

## СОВРЕМЕННЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ НЕВИРУСНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

А.В. Раднаева<sup>1,2\*</sup>, Е.А. Слободкина<sup>1</sup>, В.А. Ткачук<sup>1-3</sup>, П.И. Макаревич<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, ул. Ленинские Горы, 1; \*e-mail: arina.radnaeva05@gmail.com

<sup>2</sup>Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, ул. Ленинские Горы, 1

<sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени акад. Е.И. Чазова, 121552, Москва, ул. Академика Чазова, 15А

Современные системы доставки генетического материала делятся на вирусные и невирусные. Несмотря на доминирование вирусных векторов в разработках препаратов для генной терапии из-за высокой эффективности трансдукции, их применение ограничено иммуногенностью, риском инсерционного мутагенеза и воспалительными реакциями. Невирусные системы обладают лучшим профилем безопасности, возможностью масштабируемого производства и гибкостью в нагрузке генетическим материалом, но уступают в эффективности трансфекции. Основные проблемы, влияющие на трансфекцию невирусными векторами, заключаются в низкой стабильности нуклеиновых кислот *in vivo*, сложности доставки материала в ядро клетки и токсичности химических соединений, входящих в конструкцию вектора. Для решения проблем низкой эффективности доставки генетического материала невирусными векторными системами необходимо направить дальнейшие исследования на оптимизацию химической структуры молекул-носителей, их модификации для улучшения таргетинга и на детальное изучение внутриклеточных путей транспорта векторов. Наиболее перспективными областями применения невирусных систем доставки на сегодняшний момент являются онкология, разработка вакцин и легочные заболевания.

**Ключевые слова:** генная терапия; вектор; невирусные системы доставки; липидный вектор; поликатионный вектор

DOI: 10.18097/BMCRM00287

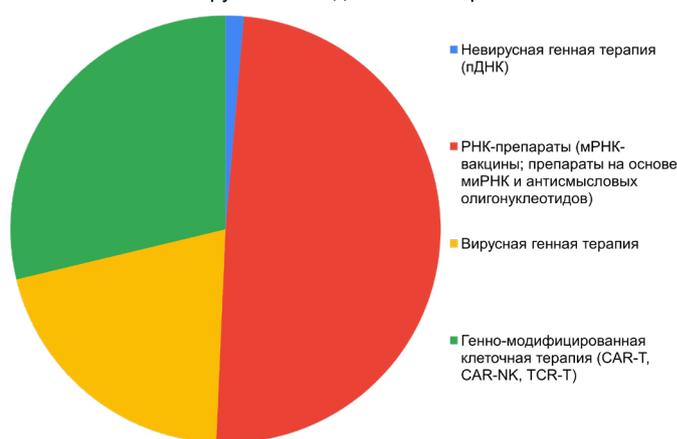
### ВВЕДЕНИЕ

Системы доставки генетического материала (векторы) можно классифицировать на две группы: вирусные и невирусные. За последние десятилетия в клинических исследованиях с использованием генной терапии большинство векторных систем представлены вирусными конструкциями. На данный момент в мире зарегистрировано 66 генотерапевтических препаратов (включая препараты на основе ДНК, РНК и генно-модифицированных клеток). При этом использование незащищенных («голых») нуклеиновых кислот, за редким исключением (Неоваскулген, Collatogene), не нашло широкого применения в клинической практике.

Среди генотерапевтических препаратов лекарственные средства на основе вирусных векторов составляют существенную долю, что мы можем наблюдать на диаграмме (рис. 1), отражающей процентное распределение одобренных генотерапевтических препаратов по состоянию на второй квартал 2025 года [1]. Однако и невирусные системы представляют интерес.

