РНК будет направляющей (комплементарной целевой мРНК), а какая пассажирской (подлежащей разрушению) [15]. RLC переносит дцРНК на белок семейства Argonaute – Ago2 (*pus. 3*) – основной белок комплекса pre-RISC (RISC – RNA-induced silencing complex). Ago2 состоит из трех основных доменов (*pus. 3*): PAZ, служащего сайтом связывания 3'-конца направляющей цепи siРНК; MID – сайта связывания 5'-конца направляющей цепи siРНК, и PIWI, структурно сходного с РНКазой H [16].

Домен PIWI обладает эндонуклеазной активностью [17]. В составе белка Ago он расщепляет фосфодиэфирную связь, расположенную между нуклеотидами пассажирской цепи, комплементарными 10 и 11 основаниям направляющей цепи [10]. После разрушения пассажирской цепи комплекс pre-RISC становится функционально активным комплексом RISC (RISC содержит только антисмысловую направляющую цепь РНК, комплементарную участку мРНК-мишени). Затем происходит расщепление целевой молекулы мРНК (*pus. 4*) на фрагменты длиной 21–23 н. [13]. Описанный выше механизм характерен для siРНК (*pus. 4*). Процессинг miРНК включает несколько дополнительных этапов (*pus. 4A*).

Сначала на гене miРНК с помощью РНК-полимеразы II (или, реже, РНК-полимеразы III) синтезируется протяженный первичный транскрипт –

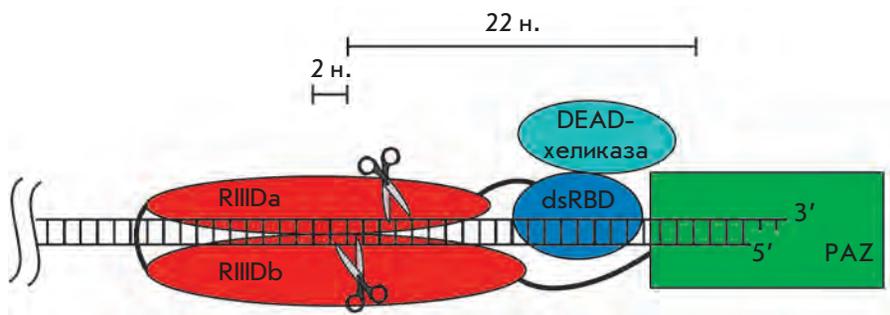


Рис. 2. Модель работы фермента Dicer [11]. Домен PAZ связывается с двумя неспаренными нуклеотидами на 3'-конце дцРНК. Домены RIIIDa и RIIIDb образуют внутримолекулярный псевдодимер. Домен RIIIDa разрезает 3'-концевую цепь дцРНК, а RIIIDb – 5'

pri-miРНК, имеющий шпильчатую структуру типа «петля-стебель» [18, 19]. Гены miРНК, как правило, представляют собой кластеры, которые транскрибируются как единые полицистронные единицы [20]. В то же время гены некоторых miРНК представляют собой самостоятельные транскрипционные единицы [21]. Процессинг pri-miРНК осуществляется в ядре с помощью комплекса, который состоит из двух белков (РНКаза типа III) – Drosha и Pasha (у *D. melanogaster* и *C. elegans*, у млекопитающих аналогом является белок DGCR8) – несущего два дцРНК-связывающих домена (dsRBD – double-stranded RNA-binding domain). Pasha взаимодействует с pri-miРНК, что позволяет ферменту Drosha разрезать стебель шпильки на расстоянии 11 п.н. от его основания. Это приводит к образованию pre-miРНК длиной 60–70 н., которые имеют шпильчатую структуру, а также два выступающих нуклеотида на 3'-конце и 5'-фосфатную группу. У двукрылых, червей и млекопитающих некоторые pre-miРНК образуются без участия фермента Drosha (DGCR8).

Дальнейшее развитие событий зависит от степени гомологии между miРНК и мРНК-мишенью. Для большинства изученных miРНК животных не характерно полное соответствие последовательности нуклеотидов мРНК-мишени [3, 4]. Тем не менее некоторые miРНК двукрылых и млекопитающих полностью комплементарны своим мРНК-мишеням, что обуславливает непосредственное расщепление мРНК эндонуклеазами [22]. Большинство miРНК комплементарны своим мишеням только по небольшому участку 5'-концевой области miРНК, называемой «seed». Область «seed» является одним из факторов, определяющих специфичность выбора мишени. Небольшой размер «seed» позволяет предположить, что одна miРНК может регулировать экспрессию сотни различных генов [23, 24].

ПРОБЛЕМЫ ПРИМЕНЕНИЯ И ДОСТАВКИ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

Использование siРНК в терапевтической практике имеет существенные ограничения: чувствительность к нуклеазам сыворотки крови [25], возможность неспецифического связывания, действия siРНК по механизму miРНК, что приводит к подавлению экспрессии отличных от мишени генов, мРНК которых частично комплементарна области «seed» [26], и активации врожденного иммунного ответа [27].

Для достижения терапевтического эффекта при системной доставке молекулы малых интерферирующих РНК должны находиться в активной форме во время циркуляции в кровотоке, а также избегать фильтрации почками, поглощения фагоцитами, образования агрегатов с белками сыворотки крови и деградации нуклеазами. Кроме того, для проникновения в ткани siРНК должны пройти через эндотелиальный барьер. Этот барьер задерживает молекулы размером более 5 нм. Однако сосуды печени и селезенки пропускают молекулы размером до 200 нм в диаметре, а сосуды опухолей – вещества с молекулярной массой более 40 кДа. Это явление известно как усиленный эффект проникновения и удержания (enhanced permeation and retention effect – EPR) [28].

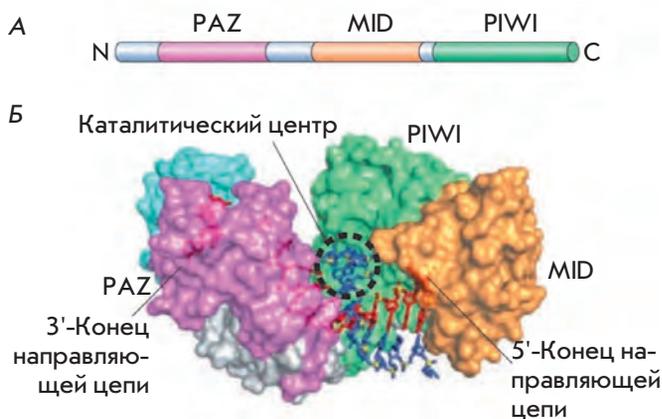


Рис. 3. Структура белков семейства Argonaute. А – Белки семейства Argonaute содержат три домена: PAZ, MID и PIWI. Б – Расположение направляющей цепи siРНК в белке Argonaute [10, 13]

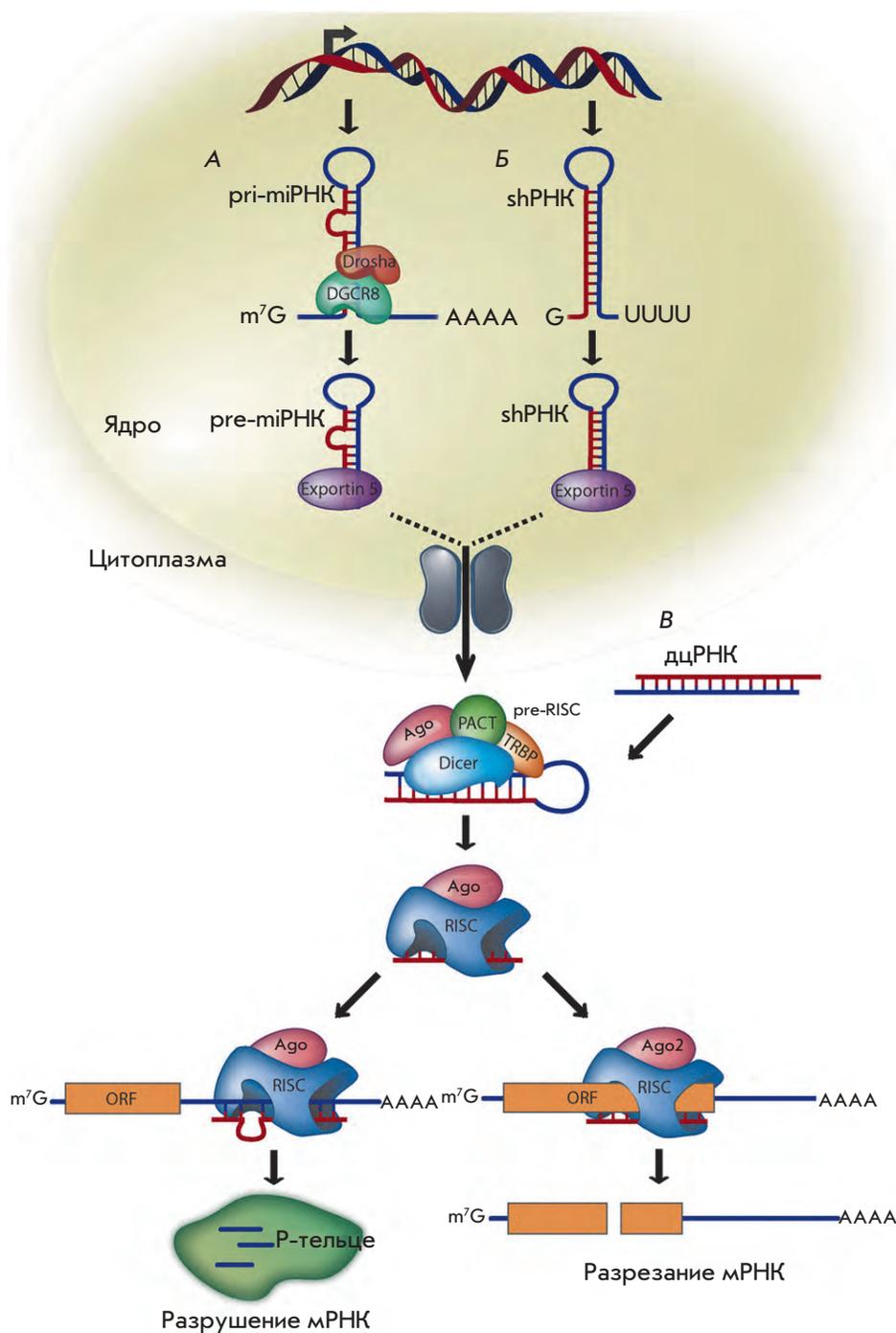


Рис. 4. Механизм посттранскрипционной регуляции экспрессии генов для miRNA, shRNA и siRNA у млекопитающих. А – Вначале на гене miRNA синтезируется протяженный первичный транскрипт pri-miRNA, который процессируется до прекурсора miRNA – pre-miRNA с помощью фермента Drosha (DGCR8). дцRNA-связывающий белок Exportin 5 транспортирует pre-miRNA в цитоплазму, где при участии комплекса Dicer/TRBP происходит образование дуплексов miRNA длиной 22 п.н. Несовершенные дуплексы miRNA взаимодействуют с белком Ago и загружаются в комплекс RISC, где происходит разрушение пассажирской цепи. Подавление экспрессии гена осуществляется либо путем ингибирования инициации трансляции, либо за счет транспорта зрелого комплекса RISC в Р-тельца, где происходит деаденилирование и расщепление целевой мРНК. Б – Как и miRNA, shRNA транскрибируется с ДНК. Для shRNA характерен аналогичный процессинг. Так как последовательность shRNA полностью комплементарна последовательности мРНК-мишени, далее происходит Ago2-опосредованное расщепление целевой мРНК. В – В отличие от shRNA, siRNA искусственно вводят в цитоплазму. Стадии процессинга siRNA и shRNA после взаимодействия молекул с Dicer/TRBP совпадают [2]

После того как молекулы siRNA покидают кровоток, они должны пройти через внеклеточный матрикс, сеть структурных белков и полисахаридов, окружающую клетки-мишени. Внеклеточный матрикс может значительно затруднить поглощение siRNA клетками, повышая тем самым вероятность их фагоцитоза и расщепления [29].

Плазматическая мембрана является основным барьером для проникновения siRNA в клетку. Ги-

дрофильная природа, высокая молекулярная масса, а также суммарный отрицательный заряд молекул siRNA обуславливают низкую эффективность их поглощения. Существует несколько путей решения данной проблемы. Например, соединение молекул siRNA с катионными липидами и полимерами приводит к нейтрализации отрицательного заряда siRNA и образованию положительно заряженных комплексов [30].

