Współczesna Onkologia (2006) vol. 10; 8 (367–372)

Pomimo stosowania nowoczesnego leczenia chirurgicznego, radio- i chemioterapii wyniki leczenia nowotworów nadal są niezadowalające. Nowe nadzieje niesie inżynieria genetyczna i możliwość ingerencji w genom komórek nowotworowych w celu regulacji funkcji genów odpowiedzialnych za transformację i progresję guza. Odkrycie zjawiska interferencji RNA (RNAi) zapoczątkowało badania dotyczące hamowania ekspresji wybranych genów przez małe interferujące RNA (siRNA) w komórkach ssaków. Naturalne występowanie tego zjawiska w organizmach eukariotycznych zapewnia cząsteczce siRNA dużo większą efektywność i specyficzność w porównaniu z innymi metodami wyciszania, jak nukleotydy antysensowne i rybozymy. Pomimo istnienia technicznych wyzwań związanych ze specyficznością, syntezą i podawaniem siRNA, cząsteczka ta stwarza duże możliwości terapeutyczne w leczeniu tak skomplikowanych schorzeń, jak zaawansowane nowotwory.

Słowa kluczowe: terapia przeciwnowotworowa, wyciszanie genów, interferencja RNA (RNAi), krótkie interferujące RNA (siRNA).

Krótkie interferujące RNA w onkologii

Short interfering RNA in cancer therapy

Maria Majorek, Piotr Guzenda, Monika Lamparska-Przybysz, Maciej Wieczorek

Laboratorium Biologii Molekularnej, Dział Badawczo-Rozwojowy Celon Pharma Sp. z o.o.

Wstęp

Znamy co najmniej kilka rodzajów cząsteczek zdolnych do specyficznego wyciszania genów na poziomie mRNA, które próbowano wykorzystać jako terapeutyki. Do 3 głównych zalicza się: chemicznie modyfikowane antysensowne oligodeoksyrybonukleotydy (ODN), rybozymy i siRNA (*Small Interfering RNA*), rzadziej używane to PNA (*Peptide Nucleic Acid*) i DNAzymy [1].

ODN to ok. 20-nukleotydowe odcinki DNA łączące się z pre-mRNA i mRNA. Powstałe kompleksy RNA-DNA są degradowane przez rybonukleazę H (RNaze H). ODN wykazują niekiedy toksyczność komórkową, wiążąc niespecyficznie endogenne białka, indukują odpowiedź układu immunologicznego poprzez interferon oraz receptory TLR (*Toll-like Receptor*) [2]. Wśród kilku klas rybozymów te najlepiej poznane określane są mianem *hammerhead*. Rybozymy po przyłączeniu do komplementarnej nici mRNA ulegają aktywacji, co prowadzi do degradacji mRNA/pre-mRNA. Rybozymy, podobnie jak ODNs hybrydyzują bezpośrednio z mRNA i wymagają użycia relatywnie dużych stężeń, co pociąga za sobą ryzyko niespecyficznego działania. Z kolei siRNA są to krótkie, dwuniciowe odcinki RNA, które występują jako główne cząsteczki efektorowe naturalnego mechanizmu, zwanego interferencją RNA (RNAi), która prowadzi do specyficznej degradacji mRNA.

Większość badań porównawczych dowiodła, że siRNA jest dużo bardziej skuteczne, a efekt działania utrzymuje się dłużej niż w przypadku ODN, rybozymów i DNAzymów [3–5]. Dowiedziono, że w przypadku siRNA dawka, która powoduje wyciszenie, jest ok. 100 do 1000 razy niższa niż optymalna dawka PNA skierowana przeciwko temu samemu mRNA [3, 4]. Niskie stężenie siRNA, jakie jest potrzebne do wywołania pozytywnego efektu, jak i fakt, że siRNA szybko i specyficznie wiąże się z RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), ogranicza wiązanie z innymi białkami komórkowymi. Wprowadzane syntetyczne siRNA już w stężeniu kilku nanomoli powodowało redukcję docelowego mRNA do 95% [6]. Poza efektem niespecyficznego wiązania białek pojawia się również problem niespecyficznego wyciszania genu, tzw. efekt *off-target*. Zaangażowanie naturalnie istniejącego aparatu enzymatycznego powoduje, że prawdopodobieństwo efektów *off-target* w przypadku siRNA jest zdecydowanie mniejsze niż ODN. Uważa się, że odpowiednie dobranie sekwencji antysensownej decyduje o selektywności działania siRNA i eliminuje efekt *off-target*.