Преобладание вирусных систем над невирусными векторными конструкциями по типу плазмидной ДНК, объясняется их преимуществами – вирусные векторы обладают достаточной эффективностью трансдукции и обеспечивают высокий уровень экспрессии целевых генов. К их недостаткам относят выраженную иммуногенность, связанные с ней нежелательные реакции

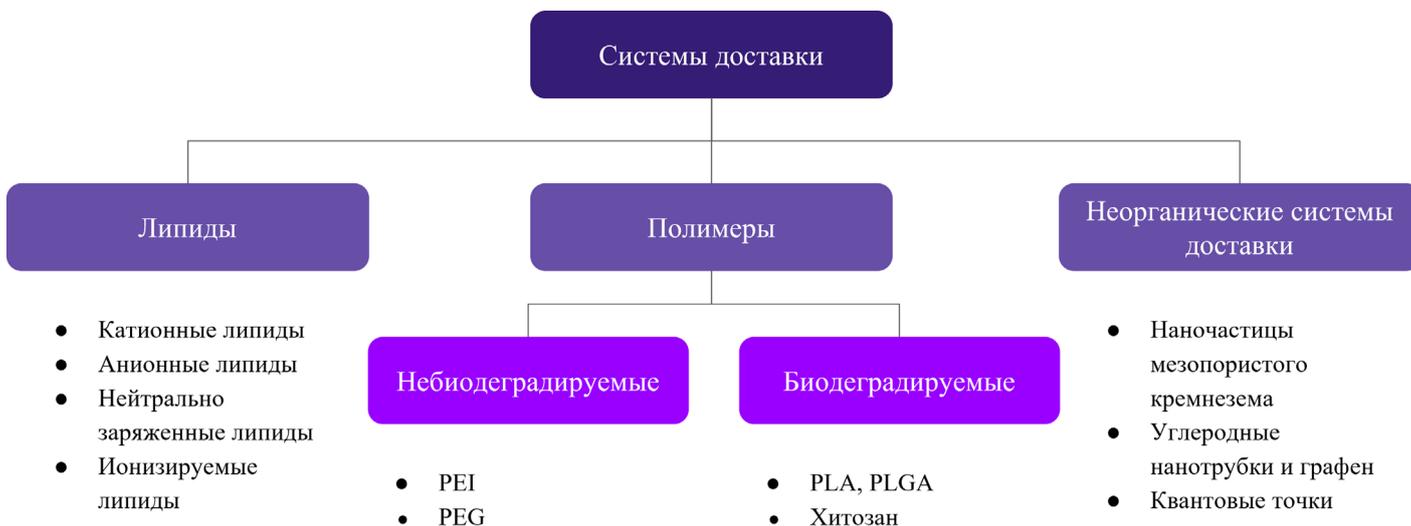
Одобрённые препараты с использованием вирусных и невирусных методов генной терапии



**Рисунок 1.** Одобренные препараты с использованием вирусных и невирусных методов генной терапии по состоянию на второй квартал 2025 года (распределение указано в %), [1] где: 1.4% – невирусная генная терапия (пДНК); 49.3% – РНК-препараты (мРНК-вакцины; препараты на основе миРНК и антисмысловых олигонуклеотидов); 20.5% – вирусная генная терапия; 28.8% – генно-модифицированная клеточная терапия (CAR-T, CAR-NK, TCR-T).

и иммунотоксичность, а также инсерционный мутагенез, а при местном введении – локальный воспалительный эффект [2-4].





**Рисунок 2.** Классификация невирусных наноносителей в генной терапии.

Таким образом, существует потребность в альтернативах вирусным векторам для доставки генов с меньшим количеством нежелательных реакций. Невирусные векторы имеют лучший по сравнению с вирусными профиль безопасности, менее выраженный иммунный ответ, возможность стандартизованного и масштабного производства. Также невирусные системы доставки обладают более гибкими характеристиками нагрузки генетическим материалом по сравнению с вирусными векторами. Однако эффективность трансфекции, то есть способность невирусных векторов проникать в клетки, значительно ниже, чем у вирусных систем [5].

