

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ТАРГЕТНЫХ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

А. Ю. Кузеванова<sup>1</sup>, А. С. Лунева<sup>2</sup>, М. А. Маслов<sup>2</sup>, А. В. Карпухин<sup>1</sup>, А. А. Алимов<sup>1</sup> ✉

<sup>1</sup>Лаборатория молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний, Медико-генетический научный центр, Москва

<sup>2</sup>Кафедра химии и технологии биологически активных соединений имени Н. А. Преображенского, Институт тонких химических технологий, Москва

Создание лекарственных средств на основе РНК-интерференции предполагает решение ряда задач, включая получение сведений о распределении по органам реципиента вводимых в его организм экзогенных малых интерферирующих РНК (миРНК). Имеющиеся данные по этому направлению исследований не являются полными и получены при помощи изотопных/флуоресцентных меток, которые не позволяют судить о сохранении первичной структуры введенного полимера. Использованный в данной работе метод анализа на основе количественной полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» позволяет решить эту проблему. Показано, что введенные внутривенно миРНК к гену *LIVIN* неравномерно распределяются между тканями и демонстрируют зависимое от дозы накопление в органах (исследование проводили на мышах, используя дозы 2,5 и 7,5 мг/кг). Максимальное накопление выявлено в печени и селезенке. Впервые обнаружено, что в этих органах концентрация анализируемой миРНК возрастает во временном интервале между 48 и 96 ч после введения. Это указывает на длительный период циркуляции миРНК в комплексе с катионными липосомами в организме. Полученные сведения актуальны для поиска эффективной терапевтической дозы, схем лечения, а также планирования доклинических и клинических исследований при разработке лекарственных препаратов на основе терапевтических миРНК.

**Ключевые слова:** малые интерферирующие РНК, катионные липосомы, мыши, ткани, количественная полимеразная цепная реакция

**Благодарности:** авторы благодарят Ольгу Коняеву и Наталию Кульбачевскую из Российского онкологического научного центра имени Н. Н. Блохина за консультативную и техническую помощь при работе с животными.

✉ **Для корреспонденции:** Алимов Андрей Анатольевич  
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115478; andrei.alimov2010@yandex.ru

**Статья получена:** 20.06.2017 **Статья принята к печати:** 24.06.2017

## DISTRIBUTION OF INTRAVENOUSLY INJECTED SMALL INTERFERING RNAs IN ORGANS AND TISSUES

Kuzevanova AY<sup>1</sup>, Luneva AS<sup>2</sup>, Maslov MA<sup>2</sup>, Karpukhin AV<sup>1</sup>, Alimov AA<sup>1</sup> ✉

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Genetics of Complexly Inherited Diseases, Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Preobrazhensky Department of Chemistry and Technology of Bioactive Compounds, Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow, Russia

There are a number of problems that need to be addressed when designing an effective RNA interference-based drug including distribution of intravenously injected exogenous small interfering RNAs (siRNAs) in the organs and tissues of the patient. Insufficient data on siRNA distribution obtained using isotopic/fluorescent labeling offers no insight into whether the polymer retains its original structure after the injection. Quantitative real-time polymerase chain reaction that we used in our work provides a better response to the challenge. In our experiment *LIVIN*-specific siRNAs injected intravenously were distributed unevenly between tissues and their accumulation was dose-dependent (the study was conducted in mice using 2.5 and 7.5 mg/kg doses). Maximal accumulation was observed in the liver and spleen where siRNA concentration continued to increase between 48 and 96 hours after its administration. This demonstrates that the studied cationic liposome/miRNA complex has long circulation time. We believe that the obtained data will be instrumental in finding an effective therapeutic dose, designing adequate regimens and preparing for preclinical or clinical trials of siRNA-based drugs.

**Keywords:** small interfering RNA, cationic liposomes, mice, tissues, quantitative polymerase chain reaction

**Acknowledgements:** authors thank Olga Konyaeva and Natalia Kulbachevskaya of Blokhin Russian Cancer Research Center for providing consultations and technical assistance with the animals.