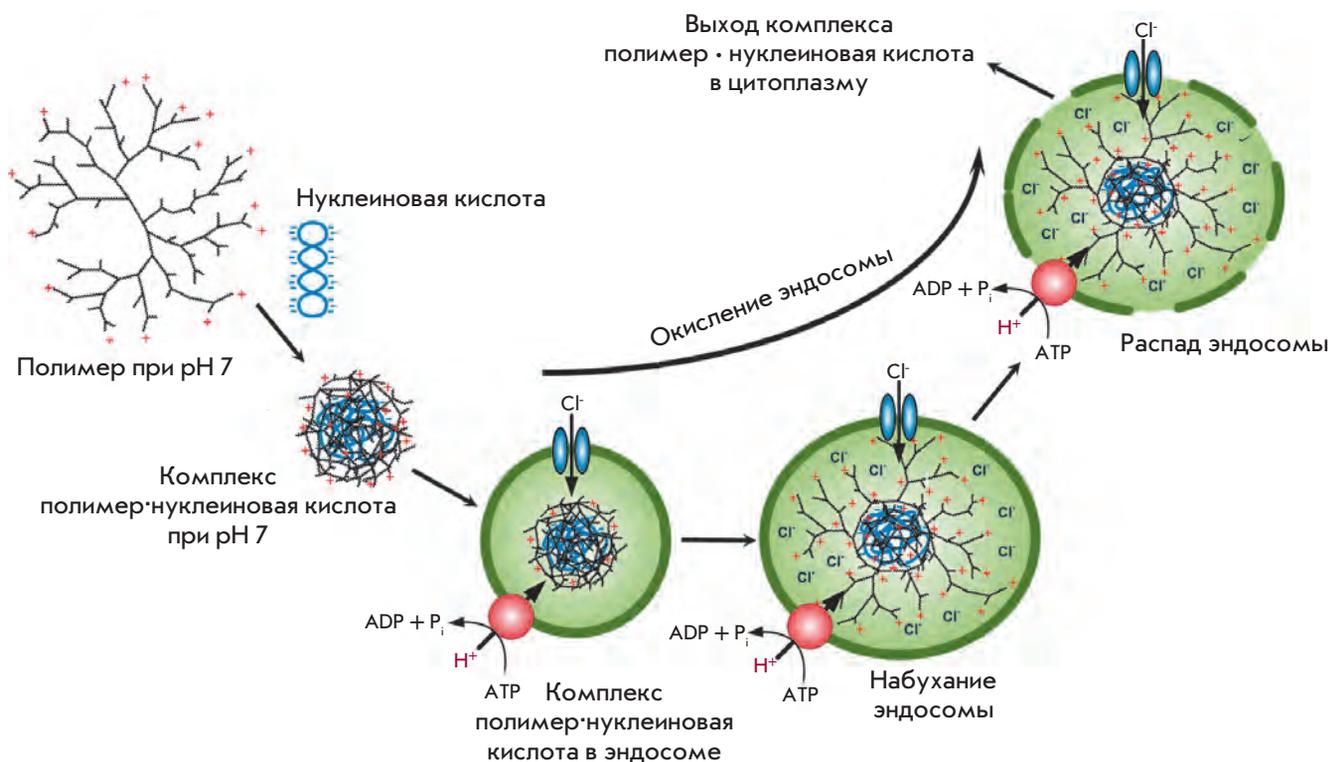


Рис. 5. Схематическая иллюстрация гипотез протонной губки и эффекта зонтика [40]. Положительно заряженный полимер формирует комплекс с отрицательно заряженной нуклеиновой кислотой. При низких значениях pH в эндосоме комплекс полимер · нуклеиновая кислота частично разворачивается. Из-за протонирования концевых аминогрупп и электростатического отталкивания происходит высвобождение терминальных ветвей полимера, и комплекс переходит в развернутое состояние

Показано, что невирусные носители проникают в клетки путем эндоцитоза. Выделяют клатрин-опосредованный эндоцитоз, кавеол-опосредованный эндоцитоз, макропиноцитоз, а также клатрин- и кавеол-независимый эндоцитоз [31]. В отличие от вирусов, синтетические векторы характеризуются невысокой эффективностью трансфекции. Один из способов увеличения поглощения носителей клетками – присоединение специфических лигандов, способствующих рецептор-опосредованному эндоцитозу транспортных молекул. Такие лиганды, как правило, нацелены на рецепторы, опосредующие всасывание питательных веществ: рецепторы трансферрина, фолиевой кислоты и липопротеинов низкой плотности [32, 33].

После проникновения в клетку молекулы siРНК обнаруживаются в составе ранних эндосом. Благодаря работе вакуолярной H⁺-АТФ-азы происходит закисление среды ранних эндосом (снижение pH до 5–6), в результате чего они преобразуются в поздние эндосомы. Затем происходит слияние поздних эндосом с лизосомами, которые имеют еще более

низкие значения pH (около 4.5) и содержат нуклеазы, расщепляющие siРНК. Чтобы избежать деградации в лизосомах, молекулы siРНК (в несвязанной форме или в комплексе с носителем) должны выйти из эндосомы в цитозоль. Выход из эндосомы является основным лимитирующим этапом процесса РНК-интерференции [34, 35].

Эффективная доставка siРНК с помощью различных катионных полимеров обусловлена большой буферной емкостью этих соединений (за счет непротонированных вторичных и третичных аминов) в диапазоне pH от 5 до 7. Предполагают, что такие полимеры предотвращают закисление среды эндосомы, выступая в качестве протонных губок (рис. 5). При этом происходит увеличение притока протонов за счет активации вакуолярной H⁺-АТФ-азы, сопровождаемое накоплением анионов хлора Cl⁻, а также повышение осмотического давления. Это приводит к осмотическому набуханию и распаду эндосомы [36–38].

Также предложена гипотеза об эффекте зонтика (рис. 5), которая описывает способность полимеров

к объемному расширению при pH 5–6. Избыток протонов в эндосомах приводит к протонированию третичных аминов внутренней части полимера. Из-за электростатического отталкивания соседних заряженных аминогрупп концевые ветви полимера разворачиваются, и комплекс переходит из свернутого состояния в разветвленное, если нет стерических ограничений [39, 40].

Выход из эндосом векторов на основе катионных липидов опосредован преимущественно электростатическими взаимодействиями этих молекул с отрицательно заряженными фосфолипидами мембран эндосом, а также способностью липидных структур переходить из ламеллярной фазы (бислоя) в гексагональную. Формирование катион-анионных пар дестабилизирует липидные бислои, в результате чего нуклеиновые кислоты высвобождаются из комплекса [41, 42].

ХИМИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ РНК

Период полужизни немодифицированных siРНК в сыворотке крови не превышает 15 мин, что серьезно препятствует их клиническому применению [25, 43]. Согласно Y. Zou и соавт. [44] в сыворотке крови крысы и человека направляющая цепь в большей степени подвержена действию экзонуклеаз, тогда как пассажирская цепь – эндонуклеаз. Наиболее распространенный метод увеличения стабильности siРНК (устойчивости к действию нуклеаз сыворотки крови) – введение различных химических модификаций [45, 46]. Однако следует учитывать, что это может приводить к исчезновению биологической активности siРНК [45].

Выбор вносимых химических модификаций определяется последовательностью нуклеотидов siРНК, предполагаемой областью ее применения и способом доставки [26]. На сегодняшний день большинство siРНК, используемых в научных, доклинических и клинических исследованиях, представляют собой синтетические РНК-дуплексы длиной 21 п.н., имитирующие структуру природных siРНК. Также в фундаментальных исследованиях и при разработке лекарственных средств используют РНК-дуплексы длиной 19, 25 и 27 п.н. с тупыми концами, а также асимметричные РНК-дуплексы длиной 25/27 или 27/29 п.н. [47, 48].

Выделяют следующие типы химических модификаций siРНК: модификации фосфатного оства молекулы, сахара и оснований [49]. Несмотря на то что существует огромное количество возможных вариантов изменения структуры РНК, наиболее часто применяют следующие модификации (рис. 6): фосфотиоат (PS), 2'-О-метил (2'-ОМе), 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метоксиэтил (2'-МОЕ) и закрытую нуклеиновую

кислоту (locked nucleic acid – LNA) [2, 46, 50]. Модификации фосфатного оства предполагают внесение изменений в фосфодиэфирные связи нуклеотидов в молекуле РНК. Фосфотиоат образуется при замене атома кислорода немостикового фосфата атомом серы. Впервые такая модификация была применена более 25 лет назад, однако ее широко используют и по сей день [51]. PS-модификация придает олигонуклеотидам следующие свойства: повышенную устойчивость к деградации нуклеазами *in vivo*; способность вызывать РНКазу Н-опосредованное расщепление мРНК-мишени; повышенное сродство к белкам плазмы крови, обеспечивающее снижение почечного клиренса и, таким образом, препятствующее быстрому выведению олигонуклеотидов из организма [2, 52]. Внесение фосфотиоата снижает температуру плавления дуплексов siРНК, примерно на 0.5°C на один PS [53]. Следует иметь в виду, что молекулы с PS-модификацией могут неспецифически связываться с белками клеточной мембраны, в результате чего возрастает цитотоксичность siРНК [53]. T. Tuschl и соавт. [53] сообщили о цитотоксичности siРНК, в которых каждый второй нуклеотид содержал PS. Показано, что токсичность может быть снижена за счет уменьшения общего содержания PS, а также при введении данной модификации только в один конец siРНК. Согласно данным Z.Y. Li и соавт. [54] внедрение PS-модификаций в положения 3, 5 и 17 на 5'-конце пассажирской цепи повышает эффективность действия siРНК за счет ускорения загрузки направляющей цепи в комплекс RISC. Непосредственное внесение PS-модификаций в направляющую цепь, напротив, снижает эффективность подавления экспрессии генов с помощью siРНК [53, 54].

Наиболее широко используют модификации по второму положению рибозного кольца (рис. 6): 2'-О-метил, 2'-фтор и 2'-О-метоксиэтил [55, 56]. siРНК, модифицированная таким образом, образует термостабильный дуплекс типа А. Это связано с тем, что предпочтительной конформацией модифицированного сахара является 3'-эндо [2, 56]. 2'-О-метил-РНК обнаружены среди рибосомных и транспортных РНК млекопитающих. Внесение 2'-ОМе увеличивает температуру плавления дуплексов siРНК на 0.5–0.7°C на одну модификацию, а также повышает устойчивость к нуклеазам и усиливает эффективность действия siРНК [53, 56]. 2'-ОМе-модификации рекомендуют вносить в пассажирскую цепь. Введение таких модификаций в направляющую цепь может привести к снижению эффективности РНК-и из-за невозможности связывания направляющей цепи с комплексом RISC [57]. Включение 2'-ОМе совместно с PS увеличивает аффинность направляющей цепи к мРНК-мишени и повышает устойчивость siРНК к воздей-

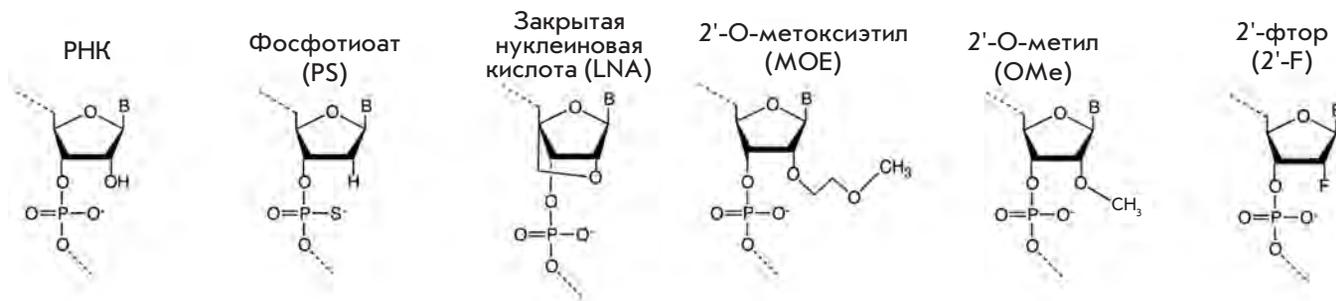


Рис. 6. Химические модификации РНК

ствию нуклеаз, не снижая при этом эффективность РНК-интерференции [56, 57].

Внесение 2'-фтор-модификаций не препятствует функционированию siРНК, а также защищает дуплекс от расщепления нуклеазами. Включение 2'-F в позиции пиримидина поддерживает активность siРНК *in vitro* и *in vivo* [58, 59]. 2'-F-модификация сайта расщепления siРНК белком Ago2 также не влияет на эффективность РНК-и [60]. РНК-дуплексы, содержащие и 2'-F-пиримидины, и 2'-ОМе-пурины, обладают очень высокой стабильностью в сыворотке крови, а также повышенной эффективностью при подавлении экспрессии генов *in vivo* [61]. Показано, что такие siРНК могут действовать в 500 раз эффективнее по сравнению с немодифицированными РНК [59].

Другая важная 2'-С-модификация рибозы – 2'-фтор-β-D-арабинонуклеотид (2'-fluoro-β-D-arabinonucleotide – FANA) [56, 62, 63]. Включение FANA увеличивает температуру плавления РНК-дуплекса примерно на 0.5°C на одну модификацию [64]. FANA отличается от других 2'-С-модификаций, так как содержит арабинозу и структурно похожа на ДНК (в 2'-эндо-конформации). Стереохимия FANA противоположна стереохимии рибозы с фтором во втором положении. Внесение FANA-модификаций в дуплексную РНК неизбежно приводит к искажениям структуры этой молекулы, поэтому такую модификацию нежелательно вводить в направляющую цепь. В то же время эффективность РНК-интерференции значительно повышается в случае FANA-модификаций по всей длине пассажирской цепи и на 3'-конце направляющей цепи [62, 63].

Также часто применяют модификацию рибозы 2'-О-метоксиэтилом (МОЕ). Включение МОЕ приводит к увеличению сродства siРНК к РНК-мишени, повышению устойчивости к действию нуклеаз *in vivo* и уменьшению неспецифического связывания белков, что может свести к минимуму токсические эффекты. Тем не менее эту модификацию нежелательно вносить в направляющую цепь. Это связано

с возникновением стерических ограничений при взаимодействии с боковыми группами Ago2 и, как следствие, невозможностью загрузки направляющей цепи в RISC [55, 65, 66].