Interferencja RNA

Zidentyfikowanie cząsteczek biorących udział w procesie interferencji RNA przyczyniło się do szybkiego rozwoju badań z wykorzystaniem tego zjawiska w naukach podstawowych oraz w terapii.

Specyficzna degradacja mRNA indukowana egzogennym RNA została zaobserwowana po raz pierwszy u roślin w 1990 r. [7, 8]. U zwierząt zjawisko interferencji RNA (RNAi) po raz pierwszy wykazali Guo i Kemphues (1995),

Despite modern application of surgical treatment as well as radio- and chemotherapy the results of cancer treatment are still disappointing. Genetic engineering brings new hopes and capability of interference in the genome of tumour cells for regulation of function of genes responsible for transformation and progression of cancer. Discovery of the phenomenon of interference RNA has initiated research by using small interfering RNA (siRNA) for gene silencing in mammalian cells. Natural occurrence of this phenomenon in eukaryotic organisms provides the greatest efficiency and specificity in comparison with other methods of gene silencing such as antisense oligonucleotides and ribozymes. Despite the existence of technical challenges related to specificity, synthesis and feeding siRNA, this molecule has great therapeutic capabilities in treatment of such complicated sickness as advanced tumours.

Key words: anticancer therapy, gene silencing, RNA interference (RNAi), small interfering RNA (siRNA).

którzy używając antysensownej nici RNA, zablokowali ekspresję genu *par1* w *C. elegans*. Okazało się również, że zastosowanie sensownej nici RNA powoduje analogiczny efekt [9]. Przeprowadzone doświadczenia zainspirowały Fire i Mello do rozpoczęcia podobnych badań polegających na iniekcji podwójnej nici RNA (dsRNA) do ciała *C. elegans*. Wywołało to specyficzne wyciszenie genu o sekwencji homologicznej do sekwencji wprowadzonej [10]. Obserwowane wyciszenie było bardziej skuteczne niż w przypadku zastosowania pojedynczej sensownej lub antysensownej nici RNA. Przeprowadzone badania i ich wyniki okazały się przełomowe w poznaniu regulacji ekspresji genów, a ich twórcy zostali w bieżącym roku wyróżnieni Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny. Zjawisko to okazało się powszechne u wszystkich eukariontów, u zwierząt znane jest jako interferencja RNA (RNAi), u roślin jako potranskrypcyjne wyciszanie genów PTGS (*Post-Transcriptional Gene-Silencing*), natomiast w przypadku grzybów jako *quelling* [11, 12]. Coraz częściej jednak w celu ujednolicenia terminologii termin RNAi stosuje się do określenia wyciszania zarówno u zwierząt, jak i u roślin [13].

Rola RNAi w komórce eukariotycznej jak dotąd nie jest do końca poznana. Wiadomo, że niektóre organizmy wykorzystują interferencję RNA do walki z wirusami. Materiał genetyczny wirusa po wprowadzeniu do komórki gospodarza może indukować proces RNAi powodujący degradację wirusowego RNA. RNAi wykorzystywane jest również do wyciszania transpozonów, zapewniając tym samym integralność genomu organizmów eukariotycznych, oraz do potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów [1, 14].