✉ **Correspondence should be addressed:** Andrei Alimov  
ul. Moskvorechie, d. 1, Moscow, Russia, 115478; andrei.alimov2010@yandex.ru

**Received:** 20.06.2017 **Accepted:** 24.06.2017

С момента открытия механизма прямого связывания вне-сенных в цитозоль клетки малых интерферирующих РНК (миРНК) с РНК-индуцирующим комплексом выключения генов (RNA-induced silencing complex, RICS) интерес к созданию лекарственных средств на основе РНК-интерференции неуклонно растет [1]. Потенциальная возможность использования миРНК в терапевтических целях впервые была продемонстрирована при лечении модельных животных с аутоиммунным гепатитом [2]. В этих исследованиях при помощи РНК-интерференции ингибировали экспрессию гена *Fas* в гепатоцитах мыши *in vivo*. Ген кодирует рецептор, участвующий в запуске апоптоза. РНК-дуплексы вводили внутривенно в дозе 2,0–2,5 мг/кг, о проникновении введенных РНК в клетки печени судили при помощи меченного флуорохромом Су5 по 3'-концу олигонуклеотида.

Первым результативным препаратом на основе миРНК, упакованных в липосому, принято считать миРНК к апо-липопротеину В (АЛОВ), которые вводили обезьянам внутривенно в дозе 1,0–2,5 мг/кг, после чего наблюдали снижение уровня экспрессии таргетного гена на 90 % [3]. Накопление АЛОВ приводит к развитию атеросклероза. В качестве вектора использовали липосомы компании Alnylam Pharmaceuticals — iLNP, которые принято считать хорошими переносчиками миРНК в клетки. На основе этих же липосом был успешно опробован в клинике препарат для лечения амилоидной дистрофии ревусиран (*revusiran*), известный также как ALN-TTR01 [4]. Для лечения онкологических больных с использованием подобной системы доставки миРНК был создан препарат на основе миРНК к генам *VEGF* и *KSP* для лечения метастазов различного происхождения в печени [5], а также препарат для борьбы с вирусом Эбола [6]. Сведения о распределении этих комплексов между тканями и органами реципиентов ограничены и получены при помощи флуоресцентных меток [7].

В настоящее время предпринимаются многочисленные попытки найти другие эффективные способы доставки миРНК в клетки *in vivo* [8]. Среди них в качестве потенциальных векторов по переносу миРНК в клетки рассматриваются липосомы на основе катионных амфифилов [9, 10]. Возможность их использования в экспериментах *in vivo* была недавно показана в экспериментах по инактивации экспрессии гена *Bid* (ВНЗ-взаимодействующий агонист домена смерти) комплексом миРНК с коммерческим препаратом InvivoFectamine (Thermo Fisher Scientific, США). Препарат вводили внутривенно мышам в дозе 0,5–4,0 мг/кг, эффективность интерференции анализировали в ткани печени [11]. Анализ распределения препарата в организме не проводили. Вместе с тем такая информация необходима для понимания накопления препарата в органе таргетного воздействия. Кроме того, от особенностей распределения препарата в органах и тканях может зависеть характер побочных эффектов.

Цель нашего исследования — оценить распределение миРНК к гену *LIVIN*, вводимых внутривенно мышам при помощи катионных липосом, состоящих из катионного липида 1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорида и нейтрального липида 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолamina, с использованием недавно предложенного подхода на основе количественной полимеразной цепной реакции. Ген *LIVIN* является одним из генов-ингибиторов апоптоза. Он часто повышенно экспрессируется в злокачественных опухолях и рассматривается в качестве перспективной мишени для таргетной терапии с помощью миРНК [12].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Лабораторные животные

Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с требованиями национального стандарта Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ 53434-2009, 2010 г.) и Приказа Минздравсоцразвития России № 708н от 13 октября 2010 г. «Об утверждении Правил лабораторной практики». Исследование одобрено локальным этическим комитетом Медико-генетического научного центра (протокол № 8 от 23.12.2016). В исследовании использовали 18 здоровых мышей — самцов линии Balb/c, полученных из разведения в Российском онкологическом научном центре имени Н. Н. Блохина, с массой тела 21–22 г. Мышей содержали в стандартных условиях со свободным доступом к корму и воде. Перед началом эксперимента все мыши прошли ветеринарное освидетельствование и были здоровы.