Показано, что siРНК, содержащие и 2'-фторпиримидины, и 2'-метоксипурины, обладают чрезвычайно высокой устойчивостью к действию нуклеаз в сыворотке крови человека (время полужизни направляющей цепи составляет до трех дней) [61]. Закрытая нуклеиновая кислота – это модификация, при которой 2'- и 4'-положения кольца рибозы связаны между собой через метиленовый мостик (рис. 6). При этом фуранозное кольцо закрыто в 3'-эндо-конформации, придающей ему структурное сходство с обычным мономером РНК [67]. Жесткость конформации LNA обуславливает более четкую организацию фосфатного остова и усиление как стэкинг-взаимодействий между основаниями, так и гибридизации направляющей цепи с РНК-мишенью. Высокая аффинность LNA-модифицированных siРНК позволяет использовать более короткие последовательности (около 16 н. вместо 20). Включение одной модификации LNA может привести к увеличению температуры плавления РНК-дуплекса на 5–10°C. Большое значение имеет выбор положения для внесения данной модификации. Показано, что присутствие LNA в положениях 10, 12 и 14 направляющей цепи приводит к исчезновению интерферирующей активности siРНК. Это связано со стерическими и конформационными изменениями при включении LNA вблизи сайта расщепления [67, 68]. Наличие LNA на 3'-конце siРНК защищает дуплекс от воздействия 3'-экзонуклеаз сыворотки крови [69]. Тем не менее использование LNA-модифицированных siРНК *in vivo* затруднено из-за их высокой гепатотоксичности [70].

К модифицированным siРНК также относят шпигельмеры. Они представляют собой L-олигорибонуклеотиды – энантиомеры природных D-РНК, которые получили свое название от немецкого слова Spiegel (зеркало). Высокая устойчивость шпигельмеров к действию нуклеаз в сочетании с высокой аф-

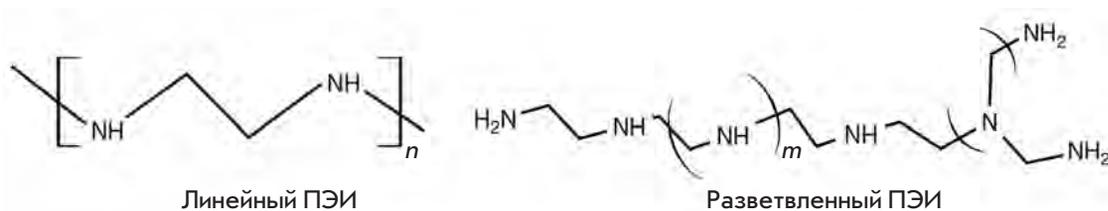


Рис. 7. Полиэтиленимин

финностью этих молекул к РНК-мишени делает их очень перспективными для использования в терапевтических целях [71].

НЕВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК

Первые разработки в области доставки олигонуклеотидов в клетки были посвящены созданию синтетических векторов для транспортировки ДНК [72, 73]. Рекомбинантные вирусные векторы показали многообещающие результаты *in vitro*, но после выявления существенных недостатков и осложнений при проведении клинических испытаний большое внимание стали уделять и невирусным системам доставки [73]. В настоящее время для транспортировки интерферирующих РНК применяют следующие виды комплексов и наночастиц (НЧ) диаметром от 1 до 1000 нм: полиплексы, катионные пептиды, липосомы, квантовые точки, углеродные нанотрубки и другие неорганические наночастицы [73].

Полиплексы

Комплексы малых интерферирующих РНК с катионными полимерами называют полиплексами. Такие соединения способны к самоорганизации в результате ионного взаимодействия между повторяющимися положительно заряженными участками полимеров и отрицательно заряженными фосфатными группами siРНК. Основное преимущество полимеров – их структурная гибкость, которая позволяет легко изменять физико-химические характеристики системы доставки. Молекулярная масса, плотность заряда, растворимость и гидрофобность могут быть подобраны в соответствии с условиями исследования. Например, изменение соотношения полимера и siРНК позволяет регулировать степень нейтрализации зарядов комплекса. Для изменения характеристик полимерных молекул и придания им новых свойств можно также добавлять различные химические группы. Как природные, так и синтетические полимеры применяют для создания полиплексных систем доставки нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих [74–76].

Полиэтиленимин (ПЭИ) (рис. 7) считается одним из наиболее эффективных средств доставки олиго-

нуклеотидов из-за своей исключительной способности к эндоцитозу и эндосомолитической активности. Для транспортировки малых интерферирующих РНК чаще используют высокомолекулярный ПЭИ (25 кДа) [77]. Высокая плотность заряда полимера обуславливает прочную связь ПЭИ с siРНК и обеспечивает ее эффективную защиту от ферментативного расщепления. Однако высокая цитотоксичность и ограниченная биodeградация этого полимера создают препятствия для его клинического применения [78, 79]. Низкомолекулярный ПЭИ (< 2 кДа) менее токсичен, но при этом и менее эффективно доставляет siРНК. Считают, что ПЭИ и другие катионные полимеры увеличивают проницаемость мембраны клетки путем создания в ней короткоживущих нанотверстий [77, 80]. Полагают также, что дестабилизирующее действие на мембраны может быть причиной цитотоксичности [80]. Другой фактор, влияющий на эффективность действия и токсичность ПЭИ, – степень разветвленности структуры полимера [60]. Разветвленный полиэтиленимин содержит первичные, вторичные и третичные амины в соотношении 1 : 2 : 1, тогда как линейный полимер состоит только из вторичных аминов, за исключением концевых первичных аминов (рис. 7) [81]. Разветвленный ПЭИ превосходит линейный по эффективности доставки нуклеиновых кислот [81].

В качестве транспортеров siРНК и других олигонуклеотидов широко применяют комплексы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (poly(lactic-co-glycolic acid) – PLGA). К их преимуществам относят малый размер, низкую цитотоксичность и способность к длительной циркуляции в кровотоке [82]. Комплексы PLGA-siРНК получают двумя способами: (1) путем включения siРНК в ядро комплекса и (2) путем адсорбции siРНК на поверхности модифицированных катионных наночастиц PLGA с помощью электростатических взаимодействий. PLGA защищает siРНК от действия нуклеаз сыворотки крови, а также обеспечивает пролонгированное высвобождение транспортируемого вещества [83, 84].

PLGA использовали для доставки siРНК, направленной против мРНК гена *TNF α* (фактор некроза опухоли α), с целью подавления воспалительных

реакций. В клетках линии J774.1 (макрофаги мыши) наблюдалось снижение уровня мРНК и белка $TNF\alpha$ – на 50 и 40% по сравнению с контролем соответственно. Эффективность действия анти- $TNF\alpha$ -siРНК была изучена *in vivo* на мышинной модели коллаген-индуцированного артрита. В результате инъекций комплексов PLGA-анти- $TNF\alpha$ -siРНК в пораженные коленные суставы наблюдалось локальное снижение экспрессии $TNF\alpha$, а также заметное уменьшение проявлений воспаления синовиальной сумки (по данным гистологического исследования). Важно отметить, что после введения этих комплексов в полость сустава значительное количество siРНК обнаруживалось в синовиальной оболочке, где в основном и находятся клетки, вырабатывающие $TNF\alpha$. Ингибиторный эффект отмечали в течение 11 дней после инъекции siРНК, поскольку PLGA обладает свойством замедленного высвобождения переносимого вещества [85].

J. Steinbach и соавт. успешно применили PLGA для доставки siРНК, направленных против мРНК генов нектин-1 и *UL29.2*, играющих ключевую роль в развитии герпесвирусной инфекции типа 2. Как *in vitro*, так и *in vivo* (на мышинной модели) было достигнуто существенное подавление экспрессии целевых генов. Также установлено, что наночастицы PLGA обладают низкой цитотоксичностью. В этой работе показана возможность применения комплексов PLGA-siРНК при инфицировании вирусом простого герпеса типа 2 [86].

Дендримеры, также применяемые для доставки терапевтических олигонуклеотидов, представляют собой сильно разветвленные полимерные молекулы размером 1–5 нм. Ветви дендримера симметрично расположены вокруг центральной части молекулы. Дендримеры состоят из трех архитектурных доменов (рис. 8): внутренней области – ядра, соединенных с ним дендронов и поверхности с большим количеством реакционноспособных участков [87, 88]. Дендримерные молекулы обладают свойствами монодисперсности и гидрофильности [89, 90]. Возможность функционализации дендримеров, изменения их растворимости, прикрепления флуоресцентных зондов позволяет использовать данные молекулы для доставки различных терапевтических агентов, в том числе малых интерферирующих РНК в клетки-мишени [91]. Переносимое вещество может быть соединено с периферическими группами дендримеров либо через ковалентную связь, либо путем ионных взаимодействий. Транспортируемые терапевтические средства могут быть инкапсулированы внутри дендримерных частиц, формируя таким образом мономолекулярные мицеллы [89]. Конъюгаты, образованные дендримерами и переносимыми веществами, более устойчивы, чем липосомы [91]. Силь-

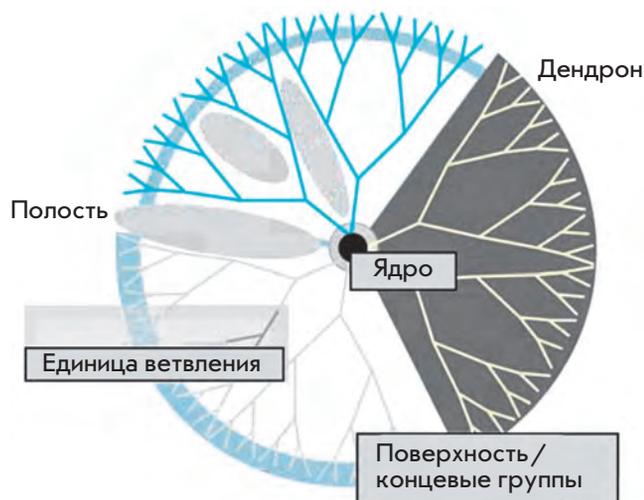


Рис. 8. Схема строения дендримера [89]

но разветвленные полимеры, разработанные еще в 1980-х годах, такие, как дендримерные молекулы полиамидамина (РАМАМ), полипропиленимина (РПИ), поли(L-лизина) (PLL) и карбонсилана (carbon-silane), в настоящее время используют для доставки siРНК [92].

РАМАМ-полимеры для доставки siРНК коммерчески доступны (Polyfect и Superfect) [93]. РАМАМ был успешно применен для доставки siРНК в нейроны *in vitro* и *in vivo* (внутричерепные инъекции кроликам), продемонстрировав при этом минимальную токсичность [94].

Y. Tang и соавт. изучали эффективность доставки анти-GFP-siРНК (GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок) с помощью наночастиц на основе ПЭГилированного (ассоциированного с полиэтиленгликолем) РАМАМ *in vitro* и *in vivo*. Отмечено значительное снижение уровня экспрессии GFP под действием анти-GFP-siРНК в клетках линий НЕК293 (фибробласты почки эмбриона человека) и Cos7 (фибробласты почки зеленой мартышки). Эффективность трансфекции наночастиц РАМАМ-siРНК была сравнима с эффективностью Lipofectamine 2000 (Invitrogen). При внутримышечном введении этих комплексов GFP-трансгенным мышам также наблюдали снижение уровня экспрессии мРНК зеленого флуоресцентного белка. Показано, что наночастицы РАМАМ надежно защищают siРНК от действия нуклеаз сыворотки крови [95].

Полипропиленимин (РПИ) был специально разработан на основе ПЭИ для доставки siРНК. O. Taratula и соавт. изучали эффективность доставки siРНК, направленной против мРНК гена *bcl-2*, с помощью

комплексов на основе полипропиленimina. Наночастицы PPI были покрыты полиэтиленгликолем (ПЭГ) для придания им большей стабильности; дистальный конец ПЭГ был соединен с синтетическим аналогом рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона с целью обеспечения адресной доставки siРНК в опухолевые клетки. *In vitro* наблюдали значительное снижение уровня экспрессии целевого гена в клетках линий A2780 (рак яичников человека) и A549 (рак легкого человека). В результате исследования *in vivo* выявлено замедление роста ксенотрансплантатов из клеточной линии A549 у мышей nude с иммунодефицитом. При этом комплексы PPI-siРНК локализовались преимущественно в ткани опухоли, а концентрация нановектора с siРНК в печени и почках была минимальной. Установлено, что наночастицы на основе PPI обладают умеренной цитотоксичностью, однако предполагается, что снижение выживаемости клеток (примерно на 20%) можно объяснить подавлением экспрессии гена *bcl-2*, который играет важную роль в регуляции пролиферации клеток [96].