Mechanizm działania siRNA

Proces RNAi zostaje zainicjowany w cytoplazmie w momencie pojawienia się długich dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA) lub cząsteczek RNA o strukturze *spinki do włosów* (shRNA – *short hairpin RNA*). Cząsteczka dsRNA niezależnie od jej sekwencji jest rozpoznawana i hydrolizowana przez nukleazę Dicer. Produktem trawienia dsRNA są krótkie, dwuniciowe interferujące siRNA o długości 21–23 nukleotydów, zakończone dwoma wolnymi nukleotydami na końcu 3 [6]. Nukleaza Dicer została po raz pierwszy odkryta u D. *melanogaster*. Dicer występujący w komórkach ludzkich należy do rodziny rybonukleaz typu III i posiada dwie domeny o aktywności Rnazy III, domenę PAZ, zależną od ATP domenę helikazową oraz domenę wiążącą dsRNA [15, 16]. Powstałe siRNA wraz z wyciszającym kompleksem RISC uczestniczą w reakcji degradacji homologicznego mRNA. Aktywacja RISC wymaga rozplecenia dwuniciowych siRNA. Następnie kompleks RISC wiąże preferencyjnie jedną z nici siRNA. Biochemiczne i bioinformatyczne analizy wskazują, że to sekwencja i struktura siRNA decyduje o tym, która z nici zostanie związana z RISC, dlatego niektóre z syntetycznych siRNA pozostają nieaktywne *in vivo* z powodu wiązania nieodpowiedniej nici w kompleksie RISC [17]. Jednoniciowy siRNA łączy się na zasadzie komplementarności z docelową sekwencją mRNA. Endonukleaza Ago2 (wchodząca w skład rodziny białek Argonaute) przecina powstałe dupleksy mRNA/siRNA, a dalsza degradacja zachodzi pod wpływem działania egzonukleaz [18, 19]. Badania nad składem i funkcją RISC wskazują na istnienie w obrębie kompleksu również innych białek z rodziny Argonaute, białek wiążących dsRNA, jak również wielu białek o aktywności helikaz i nukleaz. Białka Argonaute charakteryzują się posiadaniem dwóch konserwatywnych domen PAZ oraz PIWI [16, 20, 21]. Domena PAZ odpowiada za wiązanie siRNA, podczas gdy domena PIWI jest strukturalnie podobna do domeny rybonukleazy H i może wykazywać aktywność endorybonukleazy. Po zdegradowaniu docelowej cząsteczki RNA, RISC zostaje uwolniony i może być ponownie wykorzystany w procesie RNAi. Niektóre z białek kompleksu RISC zostały odnalezione w połączeniu z białkami rybosomalnymi, jak L5, L11, jak i z 5Sr RNA, co nasuwa przypuszczenie, że proces interferencji RNA może wpływać także na etap translacji (ryc. 1.) [20, 22, 23].