В поисках решения данной проблемы в последнее время значительно увеличилось количество исследований по химической модификации невирусных систем, направленной на таргетную доставку и увеличение эффективности трансфекции [6]. Также ряд исследователей обратили внимание на возможность моделирования невирусных векторов с оптимизацией пути их интернализации, так как не все механизмы вхождения являются эффективными с точки зрения дальнейшего высвобождения нуклеиновой кислоты в цитозоль и попадания в ядро [7-9]. На рисунке 2 представлена классификация современных наиболее распространенных наноносителей в генной терапии.

Основной проблемой, тормозящей развитие невирусных подходов в генной терапии (ГТ), является низкая эффективность трансфекции *in vivo*. Незащищенные ДНК и РНК быстро деградируют в биологических жидкостях из-за их расщепления эндонуклеазами, не накапливаются в тканях-мишенях после системного введения и не обладают специфическими механизмами для проникновения в клетки. Решение данных проблем возможно путем включения нуклеиновых кислот в специальные системы доставки.

Системы для доставки нуклеиновых кислот по происхождению полимеров, на которых они основаны, можно разделить на органические и неорганические. Органические полимеры, в свою очередь, делятся на биоразлагаемые (векторы на основе липидов, пептидов, хитозана) и неразлагаемые (полиэтиленмин (PEI), полиэтиленгликоль (PEG)). Неорганические системы не

способны к деградации в организме; среди них можно выделить углеродные носители (фуллерены и нанотрубки). Также существуют гибридные системы, включающие органические и неорганические полимеры [10].

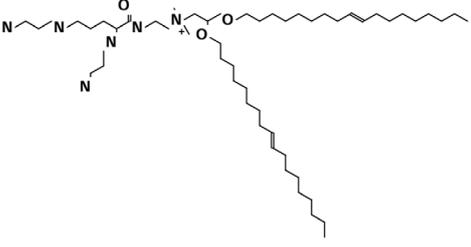
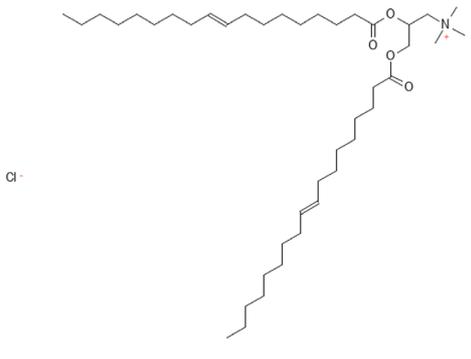
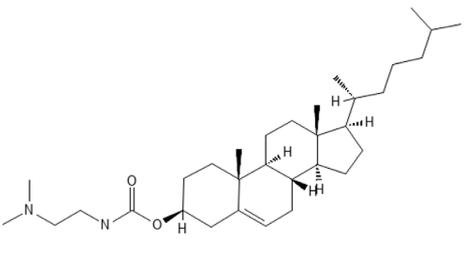
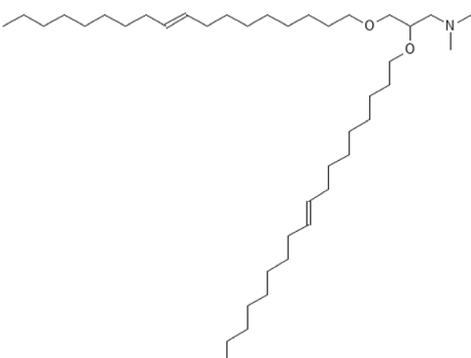
При разработке лекарственного препарата с их использованием особое внимание уделяется биосовместимости веществ-компонентов. В оптимальном случае при попадании такого препарата в организм не должно наблюдаться выраженного токсического действия и иммунного ответа при его взаимодействии с клетками и тканями живого организма. Одним из важных качеств наиболее перспективных систем доставки является способность к биodeградации внутри организма. Основываясь на этих критериях, многообразие потенциальных носителей значительно сужается, что позволяет систематизировать и выявить наиболее перспективные варианты для доклинической и клинической разработки.