Животные были рандомизированы на 3 группы: группа 1 (контрольная группа) получала внутривенно физиологический раствор хлористого натрия по 0,5 мл; группа 2 — внутривенно субстанцию на основе миРНК к гену *LIVIN* в дозе 2,5 мг/кг; группа 3 — внутривенно субстанцию на основе миРНК к гену *LIVIN* в дозе 7,5 мг/кг. Перед началом эксперимента все мыши были помечены, взвешены и рассажены по клеткам по 6 мышей в каждую. Забор гистологического материала для проведения биохимического исследования осуществляли через 48 и 96 ч после внутривенного введения. Забой животных осуществляли в строгом соответствии с существующими требованиями. От каждой особи были получены образцы тканей легкого, печени, селезенки, почки и головного мозга, которые немедленно заморозили в жидком азоте и хранили до использования при –70 °С.

### Определение экзогенных миРНК в тканях

Количество экзогенных миРНК в образцах тканей оценивали при помощи количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) согласно рекомендациям Liu и соавт. [13]. Пробу к экзогенной миРНК гена *LIVIN* подбирали при помощи коммерческого пакета программ Custom TaqMan Small RNA Assays Design and Ordering Guide (Applied Biosystems, США) в строгом соответствии с рекомендациями производителя. Фракцию нуклеиновых кислот выделяли из гомогенизированных в жидком азоте образцов тканей общепринятым методом с использованием протеиназы К и фенол-хлороформной экстракции. Обратную транскрипцию и количественную ПЦР проводили с использованием коммерческого набора реагентов для исследования малых РНК Custom TaqMan Small RNA Assays (Applied Biosystems) согласно рекомендациям производителя. Каждую пробу анализировали в трех повторностях. О концентрации дуплексов в образце судили по значению порогового цикла реакции *Ct*, *threshold cycle*, который соответствует моменту реакции в образце, при котором флуоресцентный сигнал достигает одинаковой пороговой величины для всех образцов данной серии. Сбор и обработку данных осуществляли при помощи коммерческого пакета программ Applied Biosystems StepOne and StepOnePlus Real-Time PCR Systems. Нормирование сигнала в каждом анализируемом образце проводили с использованием малой ядерной РНК *snoRNA202* согласно рекомендациям Wong и соавт. [14]. Относительное содержание дуплексов в

анализируемых образцах определяли при помощи программного обеспечения DataAssist v3.0 Software (Applied Biosystems) [15]. Образцом сравнения (калибратором) служил нулевой образец, полученный из той же ткани от мышей контрольной группы.

#### Получение инъекционной лекарственной формы

Инъекционную лекарственную форму получали в лабораторных условиях в соответствии с существующими нормативными требованиями. Катионные липосомы для проведения исследования описаны в работе Маслова и соавт. [10]. Интерферирующие РНК к гену *LIVIN* для загрузки липосом (дуплексы) получали в результате отжига двух комплементарных олигонуклеотидов так, как это было описано ранее [12]. Комплексы катионных липосом с нуклеиновыми кислотами получали в стерильной воде. На завершающем этапе к загруженным липосомам добавляли хлорид натрия до конечной концентрации 0,9 %, смесь фильтровали (размер пор фильтра — 10 мкм) и использовали в эксперименте. Конечная концентрация дуплекса в инъекционной форме составляла 0,125 мкг/мл. Минимальная инъекционная доза *in vivo* была определена на основе существующих рекомендаций для подобного коммерческого препарата Invivoectamine.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В серии предварительных экспериментов *in vitro* показано, что миРНК, трансфицированные с помощью катионных липосом в клетки, медленно элиминируются, что позволяет детектировать их в составе выделенной из культуры клеток фракции нуклеиновых кислот в течение, по крайней мере, первых 3 сут. после трансфекции (данные не опубликованы). На основании этих наблюдений был определен временной интервал забора материала в экспериментах *in vivo*. Пробы тканей отбирали через 48 и 96 ч после внутривенного введения миРНК.

В ходе исследования было установлено, что в экспериментальных группах животных, получавших внутривенно субстанцию на основе миРНК к гену *LIVIN* в дозах 2,5 мг/кг и 7,5 мг/кг, видимых проявлений токсичности не наблюдается. Анализ массы тела мышей и массы извлеченных органов в экспериментальных группах значимых отклонений от физиологической нормы не выявил. Полученные значения не отличались от значений, наблюдаемых в контрольной группе животных.