Sposoby wprowadzania siRNA do żywych organizmów

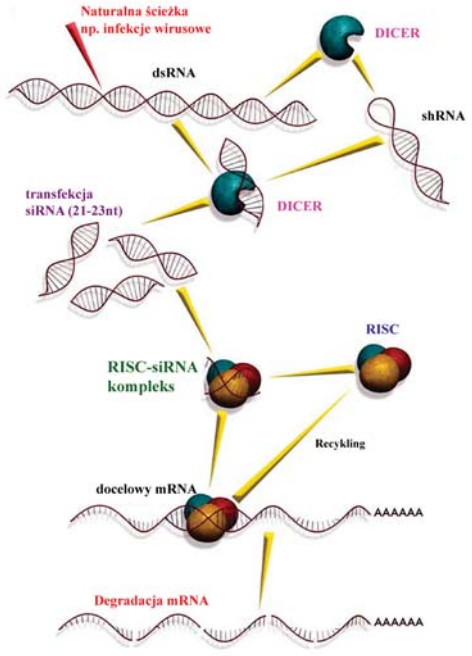
Do tej pory przeprowadzono wiele szczegółowych badań nad wprowadzaniem syntezowanego chemicznie siRNA i plazmidów oraz wirusów produkujących siRNA do organizmów modelowych z wykorzystaniem różnych metod. Skuteczność metody wprowadzania zdaje się zależeć zarówno od rodzaju tkanki, jak i wielkości organu, do którego wprowadzane jest siRNA [24–28]. Pierwszą udaną próbą wprowadzenia siRNA do tkanek myszy było dożylne wstrzyknięcie fizjologicznego roztworu siRNA pod wysokim ciśnieniem [28, 29]. Do wprowadzania siRNA wykorzystywano również systemy wirusowe, m.in. rekombinowany AAV (*Adeno-Associated Virus*), który zapewnia długotrwałą (nawet do 7 tyg. od czasu iniekcji) ekspresję siRNA zarówno w komórkach dzielących się, jak i w nieulegających podziałom [30]. Dobre efekty uzyskano również poprzez bezpośrednie wstrzyknięcie siRNA kodowanego przez adenowirusa do komórek wątroby i mózgu myszy [27]. Z myślą o zastosowaniu terapeutycznym opracowuje się metodę łagodniejszego podawania siRNA, z wykorzystaniem białek zdolnych do przenoszenia makromolekuł przez błonę komórkową, tzw. CPP (*Cell Penetrating Peptide*), liposomów, immunoliposomów, nanocząsteczek czy też przeciwciał lub ich części [31–33]. Możliwe również wydaje się podawanie siRNA w postaci aerozolu przy schorzeniach płuc i dróg oddechowych [34]. Obecnie w badaniach klinicznych zastosowanie znalazło dostarczanie tzw. *nagiej cząsteczki* siRNA. Wykorzystuje się także nośniki oparte na lipidach.

Perspektywy terapii opartej na interferencji RNA

Odkrycie naturalnego procesu specyficznej degradacji mRNA stało się podstawą do rozwoju nowego kierunku działania w terapii genowej. Pierwsze prace nad rozwijaniem nowych terapii w oparciu o proces interferencji RNA wykazały, że stosowane cząsteczki dwuniciowego RNA o długości ponad 30 pz indukują u ssaków ekspresję interferonu. Powodowało to zahamowanie translacji i degradację wszystkich cząsteczek mRNA w komórce. Dopiero dzięki pracy Tuschla i jego zespołu wykazano, że syntetyczne 21-nukleotydowe RNA (siRNA) wyciszają geny docelowe, bez indukcji ekspresji interferonu [6]. Pozwoliło to na znaczne przyspieszenie prac nad wdrożeniem nowej terapii. Odżyła również nadzieja na skuteczne leczenie schorzeń, w których zastosowanie technologii antysensu nie dało spodziewanych rezultatów. Przykładem może być zastosowanie siRNA do wyciszenia transferazy metylowej DNA. Próby przeprowadzone z nukleotydami antysensownymi i rybozymami dawały niepełne zahamowanie ekspresji i w konsekwencji nie wpływały na zwiększenie wrażliwości na leki. Natomiast zastosowanie siRNA może dać tu oczekiwane rezultaty [35].

Badania kliniczne i przedkliniczne

Obecnie trwają już badania kliniczne nad wykorzystaniem siRNA w walce ze starczym zwyrodnieniem plamki (AMD – *Age-related Macular Degeneration*). Celem działania tego leku jest receptor naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*). Badania kliniczne dotyczą dwóch leków opartych na siRNA: Sirna-027 (Sirna Therapeutics) – I faza oraz Cand5 (Acuity Pharmaceuticals) – II faza. Prowadzone są również badania kliniczne nad wykorzystaniem siRNA w infekcjach wirusowych górnych dróg oddechowych, tu prym wiedzie firma Alnylam Pharmaceuticals, która pracuje nad wprowadzeniem leków opartych na siRNA do leczenia m.in. grypy, astmy, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP, ang. COPD – *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) czy idiopatycznego włóknienia płuc (IPF – *Idiopathic Pulmonary Fibrosis*). W tab. 1. wyszczególniono firmy, które obecnie pracują nad wprowadzeniem do terapii siRNA.