Природный полисахарид хитозан, используемый для доставки siРНК и состоящий из мономеров глюкозамина и N-ацетилглюкозамина (рис. 9), получают из хитина путем деацетилирования [97, 98]. Хитозан легко расщепляется лизоцимами и хитиназами *in vivo* [97]. Этот полимер практически нетоксичен для млекопитающих [99]. Как правило, размер комплексов хитозан-siРНК не превышает 200 нм, что является преимуществом при доставке *in vivo* [97, 98]. Несмотря на относительную безопасность и биосовместимость хитозана, на данный момент проведено лишь несколько испытаний *in vivo*, возможно, из-за ограниченной эффективности полимера при транспортировке siРНК. Принято считать, что первыми для доставки siРНК *in vitro* хитозан использовали Н. Katas и Н.О. Alpar [100]. Оказалось, что способ формирования комплексов хитозана с siРНК оказывает большое влияние на эффективность подавления экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Показано также, что наночастицы хитозантриполифосфата, содержащие siРНК, обладают рядом преимуществ перед комплексами хитозана с siРНК: они имеют более высокую связывающую способность и коэффициент заполнения [100].

К.А. Howard и соавт. разработали систему доставки siРНК на основе хитозана, применимую как *in vitro*, так и *in vivo*. В результате было достигнуто подавление эктопической экспрессии *EGFP* (*EGFP* – enhanced green fluorescent protein, усиленный зеленый флуоресцентный белок) в клетках линии H1299 (клетки немелкоклеточного рака легкого человека) и в перитонеальных макрофагах мыши (снижение уровня флуоресценции *EGFP* на 77.9 и 89.3% соот-

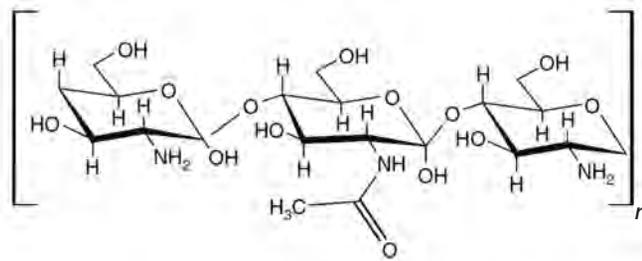


Рис. 9. Хитозан

ветственно). Показано также, что хитозан может применяться для доставки анти-*EGFP*-siРНК в эпителиальные клетки бронхиол *EGFP*-трансгенных мышей путем интраназального введения. Снижение экспрессии *EGFP* составило 37 и 43% по сравнению с мисматч- и отрицательным контролем соответственно. Эти данные подтверждают принципиальную возможность использования хитозана в качестве транспортного агента siРНК при поражениях слизистых оболочек [101].

Е.Ј. Nielsen и соавт. [102] разработали систему доставки анти-*EGFP*-siРНК в легочный эпителий с использованием наночастиц хитозана в виде аэрозоля. Трансфекция таких комплексов в клетки линии H1299 приводила к снижению уровня флуоресценции *EGFP* на 62%. После внутритрахеального введения аэрозоля наночастиц *EGFP*-трансгенным мышам наблюдалось снижение флуоресценции *EGFP* на 68% по сравнению с мисматч-контролем. При этом комплексы хитозан-siРНК локализовались в клетках и альвеол, и бронхиол, а также равномерно распределялись по всему объему легких. К.А. Howard и соавт. [103] показали, что внутривнутрибрюшинное введение комплексов анти-TNF α -siРНК-хитозан мышам с коллаген-индуцированным артритом приводит к снижению на 44% экспрессии целевого гена в перитонеальных макрофагах и торможению локальных и общих воспалительных реакций. Таким образом, наночастицы на основе хитозана могут быть использованы в качестве транспортеров терапевтических средств при системных заболеваниях.

ПЭГилирование хитозана повышает стабильность комплексов с siРНК, а также увеличивает время полужизни наночастиц в сыворотке крови [104]. В работе D.W. Lee и соавт. наночастицы хитозана заданного размера получали методом коацервации в присутствии полигулороната. Диаметр комплексов варьировал от 110 до 430 нм в зависимости от соотношения хитозана и siРНК. Такие наночастицы показали высокую эффективность при доставке siРНК в клетки линий HEK293 (фибробласты почки эмбриона че-

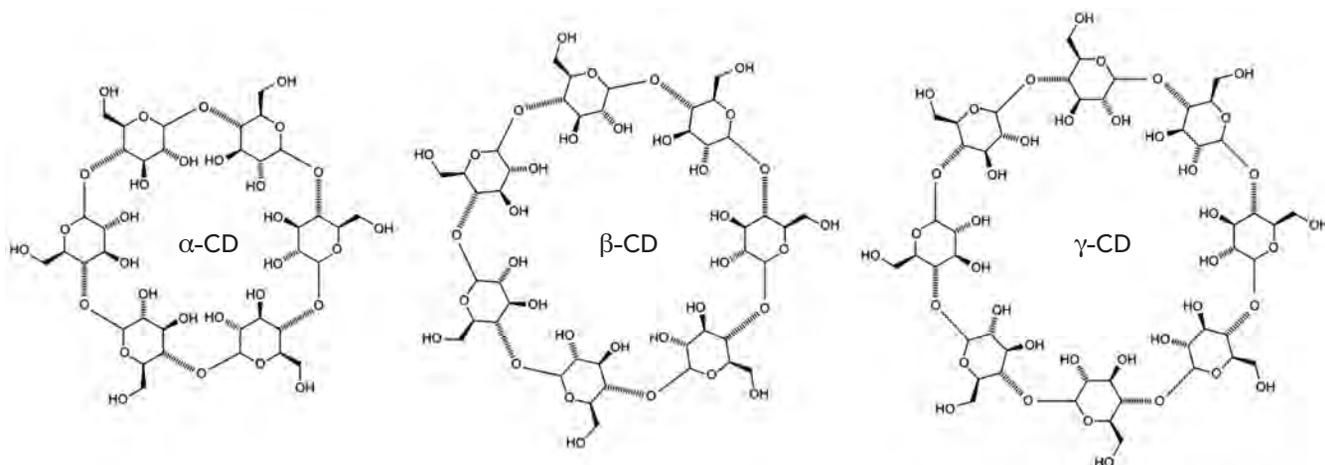


Рис. 10. Химическая структура циклодекстринов. Выделяют три типа циклодекстринов: α-циклодекстрин (α-CD), β-циклодекстрин (β-CD) и γ-циклодекстрин (γ-CD). α-, β- и γ-циклодекстрины состоят из шести, семи и восьми глюкопиранозных звеньев соответственно

ловека) и HeLa (клетки рака шейки матки), а также низкую цитотоксичность [105].

А.М. Ji и соавт. описали комплексы хитозан-siРНК как нерегулярные, положительно заряженные ламеллярные и разветвленные структуры с гидродинамическим радиусом около 148 нм. Такие наночастицы использовали для доставки siРНК, направленной против мРНК гена, кодирующего белок FHL2 (four and a half LIM-domain protein), в клетки линии Lovo (клетки рака толстого кишечника). Повышенная экспрессия этого онкогена отмечена в различных типах раковых клеток (рак эпителия яичников, гепатобластома, аденокарцинома толстого кишечника, некоторые виды рака молочной железы и линия клеток HeLa). Наблюдалось снижение экспрессии гена *FHL2* на 70%, что сопоставимо с результатами, полученными после трансфекции siРНК с помощью Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) [106].

Хитозан использовали также в качестве «оболочки» для повышения эффективности других систем доставки. Покрытые хитозаном частицы полиизогексилцианоакрилата применили для транспортировки анти-RhoA-siРНК в клетки ксенотрансплантатов рака молочной железы у мышей nude. Гиперэкспрессия гена *RhoA* (Ras homolog gene family, member A) ассоциирована с плохим прогнозом у онкологических больных, так как обуславливает ускорение пролиферации опухолевых клеток и ангиогенеза, а также инвазивный тип роста опухоли. Анти-RhoA-siРНК вводили мышам nude каждые 3 дня в дозах 150 или 1500 мкг/кг массы тела. В результате при введении этой siРНК в дозе 150 мкг/кг рост опухоли тормозился более чем на 90%. Введение 1500 мкг/кг

приводило к частичному некрозу опухоли за счет подавления ангиогенеза. При этом комплексы не оказывали токсического действия [107].

Циклодекстрины также применяют для доставки siРНК. Они представляют собой циклические (α-1,4)-связанные олигосахариды β-D-глюкопиранозы. Молекулы циклодекстрина имеют тороидную форму. Они состоят из гидрофобной центральной полости и гидрофильной наружной поверхности (рис. 10) [108, 109]. Циклодекстрины защищают siРНК от деградации нуклеазами сыворотки крови и снижают иммуногенность siРНК *in vivo*, даже при наличии иммуностимулирующих последовательностей в составе siРНК [109]. Несмотря на то что природные siРНК не обладают иммуногенностью, доставка двухцепочечных siРНК и одноцепочечных РНК с помощью липосом может активировать иммунную систему млекопитающих. При этом происходит активация Toll-подобных рецепторов (TLR7, TLR8 и TLR9) в периферических мононуклеарах, моноцитах, плазматоидных дендритных клетках и CD34⁺-клетках-предшественниках. Возможными причинами отсутствия иммунного ответа при использовании циклодекстринов в качестве транспортеров siРНК считаются антиоксидантная активность данной системы доставки (показано, что ингибиторы окисления эндосом способны блокировать развитие иммунного ответа) и отсутствие поглощения наночастиц иммунокомпетентными клетками [109].

S. Hu-Lieskovan и соавт. [110] показали, что использование комплексных частиц, образованных циклодекстрином, анти-EWS-FLI1-siРНК и трансферрином, который является лигандом для адресной

доставки, значительно снижает экспрессию целевого онкогена в клетках саркомы Юинга, экспрессирующих рецептор трансферрина.

В настоящее время на больных с солидными опухолями проходит первая фаза клинических испытаний siРНК, направленной против мРНК гена *RRM2* (Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2) [111]. *RRM2* кодирует малую субъединицу фермента рибонуклеотидредуктазы, который катализирует превращение рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды. Показано, что ингибиторы рибонуклеотидредуктазы обладают химиотерапевтическим противоопухолевым эффектом. Это связывают с тем, что репаративные возможности клетки зависят от концентрации дезоксирибонуклеотидов [112]. В качестве системы доставки анти-*RRM2*-siРНК используют наночастицы на основе циклодекстринов. В биопсийном материале больных меланомой, получавших анти-*RRM2*-siРНК, опухолевые клетки содержали большое количество наночастиц. Наблюдалось существенное снижение уровня экспрессии мРНК и белка *RRM2* по сравнению с показателями до начала терапии [111].

Липидные системы доставки

Липосомы представляют собой высокоорганизованные липидные агрегаты (рис. 11). Они образованы одним или несколькими концентрическими замкнутыми

мембранами фосфолипидов, имеющих гидрофобные головки и гидрофильные хвосты, ограничивающими внутреннюю водную фазу. Липосомы успешно применяют для доставки водорастворимых веществ, помещенных в их гидрофильное ядро [113, 114].

Широкое применение липосом для доставки siРНК связано с их оптимальным размером (около 100 нм), хорошей биосовместимостью, а также простотой получения и использования [115]. Например, нейтральный липид 1,2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DOPC) может инкапсулировать до 65% siРНК в результате смешивания растворов двух компонентов. Также липосомы получают из диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE) (рис. 12), 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) (рис. 12), фосфатидилхолина (PC) и других нейтральных липидов [116].

Липосомы стали первыми наночастицами, одобренными для клинического применения. Эти наночастицы представляли собой ПЭГилированные липосомные комплексы доxorубина (doxorubicin). После введения больным саркомой Капоши доxorубина в составе липосом 1 раз в 3 недели у 19 из 53 человек зафиксирован частичный ответ, а у одного – полный ответ. При этом отмечено увеличение времени циркуляции доxorубина в кровотоке, а также снижение его кардиотоксичности [117, 118].