Серия подготовительных экспериментов была проведена перед началом биохимической части исследования. В частности, был определен нижний порог детекции для разработанной нами пробы. Для этого с использованием нулевого образца была построена 5-уровневая калибровочная кривая в диапазоне концентраций дуплекса (миРНК) от 23,04 пг/мл до 230 нг/мл, что позволило определить нижний предел концентрации миРНК в образце определяемой при помощи ПЦР в режиме «реального времени» с реакцией обратной транскрипции. В наших экспериментах нижний порог детекции составил 3–5 пг на реакцию, что позволило перейти к анализу распределения введенной внутривенно миРНК.

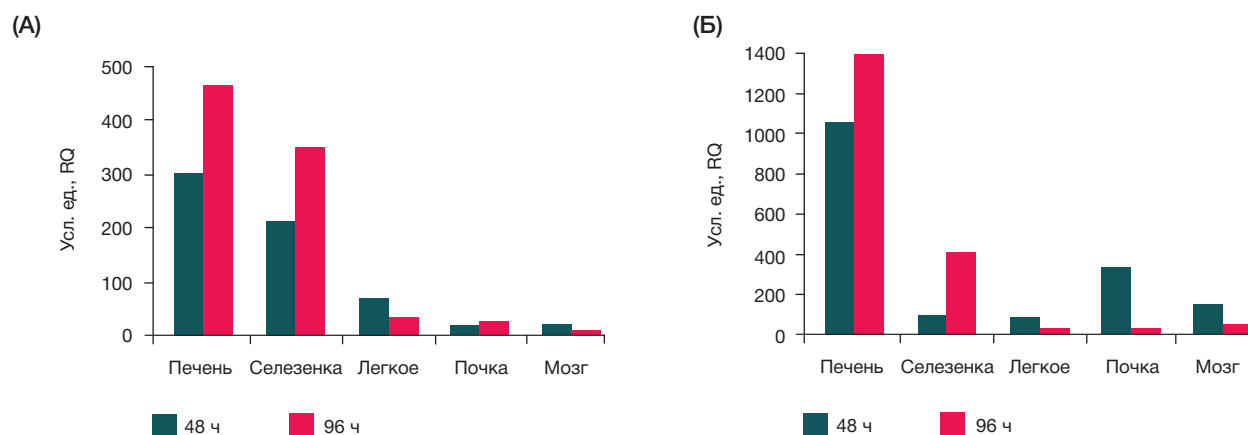
Результаты анализа представлены на рисунке. Полученные данные показали, что распределение введенных внутривенно миРНК между органами животных имеет характерный вид. Максимальное значение уровня накопления зафиксировано для ткани печени, минимальное — для ткани мозга.

Обнаружено, что аккумуляция введенных миРНК в течение первых 2 сут. находится в зависимости от дозы введенного препарата в тканях печени, почки и мозга. Этот эффект не наблюдается для тканей легкого и селезенки.

С течением времени в тканях легкого, почки и мозга происходит постепенное снижение концентрации миРНК. В тканях печени и селезенки обнаружен обратный процесс: введенные миРНК накапливаются в тканях этих органов в течение первых 4 сут. Для ответа на вопрос, элиминируются ли миРНК в дальнейшем, был проведен дополнительный эксперимент, в котором образцы тканей органов забирали через 12 дней после введения препарата в тех же дозах. Остаточных количеств препарата в тканях печени, почки, легкого и мозга обнаружено не было, что позволяет говорить об ограниченном во времени характере обнаруженного эффекта.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Информация о распределении по органам миРНК, разрабатываемым в терапевтических целях, включая терапию злокачественных опухолей, имеет существенное значение. Опухоли в органе, накапливающем миРНК, будут в большей степени подвергаться лечебному воздействию. Обнаруженная в настоящем исследовании преимущественная аккумуляция миРНК в тканях печени предполагает, что раковые опухоли в этом органе будут преимущественной мишенью препаратов на основе РНК-интерференции. Как



Накопление миРНК в органах после внутривенного введения. Статистически значимые различия по отношению к контрольной группе получены для тканей печени, селезенки, почки и легкого ( $p < 0,05$ ). (А) Инъекционная доза 2,5 мг/кг. (Б) инъекционная доза 7,5 мг/кг

следует из впервые полученных нами данных, накопление миРНК в печени при внутривенном введении препарата пропорционально введенной дозе и продолжается, по крайней мере, в течение 4 сут.