Ryc. 1. Mechanizm działania siRNA
Fig. 1. *Mechanism of siRNA action*

Wśród zainteresowanych rozwijaniem tej terapii znajduje się również przedstawiciel Polski – Celon Pharma z siedzibą w Łomiankach pod Warszawą. Firma pracuje nad wykorzystaniem siRNA w terapii chorób nowotworowych oraz metabolicznych.

Choroby nowotworowe

Ze względu na brak w pełni skutecznych leków onkologia wiąże duże nadzieje z nową terapią. Kolejne doniesienia o zmienionej, często zwiększonej ekspresji genów w komórkach nowotworowych zwracają uwagę na możliwość wykorzystania siRNA do wyciszenia ekspresji tych genów. Inną grupę docelową w terapii przeciwnowotworowej opartej na siRNA stanowią geny białek antyapoptotycznych. Być może ich wyciszenie może indukować wchodzenie komórek na szlak apoptozy. Wśród wielu badań przeprowadzonych w tym kierunku siRNA zastosowano do wyciszenia m.in. genu *K-RASV12* [36], *FGF4* [37, 38], *c-myc* [39, 40], *STAT3* [40], *PTTG* [41, 42], *hTERT* [43-45], chimery *E2A-PBX1* [46], *Skp2* [47],

Tabela 1. Firmy farmaceutyczne zainteresowane wykorzystaniem siRNA w terapii
Table 1. *Pharmaceutical companies focused on siRNA*

Firma	Obszar terapeutyczny	Faza bada	Strona www
Acuity Pharmaceutica (Stany Zjednoczone)	okulistyka	II faza klinikliniczna	www.acuitypharma.com
Alnylam Pharmaceuticals (Stany Zjednoczone)	infekcje wirusowe choroba Parkinsona choroby metaboliczne uszkodzenia rdzenia kręgowego mukowiscydoza	I faza kliniczna (RSV)* przedkliniczna (grypa) przedkliniczna przedkliniczna przedkliniczna przedkliniczna	www.alnylam.com
Atugen (Niemcy)	choroby metaboliczne okulistyka onkologia	przedkliniczna przedkliniczna przedkliniczna	www.atugen.com
Benitec (Stany Zjednoczone)	HIV/AIDS wirusowe zapalenie wątroby typu C	I faza kliniczna przedkliniczna	www.benitec.com
Celon Pharma (Polska)	onkologia choroby metaboliczne	przedkliniczna przedkliniczna	www.celonpharma.com
CytRx (Stany Zjednoczone)	choroby metaboliczne stwardnienie zanikowe boczne cytomegalowirus	przedkliniczna przedkliniczna przedkliniczna	www.cytrxlabs.com
Genesis Research & Development (Nowa Zelandia)	alergia	przedkliniczna	www.genesis.co.nz
Intradigm (Stany Zjednoczone)	onkologia	przedkliniczna	www.intradigm.com
Nucleonics (Stany Zjednoczone)	wirusowe zapalenia wątroby typu B i C	przedkliniczna	www.nucleonicsinc.com
Phytovation (Holandia)	wirusowe zapalenie wątroby typu C grypa HIV	przedkliniczna przedkliniczna przedkliniczna	www.phytovation.com
Sirna Therapeutics (Stany Zjednoczone)	okulistyka choroba Huntingtona astma choroby metaboliczne dermatologia	I faza kliniczna przedkliniczna przedkliniczna przedkliniczna przedkliniczna	www.sirna.com