## 1. ОРГАНИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

### 1.1. Липидные системы доставки

Большинство применяемых в ГТ липидов имеют в своей структуре положительно заряженные гидрофильные “головные” группы, благодаря которым они взаимодействуют с анионными фосфатными группами в составе нуклеиновых кислот. Электростатическое взаимодействие приводит к образованию липоплексов – комплексов липидов и нуклеиновых кислот. Благодаря силам Ван-дер-Ваальса и водородным связям липидные молекулы, как правило, образуют структуры в виде липосом, твердых липидных наночастиц или липидных эмульсий, способных включать в себя как гидрофильные соединения, так и гидрофобные [11].

Наиболее распространенная наноформа липидных соединений – липосомы и липидные наночастицы, в состав которых входят катионные, анионные, нейтрально заряженные и ионизированные липиды. Липидные соединения уже давно применяются в клинической практике для доставки генетического материала в клетки организма [10].

Структура	Аббревиатура	Наименование IUPAC
	DOSPA	2-[2,5-бис(3-аминопропиламино)пентаноиламино]этил-2,3-бис[(Z)-октадек-9-енокси]пропил-диметилазаниум
	DOTAP	2,3-бис[[[(Z)-октадек-9-еноил]окси]пропил-триметилазаниум
	DC-Chol	[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-диметил-17-[(2R)-6-метилгептан-2-ил]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-додекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил] N-[2-(диметиламино)этил]карбамат
	DODMA	N,N-диметил-2,3-бис[(Z)-октадек-9-енокси]пропан-1-амин

**Рисунок 3.** Примеры структур катионных липидов [13] (CC BY-SA 4.0).

### 1.1.1. Катионные липиды

Амфифильные молекулы катионных липидов имеют в своей структуре помимо гидрофобных хвостов и химического линкера положительно заряженные полярные головки, каждая из которых может содержать одну или несколько функциональных групп [12]. Наиболее распространенные катионные липиды для образования катионных липосом приведены на рисунке 3.

Образование комплекса липидных молекул и нуклеиновых кислот происходит за счет электростатического

взаимодействия между положительными и отрицательными зарядами. Образование липоплексов только из катионных липидов, как правило, предполагает наличие избытка липидов, что приводит к накоплению положительных зарядов и более высокой эффективности захвата ДНК с увеличением интернализации комплекса в клетки. После проникновения в клетку положительный заряд липидов создает эффект “протонной помпы”: из-за связывания протонов внутри эндосомы активируется усиленная работа АТФазы в составе эндосомальной мембраны, что приводит к накоплению ионов и воды и последующему увеличению

осмотического давления и разрыву эндосомы [14, 15]. Также возможен механизм нарушения целостности эндосомы путем связывания катионных липидов с липидами в составе мембраны [16].

Однако наличие положительно заряженных структурных элементов молекулы имеет и свои недостатки. Катионные липосомы имеют низкую стабильность в сыворотке, так как они способны связываться с белками плазмы крови (сывороточный альбумин, белки системы комплемента, иммуноглобулины), образуя поверхностные агрегаты. Токсичность положительно заряженных элементов молекулы еще не до конца изучена, однако известно, что катионные липосомы способны вызывать повреждение клеток и активировать провоспалительные и проапоптотические сигнальные пути [17]. По сравнению с нейтральными и отрицательно заряженными липосомами, катионные липосомы легче поглощаются фагоцитами. Это приводит к образованию активных форм кислорода и азота (супероксид и гидроксильные радикалы, оксид азота, синглетный кислород, диоксид азота и пероксинитрит), которые повреждают органеллы и способствуют повышению уровня натрия внутри клеток, что приводит к цитотоксичности и апоптозу клеток [18].

Некоторые исследования показали, что уменьшение дзета-потенциала катионных липосом приводит к уменьшению токсичности. С этой целью к структуре липосом добавляют нейтральные или цвиттерийонные липиды [19, 20].