Наблюдаемая в нашем исследовании общая картина распределения соответствует известным сведениям о распределении миРНК по органам, полученным при помощи флуоресцентных меток [7]. В то же время проведенный нами анализ дозовых и временных зависимостей позволил получить новую информацию, имеющую существенное значение. В частности, повышение дозы приводит к кратному увеличению миРНК в почке. Этот эффект наблюдается в течение 2 сут., после чего концентрация миРНК снижается. Полученные данные важны для разработки способа терапии на основе миРНК, в частности, противопухоловой, в тканях почки. Аналогичные зависимости, хотя и менее выраженные, наблюдаются в ткани мозга. Интересно, что повышение введенной дозы не оказывает влияния на концентрацию миРНК в тканях легкого и селезенки.

Полученные нами данные о зависимости уровня накопления миРНК от дозы и времени имеют прямое отношение к разработке потенциальных схем лечения. Впервые обнаруженный нами временной эффект накопления миРНК в тканях печени и селезенки не был замечен ранее для препаратов на основе РНК-интерференции и не учитывался при разработке существующих схем лечения.

Анализ динамики накопления миРНК в зависимости от дозы показал, что ткани почки особенно восприимчивы к повышению концентрации в крови препаратов на основе миРНК и катионных липосом. Это предполагает, что при разработке способа таргетного воздействия с помощью РНК-интерференции на клетки, например карциномы почки, дозу вводимых миРНК-липосомальных комплексов желательно увеличить, что должно способствовать усилению эффекта.

Получение данных обеспечила разработка метода определения миРНК, аккумулированных в тканях органов, на основе количественной ПЦР в режиме «реального времени». В отличие от подходов на основе флуоресцентных меток [2, 7] этот метод позволяет детектировать только

те миРНК, которые сохранили свою первичную структуру, обеспечивающую интерферирующую функцию [13]. То есть измеряются функционально способные миРНК, информация о которых необходима при проведении доклинических и клинических исследований.

При разработке способов терапии полученные дозовые и временные зависимости создают основу для определения оптимальных условий, обеспечивающих эффективную доставку миРНК в орган-мишень и, с другой стороны, минимизирующих накопление препарата в других органах.

В качестве тестируемой РНК-компоненты инъекционного препарата использовали миРНК к гену *LIVIN*, хорошо зарекомендовавшую себя в наших предыдущих исследованиях *in vitro* и представляющую интерес для последующего терапевтического использования [12]. Отсутствие видимых проявлений токсических эффектов в наших опытах хорошо согласуется с известными данными [2, 3, 7, 11]. Опробованные в опытах на животных дозы 2,5 и 7,5 мг/кг хорошо укладываются в существующий в настоящее время диапазон доз для большинства препаратов на основе миРНК. Использованное нами однократное введение не привело к каким-либо заметным патологическим изменениям внутренних органов или отклонений в поведении животных.

## ВЫВОДЫ

Представленные в нашем исследовании результаты анализа дозовых и временных зависимостей распределения миРНК между органами после внутривенного введения позволяют заключить, что органом, наиболее восприимчивым к действию препаратов на основе РНК-интерференции, является печень. Накопление миРНК в этом органе носит зависимость от времени и дозы характер. Анализ аккумуляция миРНК другими органами показал, что повышение дозы приводит к кратному увеличению миРНК в тканях почки и мозга в течение 48 ч с последующим снижением их концентрации к 96 ч. В целом распределение миРНК между органами носит неравномерный характер, что необходимо учитывать при разработке новых таргетных препаратов на основе РНК-интерференции.