**RSV – syncytialny wirus oddechowy (respiratory syncytial virus)*

PIK3CB [48]. W toku przeprowadzanych badań zwrócono również uwagę na geny, przeciwko którym wcześniej próbowano zastosować oligonukleotydy antysensowne. Do tej grupy należą przede wszystkim geny z prowadzonych już badań klinicznych (często znajdujących się już w zaawansowanych fazach) nad zastosowaniem ODN: kodujący surwiwinę [49, 50], XIAP [51], ECE-1 [52], uPA [53] oraz E6 [54]. Zastosowanie technologii RNAi może także pomóc w przezwyciężeniu głównego problemu chemioterapii – oporności wielolekowej, która rozwija się u pacjentów na skutek zwiększonej ekspresji białek oporności wielolekowej z rodziny MDR. Jak wykazały badania, zahamowanie ekspresji MDR1 (*MultiDrug Resistance protein 1*) spowodowało ponowne uwrażliwienie komórek na chemioterapię [55, 56]. Także wyciszenie innych genów, jak np. surwiwiny zwiększa uwrażliwienie komórek na różne czynniki terapeutyczne i powoduje zwiększenie wrażliwości na apoptozę indukowaną TRAIL [50]. Z kolei zastosowanie siRNA przeciwko genowi kodującemu białko promujące wzrost neurytów (*midkine*) uwrażliwiło komórki raka prostaty na paklitaksel [57]. Wyciszenie jednego z genów powodujących zespół Cockayne'a uwrażliwiło komórki HeLa na promieniowanie [58]. SiRNA skierowane przeciwko *Bcl-2* spowodowało wzrost wrażliwości komórek HepG2 na 5-fluorouracyl oraz 10-hydroksykamptotecynę [59].

Kolejną grupą genów stanowiących potencjalny cel w terapii mogą być geny kodujące białka naprawiające uszkodzenia DNA, w tym głównie podwójne pęknięcia [38]. Generowanie takich uszkodzeń jest jednym z głównych mechanizmów

działania leków stosowanych w chemioterapii. Czas pokaże, czy terapie z wykorzystaniem siRNA zastąpią chemioterapię, czy tylko zwiększą jej skuteczność, pozwalając na zmniejszenie dawek, a co za tym idzie, także przyczynią się od obniżenia tak uciążliwych skutków ubocznych obecnej terapii.