Катионные липосомы активно применяют в разработке РНК-вакцин. Например, DOTMA – четвертичный аммониевый липид – был использован для доставки мРНК во многие типы клеток и коммерциализирован как липофектин в сочетании с 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламином (DOPE) [21] using a synthetic cationic lipid, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)-1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан (DOTAP) – биоразлагаемый аналог DOTMA используется для доставки мРНК и входит в состав коммерческого препарата MegaFectin вместе с DOPE или холестерина [22]. DOTMA применяется и как единственный компонент в наносистеме для доставки РНК – например, липоплексы DOTMA-мРНК (РНК-LPX), нацеленные на эффективную доставку мРНК в клетки селезенки, были разработаны в качестве вакцины против системного рака [23]. Тот же состав был также разработан в качестве мРНК-вакцины для лечения аутоиммунного энцефаломиелита [24].

Несмотря на эффективную инкапсуляцию нуклеиновых кислот и высокую эффективность трансфекции *in vitro*, катионные липиды обладают множеством недостатков, что создает ограничения в применении в ГТ *in vivo*. Высокий дзета-потенциал определяет выраженную цитотоксичность и гематологическую токсичность. Для решения данной проблемы в состав наночастиц можно включить PEG (полиэтиленгликоль); однако данная модификация может отрицательно повлиять на эффективность трансфекции и создать дополнительные проблемы с безопасностью. Повышая стабильность наночастиц и увеличивая время их циркуляции в системном кровотоке, PEGилирование создает риск развития иммунного ответа при повторном введении, приводя к выработке антител против PEG. Данные антитела ускоряют выведение наночастиц из организма и могут способствовать появлению побочных реакций из-за

изменения биораспределения [25]. Другим вариантом может послужить комбинация с нейтральными липидами, однако и в данном случае необходим подбор оптимальной липидной композиции.

### 1.1.2. Анионные липиды

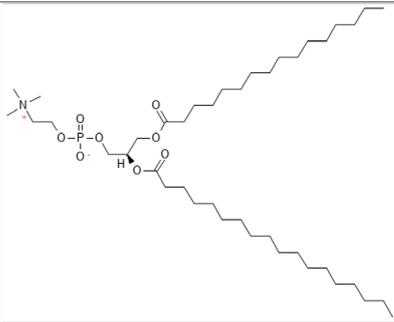
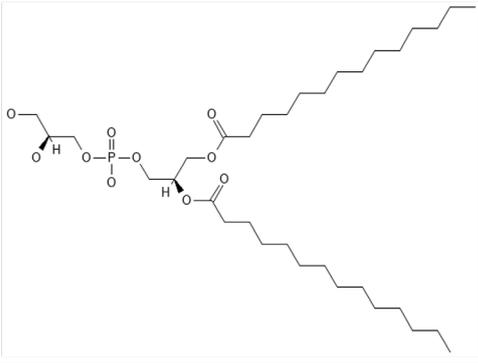
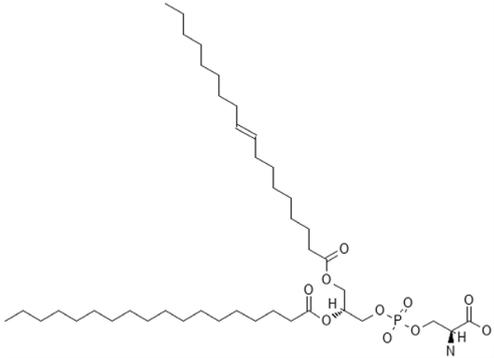
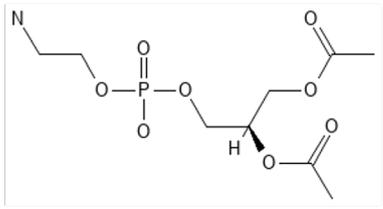
Отрицательный заряд анионных липидных соединений обусловлен наличием фосфатных групп фосфолипидов. Изначально анионные липосомы не были широко распространены в практике из-за их отрицательно заряженных групп, которые отталкивают фосфатные основания нуклеиновых кислот, что делало невозможным включение генетического материала. Для решения проблемы инкапсуляции генетического материала в анионные липосомы для применения в ГТ были использованы вспомогательные элементы в виде двухвалентных катионов (например,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  и т. д.) [20, 26] или поликатионов по типу PEI и PEG [27].