Недавно доxorубин в составе липосом прошел клинические испытания (фаза II) в сочетании с до-

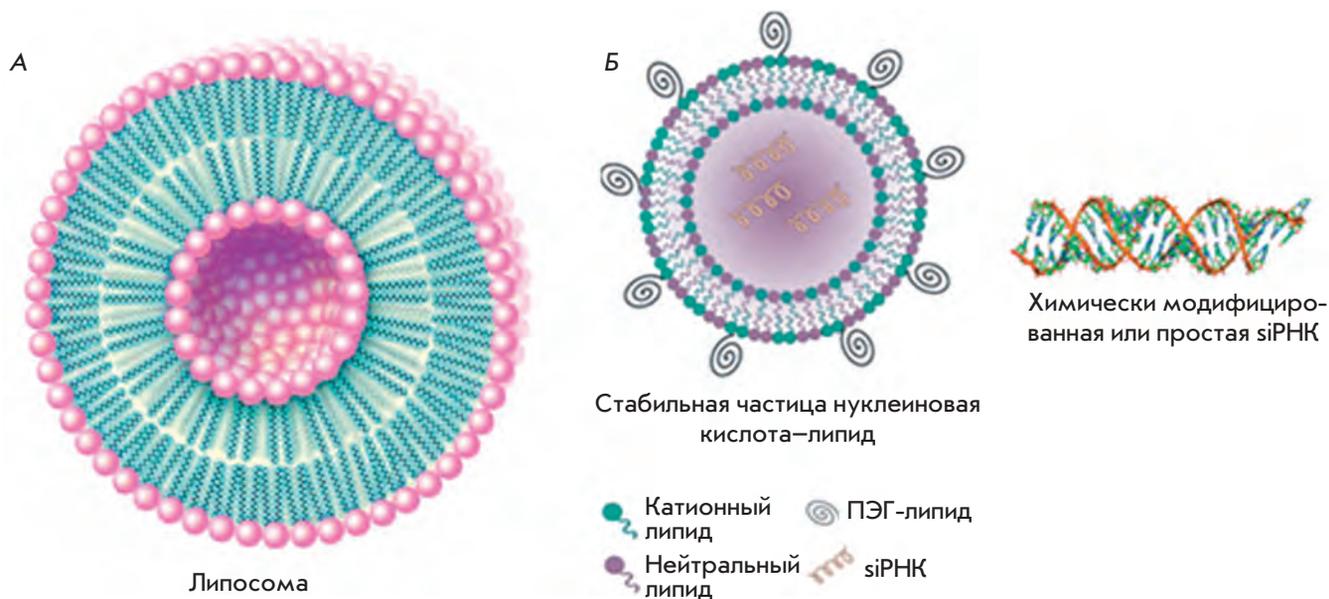


Рис. 11. Комплексы для доставки siРНК на основе липидов. А – Схема строения липосомы (Encyclopædia Britannica, Inc.). Б – Схема строения стабильной частицы нуклеиновая кислота-липид (stable nucleic acid lipid particle – SNALP) [117]

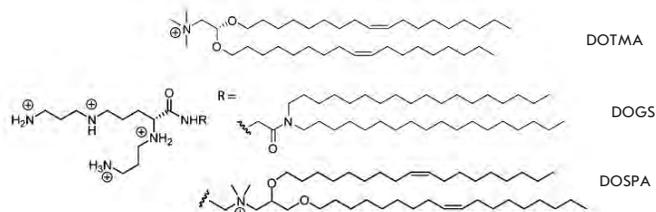
цетакселом (docetaxel) и трастузумабом (trastuzumab). В этом исследовании принял участие 31 больной с метастазирующим *HER2*-положительным раком молочной железы. При использовании этих препаратов кардиотоксичность и общие побочные эффекты были минимальными. Отмечено также улучшение прогноза у больных метастазирующим раком молочной железы [119].

C.N. Landen и соавт. [120] сообщили о снижении экспрессии *EphA2* (ген рецептора тирозинкиназы, ассоциированный с плохим прогнозом при раке яичников) у мышей *nude* при использовании DOPC-липосом в качестве системы доставки. DOPC-липосомы применяли и для подавления экспрессии гена рецептора PAR-1 (Protease-activated receptor) с целью прекращения роста и метастазирования меланомы в результате снижения ангиогенеза. DOPE-липосомы были использованы для доставки siРНК, направленной против *Ubc13* [116, 120].

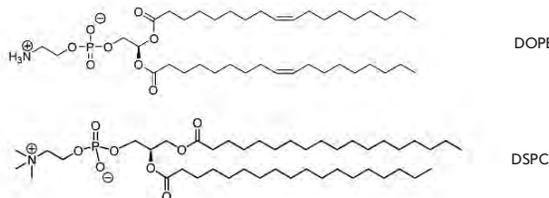
S.H. Kang и соавт. разработали липосомы, содержащие siРНК, направленную против мРНК *Mcl1*, и ингибитор протеинкиназы MEK – PD0325901. Сигнальный путь Raf/MEK/ERK, в котором участвует киназа MEK, играет важную роль в регуляции пролиферации клеток; нарушения этого пути выявлены при нескольких типах рака. Продукт гена *Mcl1* (myeloid cell leukemia sequence 1) относится к семейству белков Bcl-2, регулирующих апоптоз. Введение в опухолевые клетки анти-*Mcl1*-siРНК повышает их чувствительность к химиотерапевтическим средствам, индуцирующим апоптоз. Противоопухолевую активность наночастиц изучали *in vitro* и *in vivo*. Комплексы катионных липосом на основе N',N''-диолеилглутамида с ингибитором PD0325901 и анти-*Mcl1*-siРНК добавляли к клеткам линии KB (клетки эпидермальной карциномы носоглотки человека). Согласно данным вестерн-блотинга количество белков *Mcl1* и pERK1/2 существенно снизилось по сравнению с контролем, как и выживаемость опухолевых клеток. Эти наночастицы вводили также мышам BALB/c с ксенотрансплантатами из клеток линии KB каждые 2 дня в дозе 0.7 мг/кг анти-*Mcl1*-siРНК и 0.72 мг/кг ингибитора PD0325901. Показано существенное уменьшение размера опухоли (на 79% по сравнению с контрольной группой); данные вестерн-блотинга были сопоставимы с результатами, полученными в опытах *in vitro* [121].

Комплексы катионных липидов (рис. 12) и нуклеиновых кислот называют липоплексами. Основное преимущество катионных липидов – пассивное взаимодействие с отрицательно заряженными siРНК и плазматической мембраной клетки, что значительно облегчает процесс интернализации. Тем не менее катионные липосомы более токсичны, чем

Катионные липиды



Нейтральные липиды



Ионизируемые катионные липиды

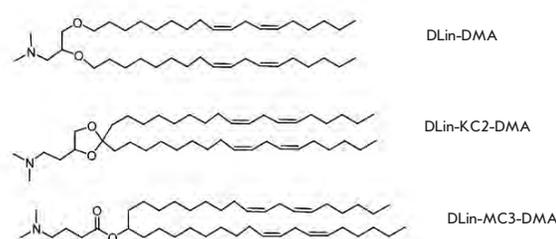


Рис. 12. Катионные, нейтральные и ионизируемые катионные липиды, используемые для доставки siРНК [117]

нейтральные, они характеризуются меньшим временем полужизни в сыворотке крови (отчасти из-за поглощения ретикулоэндотелиальной системой) и повышенной иммуногенностью (из-за поглощения макрофагами) [116].

Липоплексы на основе диметилгидроксиэтиламинопропанкарбамоилхолестерина (DMHAPC-Chol) и диолеилфосфатидилэтаноламина успешно использовали для доставки siРНК, направленной против мРНК фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), в клетки линий A431 (эпидермоидный рак человека) и MDA-MB231 (рак молочной железы человека). Введение комплексов DMHAPC-Chol·DOPE, содержащих анти-VEGF-siРНК, приводило к снижению экспрессии целевого гена более чем на 90%. Такие наночастицы обладали большей эффективностью трансфекции, чем при использовании Lipofectamine 2000 (Invitrogen). При трансфекции плазмиды, содержащей GFP, и анти-GFP-siРНК оказалось, что липоплексы на основе DMHAPC-Chol·DOPE более эффективны для транспортировки siРНК, чем плазмид [122].

К. Un и соавт. предложили использовать липopleксы, ассоциированные с маннозой и чувствительные к ультразвуковому воздействию [123–125], для селективной доставки малых интерферирующих РНК в клетки печени. Подобный метод доставки siРНК сочетает в себе преимущества липофекции и сонопорации: значительное количество переносимых нуклеиновых кислот может проникать непосредственно в цитоплазму благодаря образованию пор в клеточной мембране под действием ультразвука. В данной работе были использованы siРНК, направленные против мРНК гена белка внутриклеточной адгезии *ICAM-1*, экспрессия которого повышена в эндотелиальных клетках печени на ранних стадиях развития гепатита. Экспрессия *ICAM-1* существенно снижена как *in vitro* на эндотелиальных клетках печени, так и *in vivo* на мышинных моделях воспаления печени, индуцированного липополисахаридами, диметилнитрозамином, четыреххлористым углеродом, ишемией-реперфузией. Кроме того, *in vivo* отмечали противовоспалительный эффект, индуцированный этой siРНК. Предложенный способ доставки siРНК считается перспективным для терапии заболеваний печени [126].

Стабильные частицы нуклеиновая кислота-липид (stable nucleic acid lipid particles – SNALP) сравнительно недавно были разработаны Tekmira Pharmaceuticals Corporation. SNALP представляют собой полимерные наночастицы размером около 100 нм, состоящие из ионизируемых катионных липидов, таких, как DLin-DMA (1,2-дидолеилокси-3-диметиламинопропан), DLin-KC2-DMA (2,2-дидолеил-4-(2-диметиламиноэтил)-[1,3]-диоксалан) и холестерин, липидов с высокой температурой фазового перехода (1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин – DSPC) и ПЕГилированных липидов. Сложноорганизованные SNALP характеризуются пролонгированным временем циркуляции в кровотоке и большими возможностями модификации, что позволяет решать различные задачи при доставке siРНК [116, 127].

D.V. Morrissey и соавт. [61] показали возможность применения SNALP для эффективной системной доставки siРНК на мышинной модели вирусного гепатита В (HBV). Внутривенное введение SNALP, содержащих анти-HBV-siРНК (3 мг/кг) в течение 3 дней подряд приводило к торможению репликации вируса. Этот эффект сохранялся в течение 7 дней после инъекций комплексов SNALP-анти-HBV-siРНК.

T.S. Zimmermann и соавт. успешно использовали SNALP в качестве системы доставки siРНК, направленной против мРНК гена аполипопротеина В (*ApoB*), у яванских макаков. Спустя 48 ч после однократного внутривенного введения 2.5 мг/кг анти-*ApoB*-siРНК,

заключенных в SNALP, уровень мРНК *ApoB* в печени снижается на 80–90% одновременно с уменьшением концентрации холестерина в сыворотке крови на 65%. Такой подход дает быстрый и длительный эффект (до 11 дней после инъекции комплексов SNALP-siРНК) [128].

SNALP успешно использовали для доставки siРНК, направленной против мРНК киназы *PLK1*. Сверхэкспрессия гена *PLK1* играет важную роль в нарушении регуляции пролиферации опухолевых клеток различного гистологического происхождения. Внутривенное введение комплексов SNALP-анти-*PLK1*-siРНК приводило к подавлению роста ортотопических опухолей печени (клетки Нер3В) у мышей. Показано также, что SNALP не обладают иммуногенностью [122].

Пептидные системы доставки

Пептиды также могут служить в качестве эффективных систем доставки интерферирующих РНК [129]. Особый класс катионных пептидов, называемых пептиды, проникающие в клетку (cell-penetrating peptides, CPP), известен в качестве транспортеров различных макромолекул, в том числе интерферирующих РНК, через плазматическую мембрану [130, 131]. Первыми обнаруженными CPP были белки TAT ВИЧ-1, INF-1 и INF-7 вируса гриппа [116]. Несмотря на небольшой размер (5–40 аминокислотных остатков), CPP могут переносить вещества, молекулярная масса которых более чем в 100 раз превышает их собственную [132]. Наиболее изученными CPP являются основной белок TAT ВИЧ-1 и полиаргинин, поскольку в образовании комплекса с siРНК принимают участие основные аминокислоты – аргинин и лизин [133]. Аргинин содержит гуанидиновую группу на конце бокового радикала, которая связывается с клеточной поверхностью посредством ионных взаимодействий [134]. CPP имеют низкий уровень цитотоксичности в концентрациях, используемых для доставки макромолекул [118, 135].

В настоящее время для использования CPP в качестве транспортера интерферирующих РНК в клетки мишени применяют два подхода [131]. Первый основан на образовании ковалентной связи CPP с siРНК [136]. Ковалентная связь между siРНК и CPP устанавливается через дисульфидную или, реже, тиоэфирную связь, которая разрушается в цитоплазме клетки [137]. Необходимо отметить, что использование этой стратегии может приводить к снижению эффективности действия siРНК из-за неполной диссоциации комплекса CPP-siРНК [131].

Успешное применение CPP пептида и транспортера, ковалентно связанных с siРНК, направленной против мРНК *GFP*, *in vitro* описано А. Muratovska

и соавт. Трансфекция конъюгатов CPP-siРНК в клетки линии СНО (клетки яичника китайского хомяка), экспрессирующие *GFP*, приводила к снижению уровня флуоресценции *GFP* на 53 и 63% соответственно. При использовании Lipofectamine 2000 (Invitrogen) флуоресценция снижалась лишь на 36% [138]. Недавно наночастицы CPP, содержащие пенетратин и ТАТ, прошли испытания *in vivo*. siРНК, направленная против мРНК р38 MAP-киназы (этот белок участвует в развитии различных воспалительных реакций), была ковалентно соединена с одним из следующих носителей: ТАТ, пенетратином или холестеринном. После инкубации комплексов с фибробластами мыши уровень экспрессии р38 MAP-киназы снижался на 20–36%. Однако после внутритрахеального введения этих комплексов мышам не было выявлено существенных изменений экспрессии р38 MAP-киназы. Кроме того, комплексы пенетратин · siРНК вызывали повышение уровня иммунных маркеров $TNF\alpha$ и $IL12$. Таким образом, можно предположить, что CPP могут активировать иммунный ответ [118, 139].

Другой подход основан на формировании комплексов CPP с siРНК путем электростатических взаимодействий, при которых положительно заряженные CPP связываются с отрицательно заряженными siРНК [140, 141]. В результате образуется очень стабильный комплекс, в котором siРНК надежно защищена от деградации нуклеазами сыворотки крови [131]. Однако при таком подходе существует риск нейтрализации положительного заряда CPP при электростатических взаимодействиях с siРНК и, как следствие, невозможным становится связывание CPP с плазматической мембраной и последующее поглощение комплекса CPP-siРНК [142, 143]. Примером использования «нековалентного» метода образования наночастиц CPP-siРНК может служить работа J. Noyer и соавт. [144]. Они синтезировали разветвленные производные укороченной формы кальцитонина человека и оценили их эффективность в качестве средства доставки siРНК, направленной против мРНК гена рецептора $NPY Y_1$ человека. Данный рецептор относят к семейству рецепторов, сопряженных с G-белками, экспрессия которых повышается при различных системных заболеваниях. Так, например, снижение уровня экспрессии гена рецептора $NPY Y_1$ рассматривается как одно из потенциальных направлений терапии остеопороза. Показано, что CPP эффективно переносят siРНК в клетки линии НЕК293, не проявляя при этом признаков цитотоксичности. Снижение уровня экспрессии целевого гена было сопоставимым с результатами, полученными при липофекции.