Piśmiennictwo

1. Dorsett Y, Tuschl T. siRNA: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. Nat Rev Drug Discov 2004; 3: 318-29.
2. Rothenfusser S, Tuma E, Wagner M, Endres S, Hartmann G. Recent advances in immunostimulatory CpG oligonucleotides. Curr Opin Mol Ther 2003; 5: 98-106.
3. Miyagishi M, Hayashi M, Taira K. Comaprison of the suppressive effects of antisens oligonucleotides and siRNA directed against the same targets in mammalian cells. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 2003; 13: 1-7.
4. Grunweller A. Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2-0-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. Nucl Acids Res 2003; 31: 3185-93.
5. Yokota T, Miyagishi M, Hino T, et al. siRNA-based inhibition specific for mutant SOD1 with single nucleotide alternation in familial ALS, compared with ribozyme and DNA enzyme. Biochem Biophys Res Commun 2004; 314: 283-91.
6. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 2001; 411: 494-8.
7. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell 1990; 2: 279-89.
8. van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JNM, Stuitje AR. Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a Limited Number of Gene Copies May Lead to a Suppression of Gene Expression. Plant Cell 1990; 2: 291-9.
9. Guo S, Kemphues KJ. Par-1, a gene required establishing polarity in C. elegans embryos encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell 1995; 81: 611-20.
10. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 1998; 391: 806-11.
11. Cogoni C, Macino G. Gene silencing in Neurospora crass requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerasase. Nature 1999; 399: 166-9.
12. Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC. An RNa-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by transgene but not by virus. Cell 2000; 101: 543-53.
13. Kusaba M. RNA interference in crop plants. Curr Opin Biotechnol 2004; 15: 139-43.
14. Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillati RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. Curr Opin Struct Biol 2005; 15: 331-41.
15. Sharp PA. RNA interference – 2001. Genes Dev 2001; 15: 485-90.
16. Tomari Y, Zamore P. Perspective: machines for RNAi. Genes Dev 2005; 19: 517-29.
17. Gong D, Ferrell JE. Picking a winner: new mechanistic insights into the design of effective siRNAs. Trends Biotech 2004; 22: 451-4.
18. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. Science 2004; 305: 1437-41.
19. Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science 2004; 305: 1434-7.
20. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Koayashi R, Hannon GJ. Argonuate2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. Science 2001; 293: 1147-50.
21. Sontheimer EJ. Assembly and function of RNA silencing complexes. Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6: 127-38.
22. Gu S, Rossi JJ. Uncoupling of RNAi from active translation in mammalian cells. RNA 2005; 11: 38-44.
23. Ishizuka A, Osimi MC, Siomi H. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. Genes Dev 2002; 16: 2497-508.
24. Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf JH. Delivery of RNA Interference. Cell Cycle 2006; 15.
25. Howard KA, Rahbek UL, Liu X, et al. RNA Interference in Vitro and in Vivo Using a Novel Chitosan/siRNA Nanoparticle System. Mol Ther 2006; 7.
26. Zhou D, He QS, Wang C, Zhang J, Wong-Staal F. RNA interference and potential applications. Curr Top Med Chem 2006; 9: 901-11.
27. Shen WG. RNA interference and its current application in mammals. Chin Med J 2004; 117: 1084-91.
28. McCaffrey AP. RNa interference in adulte mice. Nature 2002; 418: 38-9.
29. Song E, Lee SK, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Nat Med 2003; 9: 347-51.
30. Hommel JD, Sears RMG, D., Simmons DL, DiLeone RJ. Local gene knockdown in brain using viral-mediated RNA interference. Nat Med 2003; 9: 1539-44.
31. Deshayes S, Morris MC. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. Cell Mol Life Sci 2005; 62: 1839-49.
32. Vornlocher HP. Antibody-directed cell-type-specific delivery of siRNA. Trends Mol Med 2006; 12.
33. Kathlen F, Zon G, Rati A, Zhou Q, Yo W. Targeting Nanoimmunoliposome Complex for Short Interfering RNA Delivery. Hum Gene Ther 2006; 17: 117-24.
34. Gautam A, Waldrep CJ, Densmore CL. Delivery systems for pulmonary gene therapy. Am J Respir Med 2002; 1: 35-46.
35. Peng Y, Zhang Q, Nagasawa H, Okayasu R, Liber H, Bedford J. Silencing expression of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase by small interfering RNA sensitizes human cells for radiation-induced chromosome damage, cell killing, and mutation. Cancer Res 2002; 62: 6400-4.
36. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. Cancer Cell 2002; 2: 243-7.
37. Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, et al. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. Nucl Acids Res 2004; 32: e109.
38. Collis S, Swartz M, Nelson W, DeWeese T. Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. Cancer Res 2003; 63: 1550-4.
39. Kabilova TO, Chernolovskaya EL, Vladimirova AV, Vlassov VV. Inhibition of Human Carcinoma and Neuroblastoma Cell Proliferation by Anti-c-myc siRNA. Oligonucleotides 2006; 16: 15-25.
40. Hong J, Zhao Y, Huang W. Blocking c-myc and stat3 by E. coli expressed and enzyme digested siRNA in mouse melanoma. Biochem Biophys Res Commun 2006; 348: 600-5.
41. Kakar SS, Malik MT. Suppression of lung cancer with siRNA targeting PTTG. Int J Oncol 2006; 29: 387-95.
42. Cho-Rok J, Yoo J, Jang YJ, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PTTG1 inhibits liver cancer cell growth in vitro and in vivo.. Hepatology 2006; 43: 1042-52.
43. de Souza Nascimento P, Alves G, Fiedler W. Telomerase inhibition by an siRNA directed against hTERT leads to telomere attrition in HT29 cells. Oncol Rep 2006; 16: 423-8.
44. Kurvinen K, Syrjanen S, Johansson B. Long-term suppression of telomerase expression in HeLa cell clones, transfected with an expression vector carrying siRNA targeting hTERT mRNA. Int J Oncol 2006; 29: 279-88.
45. Zheng JN, Sun YF, Pei DS, et al. Inhibition of Proliferation and Induction of Apoptosis in Human Renal Carcinoma Cells by Anti-telomerase Small Interfering. Acta Biochim Biophys Sin 2006; 38: 500-6.
46. Casagrande G, Te Kronnie G, Basso G. The effects of siRNA-mediated inhibition of E2A-PBX1 on EB-1 and Wnt16b expression in the 697 pre-B leukemia cell line. Haematologica 2006; 91: 765-71.
47. Katagiri Y, Hozumi Y, Kondo S. Knockdown of Skp2 by siRNA inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo. J Dermatol Sci 2006; 42: 215-24.
48. Pu P, Kang C, Zhang Z, Liu X, Jiang H. Downregulation of PIK3CB by siRNA suppresses malignant glioma cell growth in vitro and in vivo. Technol Cancer Res Treat 2006; 5: 271-80.
49. Li QX, Zhao J, Liu JY, et al. Survivin Stable Knockdown by siRNA Inhibits Tumor Cell Growth and Angiogenesis in Breast and Cervical Cancers. Cancer Biol Ther 2006; 5: 860-6.