## Литература

1. 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 May 24; 411 (6836): 494–8.
2. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*. 2003 Mar; 9 (3):347–51.
3. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*. 2006 May 4. 441 (7089): 111–4.
4. Coelho T, Adams D, Silva A, Lozeron P, Hawkins PN, Mant T, et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*. 2013 Aug 29; 369 (9): 819–29.
5. Tabernero J, Shapiro GI, LoRusso PM, Cervantes A, Schwartz GK, Weiss GJ, et al. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov*. 2013 Apr; 3 (4): 406–17.
6. Geisbert TW, Lee AC, Robbins M, Geisbert JB, Honko AN, Sood V, et al. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet*. 2010 May 29; 375 (9729): 1896–905.
7. Tracy M. Progress in the Development of LNP Delivery for siRNA Advancing LNPs to the Clinic. In: *International Liposome Research Days Meeting*; 2010 Aug; Vancouver, Canada;. 2010. p. 1–52.
8. Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet*. 2015 Sep; 16 (9): 543–52.
9. Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit J-P. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*. 2008 Aug–Sep; 29 (24–25): 3477–96.
10. Maslov MA, Kabilova TO, Petukhov IA, Morozova NG, Serebrennikova GA, Vlassov VV, et al. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA. *J Controlled Release*. 2012 Jun 10; 160 (2): 182–93.
11. Eguchi A, De Mollerat Du Jeu X, Johnson CD, Nektaria A, Feldstein AE. Liver Bid suppression for treatment of fibrosis associated with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2016 Mar; 64 (3): 699–707.



12. Bavykin AS, Korotaeva AA, Poyarkov SV, Syrtsev AV, Tjulandin SA, Karpukhin AV. Double siRNA-targeting of cIAP2 and LIVIN results in synergetic sensitization of HCT-116 cells to oxaliplatin treatment. *Onco Targets Ther.* 2013 Sep 23; 6: 1333–40.
13. Liu WL, Stevenson M, Seymour LW, Fisher KD. Quantification of siRNA using competitive qPCR. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan; 37 (1): e4.
14. Wong L, Lee K, Russell I, Chen C. Application Notes & Tutorials: Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays [Интернет]. Версия от 28 августа 2010 г. [дата обращения: 23 июня 2017 г.]. 8 с. Доступно по: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms\\_044972.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_044972.pdf)
15. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protoc.* 2008; 3 (6): 1101–8.

## References

1. 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 May 24; 411 (6836): 494–8.
2. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med.* 2003 Mar; 9 (3):347–51.
3. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* 2006 May 4. 441 (7089): 111–4.
4. Coelho T, Adams D, Silva A, Lozeron P, Hawkins PN, Mant T, et al. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med.* 2013 Aug 29; 369 (9): 819–29.
5. Taberero J, Shapiro GI, LoRusso PM, Cervantes A, Schwartz GK, Weiss GJ, et al. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov.* 2013 Apr; 3 (4): 406–17.
6. Geisbert TW, Lee AC, Robbins M, Geisbert JB, Honko AN, Sood V, et al. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet.* 2010 May 29; 375 (9729): 1896–905.
7. Tracy M. Progress in the Development of LNP Delivery for siRNA Advancing LNPs to the Clinic. In: International Liposome Research Days Meeting; 2010 Aug; Vancouver, Canada; 2010. p. 1–52.
8. Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet.* 2015 Sep; 16 (9): 543–52.
9. Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit J-P. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials.* 2008 Aug–Sep; 29 (24–25): 3477–96.
10. Maslov MA, Kabilova TO, Petukhov IA, Morozova NG, Serebrennikova GA, Vlassov VV, et al. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA. *J Controlled Release.* 2012 Jun 10; 160 (2): 182–93.
11. Eguchi A, De Mollerat Du Jeu X, Johnson CD, Nektaria A, Feldstein AE. Liver Bid suppression for treatment of fibrosis associated with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2016 Mar; 64 (3): 699–707.
12. Bavykin AS, Korotaeva AA, Poyarkov SV, Syrtsev AV, Tjulandin SA, Karpukhin AV. Double siRNA-targeting of cIAP2 and LIVIN results in synergetic sensitization of HCT-116 cells to oxaliplatin treatment. *Onco Targets Ther.* 2013 Sep 23; 6: 1333–40.
13. Liu WL, Stevenson M, Seymour LW, Fisher KD. Quantification of siRNA using competitive qPCR. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan; 37 (1): e4.
14. Wong L, Lee K, Russell I, Chen C. Application Notes & Tutorials: Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays [Internet]. Version: 28 Aug 2010 [cited 2017 Jun 23]. 8 p. Available from: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms\\_044972.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_044972.pdf)
15. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protoc.* 2008; 3 (6): 1101–8.