L. Johnson и соавт. описали пептид POD (peptide for ocular delivery) – CPP, предназначенный для до-

ставки макромолекул в ткани глаза. POD успешно применили для транспортировки анти-*GFP*-siРНК в культивируемые эмбриональные клетки сетчатки человека, в которых эктопически экспрессируется *GFP*. Экспрессия трансгенного *GFP* снижалась при этом более чем на 50%. Показано также, что POD может эффективно доставлять квантовые точки в ткани глаза *in vitro* и *in vivo* [145].

Неорганические наночастицы, применяемые для доставки siРНК

Неорганические наноматериалы – углеродные нанотрубки, квантовые точки, наночастицы золота и др. – представляют собой альтернативные средства доставки интерферирующих РНК [146–149]. Такие наночастицы отличаются от органических структурой, размерами, физическими и химическими свойствами, также они легко поддаются функционализации. Эти материалы воспроизводят структурные свойства высокомолекулярных полимеров, обладая при этом малой молекулярной массой [150].

Углеродные нанотрубки (УНТ) представляют собой линейные протяженные цилиндрические слои графена. Однослойные углеродные нанотрубки состоят из одного слоя графена, а многослойные – из нескольких концентрических однослойных нанотрубок. Диаметр однослойной нанотрубки не превышает 0.4 нм, тогда как у многослойной он может составлять около 100 нм. Длина этих структур, как правило, варьирует от сотен нанометров до нескольких десятков микрометров. Уникальной особенностью углеродных нанотрубок является графеновый слой, который может быть легко модифицирован различными биомолекулами. Формирование комплексов УНТ siРНК возможно путем образования ковалентной или нековалентной связи. Углеродные нанотрубки нетоксичны для клеток млекопитающих, так как могут проходить через клеточную мембрану эндоцитоз-независимым способом, не нарушая при этом ее целостности [146, 151].

I.B. Neagoe и соавт. сравнили эффективность однослойных УНТ и коммерческого трансфекционного агента siPORT NeoFX фирмы Ambion для доставки siРНК, направленных против мРНК генов *TNF* и *VEGF*, *in vitro*. Уровень экспрессии (в процентах от исходного) составил 53.7% для *VEGF* и 56.7% для *TNF α* при использовании siPORT NeoFX, и 47.7 и 46.5% при использовании однослойных УНТ соответственно [152].

X. Wang и соавт. показали, что УНТ, модифицированные аммонием, могут связывать siРНК, направленную против мРНК циклина A2, путем электростатических взаимодействий. Введение комплексов УНТ-антициклин A2-siРНК в клетки линии K526

(эритролейкоз человека) приводило к торможению роста и гибели клеток [153].

Квантовые точки (КТ) представляют собой коллоидные наночастицы полупроводников [147]. Как правило, КТ используют в качестве флуоресцентных зондов из-за отличительных физико-химических свойств, которые позволяют им преодолевать ограничения флуоресцентных белков и органических красителей. Эти наночастицы имеют широкую полосу возбуждения, что позволяет возбуждать нанокристаллы разных цветов одним источником излучения, и узкие симметричные пики флуоресценции. Также КТ обладают высокой фотостабильностью [154]. Они могут использоваться в качестве эффективных средств доставки терапевтических олигонуклеотидов. Например, КТ успешно применили для одновременной визуализации и доставки малых интерферирующих РНК с целью избирательного подавления экспрессии гена рецептора эпидермального фактора роста III в клетках линии U87 (клетки глиобластомы человека) [155].

Основное ограничение для возможного клинического использования КТ в качестве флуоресцентных зондов и средств доставки – их высокая цитотоксичность, поскольку большинство КТ содержат высокотоксичные кадмий (Cd), селен (Se) или теллур (Te) [156]. Из-за этого применение КТ в настоящее время ограничено, в основном, исследованиями *in vitro*.

Для решения проблемы токсичности W.B. Tan и соавт. поместили КТ в наночастицы на основе хитозана и использовали такие конъюгаты в качестве носителей siРНК, направленной против mРНК гена рецептора эпидермального фактора роста *HER2/neu* человека. Процесс доставки siРНК в клетки контролировали методами цитофлуориметрии. При этом было достигнуто значительное подавление экспрессии гена *HER2/neu* человека [157].

M.V. Yezhelyev и соавт. разработали КТ с полимерным покрытием, поглощающим протоны (протонной губкой) [158]. Сбалансированный состав положительно и отрицательно заряженных функциональных групп, таких, как карбоновые кислоты и третичные амины, на поверхности КТ позволяет использовать подобные наночастицы для эффективной и безопасной доставки siРНК. КТ, покрытые слоем протонной губки, в 10–20 раз увеличивали эффективность подавления экспрессии гена циклофилина B, а их цитотоксичность на линии клеток MDA-MB231 (рак молочной железы) снизилась в 5–6 раз по сравнению с Lipofectamine 2000 (Invitrogen), TransITTKO (Mirus Bio Corp.) и JetPEI (Qbiogene). Кроме того, комплексы КТ-siРНК обладают равной эффективностью трансфекции как без, так и в присутствии сыворотки в культуральной среде, в то время как другие

трансфекционные агенты нуждаются в отсутствии сыворотки для достижения наилучших результатов. Поглощение таких наночастиц клетками можно наблюдать в реальном времени за счет флуоресцентного сигнала КТ. Установить локализацию комплексов в различных компартментах клетки можно с помощью электронной микроскопии, детектируя наличие полупроводников [158].

Недавно был получен новый вид квантовых точек (I-III-VI₂): AgInS₂, CuInS₂ и ZnS·AgInS₂. P. Subramaniam и соавт. синтезировали библиотеку квантовых точек типа Zn_xS·Ag_yIn_{1-y}S₂ (ZAIS) с изменяемыми физическими свойствами (фотолюминесценцией). Показано, что ZAIS обладают гораздо меньшей цитотоксичностью по сравнению со своими аналогами, а также могут использоваться в качестве многофункциональных наночастиц для одновременной визуализации и доставки siРНК в клетки глиобластомы линии U87 [159].

Наночастицы золота имеют уникальные химические и физические свойства, необходимые для транспортировки олигонуклеотидов. Они практически инертны и нетоксичны, а их размер колеблется от 1 до 150 нм [148].

S.T. Kim и соавт. оценили эффективность подавления экспрессии гена β-галактозидазы (*β-gal*) на линии эндотелиальных клеток SVR-bag4 с помощью РНК-интерференции. В качестве системы доставки использовали синтезированные ими наночастицы, которые состояли из золотого ядра (2 нм в диаметре) и полимерных дендронов с концевыми триэтилентетраминами. Дендроны, несущие положительный заряд, связывались с отрицательно заряженной siРНК посредством электростатических взаимодействий. Была выявлена зависимость величины снижения экспрессии *β-gal* от соотношения НЧ : siРНК; максимальное снижение уровня экспрессии *β-gal* составило 48% при соотношении НЧ : siРНК = 2. Эффективность трансфекции наночастицами золота была сравнима с эффективностью Lipofectamine 2000 (Invitrogen) [160].

Альтернативная классификация нановекторов

Доза и биологическая активность вещества, переносимого НЧ, зависит от нескольких факторов: кинетики связывания с клеточной поверхностью и интернализации, внутриклеточного процессинга и окончательной локализации НЧ, а также стадии клеточного цикла. Кинетика связывания с клеточной поверхностью и интернализация зависят от размера, формы, заряда и биологической активности НЧ. Наночастицы при делении клеток распределяются случайным и неравномерным образом, следовательно, концентрация наночастиц в каждой дочер-

ней клетке может быть различной. Метаболический путь НЧ и ее окончательное местоположение внутри клетки обуславливают величину дозы доставляемого вещества и его биологическую активность [161, 162].

Среди огромного разнообразия систем доставки, имеющих различный состав, геометрию и модификации поверхности, на основе их функций и возможностей можно выделить три основные категории.

Первое поколение нановекторов представлено наиболее простыми наночастицами, которые доставляются к сайтам-мишеням пассивно. В опухолевые клетки такие векторы попадают с помощью усиленного эффекта проникновения и удержания (EPR) – переноса веществ из кровеносных сосудов в ткань опухоли и их накопления [163].

Более сложные, чем их предшественники, нановекторы второго поколения представляют собой прогрессивное развитие первого. Эти системы доставки отличает наличие дополнительных функций: связывание с сайтом-мишенью в результате специфического взаимодействия лигандов и рецепторов, уникальных или сверхэкспрессированных в опухолевой ткани; совместная доставка нескольких терапевтических агентов и контролируемое высвобождение переносимых веществ [163].

Третье поколение нановекторов представлено многокомпонентными системами. Поскольку ни один агент не может самостоятельно преодолеть множество барьеров на пути к мРНК-мишени, эти системы состоят из наночастиц с различными свойствами, помещенных в один нановектор. Такие носители, или Logic Embedded Vectors (логические вложенные векторы) [164], представляют собой терапевтические многокомпонентные конструкции, в которых функции биологического распознавания и прохождения через биологические барьеры выполняют различные составляющие нановектора, что позволяет добиться более эффективной и избирательной доставки. В качестве примера такой терапевтической стратегии можно представить вектор, который проходит через кровеносную систему благодаря своей геометрии, связывается со стенкой капилляра в пораженной области вследствие специфических поверхностных взаимодействий и высвобождает различные наночастицы, которые синергично проникают из сосудов в ткань, достигают клеток-мишеней и доставляют терапевтические агенты в оптимальных концентрациях с минимальными побочными эффектами [163].

Представителем третьего поколения наночастиц являются биологически активные молекулярные сети под названием «nanoshuttles» (наночелноки), состоящие из бактериофагов, соединенных с наноча-

стицами золота. Nanoshuttles сочетают способность к гипертермической реакции наночастиц золота под воздействием ближнего инфракрасного или радиочастотного излучения с возможностями направленной доставки веществ [165].

Другой пример третьего поколения наносистем доставки – наночастицы, известные как «nanocells». Nanocells были разработаны с целью применения в области комбинированной химиотерапии. Внешняя оболочка этих нановекторов представляет собой липидные наночастицы, а внутреннее ядро состоит из полимерных наночастиц [166].

Наночастицы кремния и силикона также относятся к третьему поколению нановекторов. Наночастицы на основе среднепористого кремния успешно применили для совместной доставки доксорубина и siРНК, направленной против мРНК гена *bcl-2*. Доксорубин находился внутри пор кремния, а анти-*bcl-2*-siРНК была связана с дендримерной оболочкой. Целью разработки этого нановектора была одновременная доставка противоопухолевого препарата (для индукции апоптоза опухолевых клеток) и молекул анти-*bcl-2*-siРНК (для супрессии ионных насосов, которые опосредуют возникновение множественной лекарственной устойчивости). В результате наблюдалось значительное повышение цитотоксичности доксорубина вследствие уменьшения IC_{50} (концентрации полумаксимального ингибирования) в 64 раза [167].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология интерферирующих РНК открывает большие перспективы для лечения различных заболеваний человека путем направленного снижения уровня экспрессии генов. Некоторые терапевтические средства, основанные на принципе РНК-интерференции, уже проходят клинические испытания. Дальнейшее развитие этого направления терапии зависит от разработки безопасных и эффективных носителей для системной доставки siРНК. В целом эффективность трансфекции невирусных транспортных агентов по-прежнему ниже, чем вирусных векторов. Необходимы дальнейшие усовершенствования, направленные на повышение эффективности и снижение токсичности невирусных систем доставки.