50. Nakao K, Hamasaki K, Ichikawa T, Arima K, Eguchi K, Ishii N. Survivin downregulation by siRNA sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis. Oncol Rep 2006; 16: 389-92.
51. Zhang Y, Wang Y, Gao W, Zhang R, Han X, Jia M, Guan W. Transfer of siRNA against XIAP induces apoptosis and reduces tumor cells growth potential in human breast cancer in vitro and in vivo. Breast Cancer Res Treat 2006; 96: 267-77.
52. Awano S, Dawson LA, Hunter AR, Turner AJ, Usmani BA. Endothelin system in oral squamous carcinoma cells: Specific siRNA targeting of ECE-1 blocks cell proliferation. Int J Cancer 2006; 118: 1645-52.
53. Subramanian R, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Rao JS. SiRNA-mediated simultaneous downregulation of uPA and its receptor inhibits angiogenesis and invasiveness triggering apoptosis in breast cancer cells. Int J Oncol 2006; 28: 831-9.
54. Yamato K, Fen J, Kobuchi H, et al. Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. Cancer Gene Ther 2005; 13: 234-41.
55. Nieth C, Priebsch A, Stege A, Lage H. Modulation of the classical multirug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). FEBS Lett 2003; 545: 144-50.
56. Yague E, Higgins C, Raguz S. Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. Gene Ther 2004; 11: 1170-4.
57. Takei Y, Kadomatsu K, Goto T, Muramatsu T. Combinational antitumor effect of siRNA against midkine and paclitaxel on growth of human prostate cancer xenografts. Cancer 2006; 107: 864-73.
58. Liu F, Yu ZJ, Sui JL, Bai B, Zhou PK. SiRNA-mediated silencing of Cockayne Syndrome group B gene potentiates radiation-induced apoptosis and antiproliferative effect in HeLa cells. Chin Med J 2006; 119: 731-9.
59. Feng LF, Zhong M, Lei XY, Zhu BY, Tang SS, Liao DF. Bcl-2 siRNA induced apoptosis and increased sensitivity to 5-fluorouracil and HCPT in HepG2 cells. J Drug Target 2006; 14: 21-6.

Adres do korespondencji

dr med. Monika Lamparska-Przybysz
Laboratorium Biologii Molekularnej
Celon Pharma Sp. z o.o.
ul. Mokra 41a
05-092 Łomianki/Kiełpin
tel. +48 22 751 74 78
faks +48 22 751 74 77
e-mail: monikal@celonpharma.com