В данном обзоре мы постарались ознакомить читателя с существующими на сегодняшний день невирусными методами доставки интерферирующих РНК, а также с проблемами, стоящими на пути внедрения этих технологий в медицину. Для более подробного изучения каждой из представленных систем мы предлагаем обратиться к работам [74–76, 88, 97, 98, 108, 113, 134, 149]. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Milhavel O., Gary D.S., Mattson M.P. // *Pharmacol. Rev.* 2003. V. 55. № 4. P. 629–648.
2. Burnett J.C., Rossi J.J. // *Chem. Biol.* 2012. V. 19. № 1. P. 60–71.
3. Vilgelm A.E., Chumakov S.P., Prassolov V.S. // *Mol. Biol.* 2006. V. 40. № 3. P. 339–354.
4. Shrivastava N., Srivastava A. // *Biotechnol. J.* 2008. V. 3. № 3. P. 339–353.
5. Scherr M., Morgan M.A., Eder M. // *Curr. Med. Chem.* 2003. V. 10. № 3. P. 245–256.
6. Lima W.F., Murray H., Nichols J.G., Wu H., Sun H., Prakash T.P., Berdeja A.R., Gaus H.J., Croke S.T. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 4. P. 2535–2548.
7. Ma J.B., Ye K., Patel D.J. // *Nature.* 2004. V. 429. № 6989. P. 318–322.
8. Macrae I.J., Zhou K., Li F., Repic A., Brooks A.N., Cande W.Z., Adams P.D., Doudna J.A. // *Science.* 2006. V. 311. № 5758. P. 195–198.
9. Zhang H., Kolb F.A., Jaskiewicz L., Westhof E., Filipowicz W. // *Cell.* 2004. V. 118. № 1. P. 57–68.
10. Kim V.N., Han J., Siomi M.C. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. V. 10. № 2. P. 126–139.
11. Hammond S.M. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. № 26. P. 5822–5829.
12. Lee Y.S., Nakahara K., Pham J.W., Kim K., He Z., Sontheimer E.J., Carthew R.W. // *Cell.* 2004. V. 117. № 1. P. 69–81.
13. Wang Y., Juranek S., Li H., Sheng G., Tuschl T., Patel D.J. // *Nature.* 2008. V. 456. № 7224. P. 921–926.
14. MacRae I.J., Ma E., Zhou M., Robinson C.V., Doudna J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 2. P. 512–517.
15. Miyoshi K., Okada T.N., Siomi H., Siomi M.C. // *RNA.* 2009. V. 15. № 7. P. 1282–1291.
16. Wang Y., Juranek S., Li H., Sheng G., Wardle G.S., Tuschl T., Patel D.J. // *Nature.* 2009. V. 461. № 7265. P. 754–761.
17. Nowotny M., Yang W. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2009. V. 19. № 3. P. 286–293.
18. Birney E., Stamatoyannopoulos J.A., Dutta A., Guigo R., Gingeras T.R., Margulies E.H., Weng Z., Snyder M., Dermitzakis E.T., Thurman R.E., et al. // *Nature.* 2007. V. 447. № 7146. P. 799–816.
19. Carthew R.W., Sontheimer E.J. // *Cell.* 2009. V. 136. № 4. P. 642–655.
20. Титов И.И., Ворожейкин П.С. // *Вавиловский журн. генетики и селекции.* 2011. Т. 15. № 1. С. 139–147.
21. Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. // *Биохимия.* 2007. Т. 72. № 11. С. 1427–1448.
22. Yekta S., Shih I.H., Bartel D.P. // *Science.* 2004. V. 304. № 5670. P. 594–596.
23. Amers S.L., Martinez J., Schroeder R. // *Cell.* 2007. V. 130. № 1. P. 101–112.
24. Selbach M., Schwanhauser B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R., Rajewsky N. // *Nature.* 2008. V. 455. № 7209. P. 58–63.
25. Kawakami S., Hashida M. // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 2007. V. 22. № 3. P. 142–151.
26. Watts J.K., Deleavey G.F., Damha M.J. // *Drug Discovery Today.* 2008. V. 13. № 19–20. P. 842–855.
27. Hartmann G. // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. № 3. P. 438–442.
28. Fang J., Sawa T., Maeda H. // *Adv. Exp. Med. Biology.* 2003. V. 519. P. 29–49.
29. Zamecnik J., Vargova L., Homola A., Kodet R., Sykova E. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2004. V. 30. № 4. P. 338–350.
30. Singh S., Narang A.S., Mahato R.I. // *Pharmaceut. Res.* 2011. V. 28. № 12. P. 2996–3015.
31. Perez-Martinez F.C., Guerra J., Posadas I., Cena V. // *Pharmaceut. Res.* 2011. V. 28. № 8. P. 1843–1858.
32. Arias J.L., Clares B., Morales M.E., Gallardo V., Ruiz M.A. // *Curr. Drug Targets.* 2011. V. 12. № 8. P. 1151–1165.
33. Leucuta S.E. // *Curr. Clin. Pharmacol.* 2012. V. 7. № 4. P. 282–317.
34. Khatra N., Rathi M., Baradia D., Trehan S., Misra A. // *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems.* 2012. V. 29. № 6. P. 487–527.
35. Sakurai Y., Hatakeyama H., Sato Y., Akita H., Takayama K., Kobayashi S., Futaki S., Harashima H. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. № 24. P. 5733–5742.
36. Duan J., Zhang Y., Chen W., Shen C., Liao M., Pan Y., Wang J., Deng X., Zhao J. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2009. V. 2009. P. 149–254.
37. Pack D.W., Hoffman A.S., Pun S., Stayton P.S. // *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2005. V. 4. № 7. P. 581–593.
38. Sonawane N.D., Szoka F.C., Jr., Verkman A.S. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 45. P. 44826–44831.
39. Eliyahu H., Barenholz Y., Domb A.J. // *Molecules.* 2005. V. 10. № 1. P. 34–64.
40. Nguyen J., Szoka F.C. // *Accounts Chem. Res.* 2012. V. 45. № 7. P. 1153–1162.
41. Zelphati O., Szoka F.C., Jr. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 21. P. 11493–11498.
42. Hafez I.M., Maurer N., Cullis P.R. // *Gene Therapy.* 2001. V. 8. № 15. P. 1188–1196.
43. Chu C.Y., Rana T.M. // *RNA.* 2008. V. 14. № 9. P. 1714–1719.
44. Zou Y., Tiller P., Chen I.W., Beverly M., Hochman J. // *Rapid Comm. Mass Spectrometry: RCM.* 2008. V. 22. № 12. P. 1871–1881.
45. Bramsen J.B., Kjems J. // *Meth. Mol. Biol.* 2011. V. 721. P. 77–103.
46. Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A. // *Curr. Opin. Mol. Therapeutics.* 2010. V. 12. № 2. P. 158–167.
47. Rose S.D., Kim D.H., Amarzguiou J., Heidel J.D., Collingwood M.A., Davis M.E., Rossi J.J., Behlke M.A. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 13. P. 4140–4156.
48. Dore-Savard L., Roussy G., Dansereau M.A., Collingwood M.A., Lennox K.A., Rose S.D., Beaudet N., Behlke M.A., Sarret P. // *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* 2008. V. 16. № 7. P. 1331–1339.
49. Deleavey G.F., Watts J.K., Damha M.J. // *Curr. Prot. Nucl. Acids Chem.* 2009. Suppl. 39. P. 16.3.1–16.3.22.
50. Phelps K., Morris A., Beal P.A. // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. № 1. P. 100–109.
51. Detzer A., Sczakiel G. // *Curr. Topics Med. Chem.* 2009. V. 9. № 12. P. 1109–1116.
52. Mescalchin A., Detzer A., Wecke M., Overhoff M., Wunsche W., Sczakiel G. // *Expert. Opinion Biol. Therapy.* 2007. V. 7. № 10. P. 1531–1538.
53. Harborth J., Elbashir S.M., Vandenberg K., Manninga H., Scaringe S.A., Weber K., Tuschl T. // *Antisense Nucl. Acid Drug Devel.* 2003. V. 13. № 2. P. 83–105.
54. Li Z.Y., Mao H., Kallick D.A., Gorenstein D.G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 329. № 3. P. 1026–1030.
55. Prakash T.P., Allerson C.R., Dande P., Vickers T.A., Sioufi N., Jarres R., Baker B.F., Swayze E.E., Griffey R.H., Bhat B. // *J. Med. Chem.* 2005. V. 48. № 13. P. 4247–4253.
56. Gaglione M., Messere A. // *Mini Rev. Med. Chem.* 2010. V. 10. № 7. P. 578–595.
57. Kraynack B.A., Baker B.F. // *RNA.* 2006. V. 12. № 1. P. 163–176.
58. Pallan P.S., Greene E.M., Jicman P.A., Pandey R.K., Manoharan M., Rozners E., Egli M. // *Nucl. Acids Res.* 2011.

- V. 39. № 8. P. 3482–3495.
59. Allerson C.R., Sioufi N., Jarres R., Prakash T.P., Naik N., Berdeja A., Wanders L., Griffey R.H., Swayze E.E., Bhat B. // *J. Med. Chem.* 2005. V. 48. № 4. P. 901–904.
 60. Muhonen P., Tennila T., Azhayeve E., Parthasarathy R.N., Janckila A.J., Vaananen H.K., Azhayeve A., Laitala-Leinonen T. // *Chem. Biodiversity*. 2007. V. 4. № 5. P. 858–873.
 61. Morrissey D.V., Lockridge J.A., Shaw L., Blanchard K., Jensen K., Breen W., Hartsough K., Machemer L., Radka S., Jadhav V., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. № 8. P. 1002–1007.
 62. Ferrari N., Bergeron D., Tedeschi A.L., Mangos M.M., Paquet L., Renzi P.M., Damha M.J. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. V. 1082. P. 91–102.
 63. Dowler T., Bergeron D., Tedeschi A.L., Paquet L., Ferrari N., Damha M.J. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № 6. P. 1669–1675.
 64. Watts J.K., Choubdar N., Sadalpure K., Robert F., Wahba A.S., Pelletier J., Pinto B.M., Damha M.J. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 5. P. 1441–1451.
 65. Lima W.F., Wu H., Nichols J.G., Sun H., Murray H.M., Crooke S.T. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 38. P. 26017–26028.
 66. Vickers T.A., Zhang H., Graham M.J., Lemonidis K.M., Zhao C., Dean N.M. // *J. Immunol.* 2006. V. 176. № 6. P. 3652–3661.
 67. Moschos S.A., Frick M., Taylor B., Turnpenny P., Graves H., Spink K.G., Brady K., Lamb D., Collins D., Rockel T.D., et al. // *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy*. 2011. V. 19. № 12. P. 2163–2168.
 68. Elmen J., Thonberg H., Ljungberg K., Frieden M., Westergaard M., Xu Y., Wahren B., Liang Z., Orum H., Koch T., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 1. P. 439–447.
 69. Mook O.R., Baas F., de Wissel M.B., Fluiter K. // *Mol. Cancer Therapeut.* 2007. V. 6. № 3. P. 833–843.
 70. Swayze E.E., Siwkowski A.M., Wancewicz E.V., Migawa M.T., Wyrzykiewicz T.K., Hung G., Monia B.P., Bennett C.F. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 2. P. 687–700.
 71. Hoffmann S., Hoos J., Klussmann S., Vonhoff S. // *Curr. Prot. Nucl. Acids Chem.* 2011. Suppl. 46. P. 4.46.1–4.46.30.
 72. Luo D., Saltzman W.M. // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. № 8. P. 893–895.
 73. Paulo C.S., Pires das Neves R., Ferreira L.S. // *Nanotechnology*. 2011. V. 22. № 49. P. 494002.
 74. Jafari M., Soltani M., Naahidi S., Karunaratne D.N., Chen P. // *Curr. Med. Chem.* 2012. V. 19. № 2. P. 197–208.
 75. Xing J., Deng L., Guo S., Dong A., Liang X.J. // *Mini Rev. Med. Chem.* 2010. V. 10. № 2. P. 126–137.
 76. Tros de Ilarduya C., Sun Y., Duzgunes N. // *Eur. J. Pharmaceut. Sci.: Official J. Eur. Fed. Pharmaceut. Sci.* 2010. V. 40. № 3. P. 159–170.
 77. Jere D., Jiang H.L., Arote R., Kim Y.K., Choi Y.J., Cho M.H., Akaike T., Cho C.S. // *Expert Opin. Drug Delivery*. 2009. V. 6. № 8. P. 827–834.
 78. Nimesh S. // *Curr. Clin. Pharm.* 2012. V. 7. № 2. P. 121–130.
 79. Singha K., Namgung R., Kim W.J. // *Nucl. Acid Therapeut.* 2011. V. 21. № 3. P. 133–147.
 80. Hong S., Leroueil P.R., Janus E.K., Peters J.L., Kober M.M., Islam M.T., Orr B.G., Baker J.R., Jr., Banaszak Holl M.M. // *Bioconjugate Chem.* 2006. V. 17. № 3. P. 728–734.
 81. Wightman L., Kircheis R., Rossler V., Carotta S., Ruzicka R., Kurasa M., Wagner E. // *J. Gene Med.* 2001. V. 3. № 4. P. 362–372.
 82. Luten J., van Nostrum C.F., De Smedt S.C., Hennink W.E. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2008. V. 126. № 2. P. 97–110.
 83. Gary D.J., Puri N., Won Y.Y. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2007. V. 121. № 1–2. P. 64–73.
 84. Cun D., Foged C., Yang M., Frokjaer S., Nielsen H.M. // *Internat. J. Pharmaceut.* 2010. V. 390. № 1. P. 70–75.
 85. Presumey J., Salzano G., Courties G., Shires M., Ponchel F., Jorgensen C., Apparailly F., De Rosa G. // *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.: Official J. Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2012. V. 82. № 3. P. 457–464.
 86. Steinbach J.M., Weller C.E., Booth C.J., Saltzman W.M. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2012. V. 162. № 1. P. 102–110.
 87. Svenson S., Tomalia D.A. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2005. V. 57. № 15. P. 2106–2129.
 88. Quadir M.A., Haag R. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2012. V. 161. № 2. P. 484–495.
 89. Morgan M.T., Nakanishi Y., Kroll D.J., Griset A.P., Carnahan M.A., Wathier M., Oberlies N.H., Manikumar G., Wani M.C., Grinstaff M.W. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 24. P. 11913–11921.
 90. Dufes C., Uchegbu I.F., Schatzlein A.G. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2005. V. 57. № 15. P. 2177–2202.
 91. Tomalia D.A., Reyna L.A., Svenson S. // *Biochem. Soc. Transactions*. 2007. V. 35. Pt 1. P. 61–67.
 92. Wang Y., Li Z., Han Y., Liang L.H., Ji A. // *Curr. Drug Metabolism*. 2010. V. 11. № 2. P. 182–196.
 93. Minko T., Patil M.L., Zhang M., Khandare J.J., Saad M., Chandna P., Taratula O. // *Meth. Mol. Biol.* 2010. V. 624. P. 281–294.
 94. Kim I.D., Lim C.M., Kim J.B., Nam H.Y., Nam K., Kim S.W., Park J.S., Lee J.K. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2010. V. 142. № 3. P. 422–430.
 95. Tang Y., Li Y.B., Wang B., Lin R.Y., van Dongen M., Zurcher D.M., Gu X.Y., Banaszak Holl M.M., Liu G., Qi R. // *Mol. Pharmaceut.* 2012. V. 9. № 6. P. 1812–1821.
 96. Taratula O., Garbuzenko O.B., Kirkpatrick P., Pandya I., Savla R., Pozharov V.P., He H., Minko T. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2009. V. 140. № 3. P. 284–293.
 97. Rudzinski W.E., Aminabhavi T.M. // *Internat. J. Pharmaceut.* 2010. V. 399. № 1–2. P. 1–11.
 98. Saranya N., Moorthi A., Saravanan S., Devi M.P., Selvamurugan N. // *Internat. J. Biol. Macromolecules*. 2011. V. 48. № 2. P. 234–238.
 99. Alameh M., Dejesus D., Jean M., Darras V., Thibault M., Lavertu M., Buschmann M.D., Merzouki A. // *Internat. J. Nanomed.* 2012. V. 7. P. 1399–1414.
 100. Katas H., Alpar H.O. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2006. V. 115. № 2. P. 216–225.
 101. 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., et al. // *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy*. 2006. V. 14. № 4. P. 476–484.
 102. Nielsen E.J., Nielsen J.M., Becker D., Karlas A., Prakash H., Glud S.Z., Merrison J., Besenbacher F., Meyer T.F., Kjems J., et al. // *Pharmaceut. Res.* 2010. V. 27. № 12. P. 2520–2527.
 103. Howard K.A., Paludan S.R., Behlke M.A., Besenbacher F., Deleuran B., Kjems J. // *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy*. 2009. V. 17. № 1. P. 162–168.
 104. Tripathi S.K., Goyal R., Kashyap M.P., Pant A.B., Haq W., Kumar P., Gupta K.C. // *Biomaterials*. 2012. V. 33. № 16. P. 4204–4219.
 105. Lee D.W., Yun K.S., Ban H.S., Choe W., Lee S.K., Lee K.Y. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc.* 2009. V. 139. № 2. P. 146–152.
 106. Ji A.M., Su D., Che O., Li W.S., Sun L., Zhang Z.Y., Yang B., Xu F. // *Nanotechnology*. 2009. V. 20. № 40. P. 405103.
 107. Pille J.Y., Li H., Blot E., Bertrand J.R., Pritchard L.L., Opolon

- P., Maksimenko A., Lu H., Vannier J.P., Soria J., et al. // *Hum. Gene Therapy*. 2006. V. 17. № 10. P. 1019–1026.
108. O'Mahony A.M., Godinho B.M., Ogier J., Devocelle M., Darcy R., Cryan J.F., O'Driscoll C.M. // *ACS Chem. Neurosci*. 2012. V. 3. № 10. P. 744–752.
109. Alabi C., Vegas A., Anderson D. // *Curr. Opin. Pharmacol*. 2012. V. 12. № 4. P. 427–433.
110. Hu-Lieskovan S., Heidel J.D., Bartlett D.W., Davis M.E., Triche T.J. // *Cancer Res*. 2005. V. 65. № 19. P. 8984–8992.
111. Davis M.E., Zuckerman J.E., Choi C.H., Seligson D., Tolcher A., Alabi C.A., Yen Y., Heidel J.D., Ribas A. // *Nature*. 2010. V. 464. № 7291. P. 1067–1070.
112. Heidel J.D., Yu Z., Liu J.Y., Rele S.M., Liang Y., Zeidan R.K., Kornbrust D.J., Davis M.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 14. P. 5715–5721.
113. Zhang S., Zhi D., Huang L. // *J. Drug Targeting*. 2012. V. 20. № 9. P. 724–735.
114. DeLong R.K., Risor A., Kanomata M., Laymon A., Jones B., Zimmerman S.D., Williams J., Witkowski C., Warner M., Ruff M., et al. // *Nanomedicine (Lond.)*. 2012. V. 7. № 12. P. 1851–1862.
115. Gavrilov K., Saltzman W.M. // *Yale J. Biol. Med*. 2012. V. 85. № 2. P. 187–200.
116. Aliabadi H.M., Landry B., Sun C., Tang T., Uludag H. // *Biomaterials*. 2012. V. 33. № 8. P. 2546–2569.
117. Northfelt D.W., Dezube B.J., Thommes J.A., Levine R., von Roenn J.H., Dosik G.M., Rios A., Krown S.E., DuMond C., Mamelok R.D. // *J. Clin. Oncol.: Official J. Am. Soc. Clin. Oncol*. 1997. V. 15. № 2. P. 653–659.
118. Gooding M., Browne L.P., Quinteiro F.M., Selwood D.L. // *Chem. Biol. Drug Design*. 2012. V. 80. № 6. P. 787–809.
119. Venturini M., Bighin C., Puglisi F., Olmeo N., Aitini E., Colucci G., Garrone O., Paccagnella A., Marini G., Crino L., et al. // *Breast*. 2010. V. 19. № 5. P. 333–338.
120. Landen C.N., Jr., Chavez-Reyes A., Bucana C., Schmandt R., Deavers M.T., Lopez-Berestein G., Sood A.K. // *Cancer Res*. 2005. V. 65. № 15. P. 6910–6918.
121. Kang S.H., Cho H.J., Shim G., Lee S., Kim S.H., Choi H.G., Kim C.W., Oh Y.K. // *Pharmaceut. Res*. 2011. V. 28. № 12. P. 3069–3078.
122. Briane D., Slimani H., Tagounits A., Naejus R., Haddad O., Coudert R., Charnaux N., Cao A. // *J. Drug Targeting*. 2012. V. 20. № 4. P. 347–354.
123. Un K., Kawakami S., Higuchi Y., Suzuki R., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc*. 2011. V. 156. № 3. P. 355–363.
124. Un K., Kawakami S., Suzuki R., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. // *Biomaterials*. 2010. V. 31. № 30. P. 7813–7826.
125. Un K., Kawakami S., Suzuki R., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. // *Mol. Pharmaceut*. 2011. V. 8. № 2. P. 543–554.
126. Un K., Kawakami S., Yoshida M., Higuchi Y., Suzuki R., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. // *Hepatology*. 2012. V. 56. № 1. P. 259–269.
127. Wu S.Y., McMillan N.A. // *AAPS J*. 2009. V. 11. № 4. P. 639–652.
128. Zimmermann T.S., Lee A.C., Akinc A., Brاملage B., Bumcrot D., Fedoruk M.N., Harborth J., Heyes J.A., Jeffs L.B., John M., et al. // *Nature*. 2006. V. 441. № 7089. P. 111–114.
129. Laufer S.D., Restle T. // *Curr. Pharmaceut. Design*. 2008. V. 14. № 34. P. 3637–3655.
130. Herce H.D., Garcia A.E. // *J. Biol. Physics*. 2007. V. 33. № 5–6. P. 345–356.
131. Fonseca S.B., Pereira M.P., Kelley S.O. // *Adv. Drug Delivery Rev*. 2009. V. 61. № 11. P. 953–964.
132. Sebbage V. // *Biosci. Horizons*. 2009. V. 2. № 1. P. 64–72.
133. Stewart K.M., Horton K.L., Kelley S.O. // *Organic Biomol. Chem*. 2008. V. 6. № 13. P. 2242–2255.
134. Trabulo S., Cardoso A.L., Mano M., De Lima M.C.P. // *Pharmaceuticals*. 2010. V. 3. № 4. P. 961–993.
135. Vives E., Schmidt J., Pelegrin A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1786. № 2. P. 126–138.
136. Finstad C.L., Wang C.Y., Kowalski J., Zhang M., Li M.L., Li X.M., Xia W.G., Bosland M.C., Murthy K.K., Walfield A.M., et al. // *Vaccine*. 2004. V. 22. № 9–10. P. 1300–1313.
137. Pooga M., Langel U. // *Meth. Mol. Biol*. 2005. V. 298. P. 77–89.
138. Muratovska A., Eccles M.R. // *FEBS Lett*. 2004. V. 558. № 1–3. P. 63–68.
139. 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. // *Bioconjugate Chem*. 2007. V. 18. № 5. P. 1450–1459.
140. Morris M.C., Gros E., Aldrian-Herrada G., Choob M., Archdeacon J., Heitz F., Divita G. // *Nucl. Acids Res*. 2007. V. 35. № 7. P. e49.
141. Crombez L., Charnet A., Morris M.C., Aldrian-Herrada G., Heitz F., Divita G. // *Biochem. Soc. Transact*. 2007. V. 35. Pt 1. P. 44–46.
142. Liu B.R., Chou J.C., Lee H.J. // *J. Membrane Biol*. 2008. V. 222. № 1. P. 1–15.
143. Meade B.R., Dowdy S.F. // *Adv. Drug Delivery Rev*. 2008. V. 60. № 4–5. P. 530–536.
144. Hoyer J., Neundorff I. // *J. Controlled Release: Official J. Controlled Release Soc*. 2012. V. 161. № 3. P. 826–834.
145. Johnson L.N., Cashman S.M., Kumar-Singh R. // *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy*. 2008. V. 16. № 1. P. 107–114.
146. Cheung W., Pontoriero F., Taratula O., Chen A.M., He H. // *Adv. Drug Delivery Rev*. 2010. V. 62. № 6. P. 633–649.
147. Qi L., Gao X. // *ACS Nano*. 2008. V. 2. № 7. P. 1403–1410.
148. Boisselier E., Astruc D. // *Chem. Soc. Rev*. 2009. V. 38. № 6. P. 1759–1782.
149. Zhang S., Zhao Y., Zhi D. // *Bioorganic Chem*. 2012. V. 40. № 1. P. 10–18.
150. Son S.J., Bai X., Lee S.B. // *Drug Discovery Today*. 2007. V. 12. № 15–16. P. 650–656.
151. Liu G., Swierczewska M., Lee S., Chen X. // *Nano Today*. 2010. V. 5. № 6. P. 524–539.
152. Neagoe I.B., Braicu C., Matea C., Bele C., Florin G., Gabriel K., Veronica C., Irimie A. // *J. Biomed. Nanotechnol*. 2012. V. 8. № 4. P. 567–574.
153. Wang X., Ren J., Qu X. // *ChemMedChem*. 2008. V. 3. № 6. P. 940–945.
154. Gao J., Chen K., Xie R., Xie J., Yan Y., Cheng Z., Peng X., Chen X. // *Bioconjugate Chem*. 2010. V. 21. № 4. P. 604–609.
155. Jung J., Solanki A., Memoli K.A., Kamei K., Kim H., Drahl M.A., Williams L.J., Tseng H.R., Lee K. // *Angew Chem. Int. Ed. Engl*. 2010. V. 49. № 1. P. 103–107.
156. Bumcrot D., Manoharan M., Koteliansky V., Sah D.W. // *Nat. Chem. Biol*. 2006. V. 2. № 12. P. 711–719.
157. Tan W.B., Jiang S., Zhang Y. // *Biomaterials*. 2007. V. 28. № 8. P. 1565–1571.
158. Yezhelyev M.V., Qi L., O'Regan R.M., Nie S., Gao X. // *J. Am. Chem. Soc*. 2008. V. 130. № 28. P. 9006–9012.
159. Subramaniam P., Lee S.J., Shah S., Patel S., Starovoytov V., Lee K.B. // *Adv. Mater*. 2012. V. 24. № 29. P. 4014–4019.
160. Kim S.T., Chompoosor A., Yeh Y.C., Agasti S.S., Solfield D.J., Rotello V.M. // *Small*. 2012. V. 8. № 21. P. 3253–3256.
161. Duncan R. // *Curr. Opin. Biotechnol*. 2011. V. 22. № 4. P. 492–501.
162. Summers H.D., Rees P., Holton M.D., Brown M.R., Chappell

- S.C., Smith P.J., Errington R.J. // *Nat. Nanotechnol.* 2011. V. 6. № 3. P. 170–174.
163. Serda R.E., Godin B., Blanco E., Chiappini C., Ferrari M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1810. № 3. P. 317–329.
164. Ferrari M. // *Trends Biotechnol.* 2010. V. 28. № 4. P. 181–188.
165. Souza G.R., Christianson D.R., Staquicini F.I., Ozawa M.G., Snyder E.Y., Sidman R.L., Miller J.H., Arap W., Pasqualini R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 5. P. 1215–1220.
166. Sengupta S., Eavarone D., Capila I., Zhao G., Watson N., Kiziltepe T., Sasisekharan R. // *Nature.* 2005. V. 436. № 7050. P. 568–572.
167. Tasciotti E., Liu X., Bhavane R., Plant K., Leonard A.D., Price B.K., Cheng M.M., Decuzzi P., Tour J.M., Robertson F., et al. // *Nat. Nanotechnol.* 2008. V. 3. № 3. P. 151–157.