Наиболее распространенные анионные липиды для образования анионных липосом приведены на рисунке 4.

Анионные липосомы обладают более выраженной стабильностью в присутствии сыворотки крови по сравнению с катионными и нейтрально заряженными липосомами, так как они меньше способствуют агрегации частиц [28, 29]. Анионный липид DPPG (16:0/16:0 PG - 3-(((2,3-дигидроксипропокси)(гидрокси)фосфорил)окси)пропан-1,2-диилдитетрадеканоат) обладает высокой температурой фазового перехода, что увеличивает жесткость мембраны частицы и препятствует ее разрушению при взаимодействии с липопротеинами и белками сыворотки крови. Однако и отрицательный заряд на поверхности частиц способен инициировать взаимодействие с сывороточными белками, что приводит к активному поглощению частиц ретикулоэндотелиальной системой и токсическим эффектам, таким как псевдоаллергический ответ. Поэтому анионные липосомы не применяются для терапии, которая предусматривает введение препарата в системный кровоток [30].

Однако по сравнению с катионными липосомами, анионные липиды показывают более низкую цитотоксичность, в основном, из-за того, что анионные липиды по составу схожи с естественными клеточными мембранами и обладают низкой иммуногенностью. Также благодаря сходству с клеточными мембранами структура анионных липосом способствуют меньшей вероятности фагоцитоза макрофагами и медленной кинетике выведения их из организма. При модификации анионных липосом поликатионными элементами они приобретают некоторых свойства катионных липосом, однако, с менее выраженной токсичностью [20].

Анионные липосомы проникают в клетку путем эндоцитоза, как и катионные липосомы, и при этом не способны избежать воздействия лизосомальных ферментов из-за отсутствия эффекта «протонной помпы». Для увеличения эффективности трансфекции можно модифицировать анионные липосомы катионами, например,  $\text{Ca}^{2+}$ . Положительно заряженные ионы способствуют более эффективному связыванию нуклеиновых кислот [31]. Модифицированные катионами анионные липосомы приобретают риск повышенной цитотоксичности в случае избытка ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Также анионные липосомы,

Структура	Аббревиатура	Наименование IUPAC
	PC	[(2R)-3-гексадеканоилокси-2-октадеканоилоксипропил] 2-(триметилазаниум)этил фосфат
	PG	2,3-бис[[Z]-октадек-9-еноил]окси]пропил-триметилазаниум
	PS	(2S)-2-амино-3-[гидрокси-[(2R)-2-октадеканоилокси-3-[(Z)-октадек-9-еноил]оксипропокси]фосфорил]оксипропановая кислота
	PE	[(2R)-2-ацетилокси-3-[2-аминоэтокси(гидрокси)фосфорил]оксипропил] ацетат

**Рисунок 4.** Примеры структур анионных липидов [13] (CC BY-SA 4.0).

сопряженные с катионами, имеют размер частиц около 500 нм, тогда как наиболее оптимальный размер для инициации клатрин-зависимого механизма эндоцитоза – около 200 нм. В связи с этим модификация анионных липосом ионами  $\text{Ca}^{2+}$  обладает неоднозначным влиянием на эффективность трансфекции. Поэтому необходим подбор оптимальной формулы анионных липосом, сопряженных с положительно заряженными ионами, для достижения высокой эффективности не только инкапсуляции нуклеиновых кислот, но и доставки материала в клетку [13].

С точки зрения применения в клинической практике анионные липосомы имеют потенциал в разработке трансдермальных лекарственных систем. Гистологические исследования показали, что анионные липосомы эффективнее, чем катионные липосомы, диффундируют в дерму и волосяные фолликулы и проявляют менее выраженный раздражающий эффект. Однако из-за отрицательного заряда добиться эффективного включения генетического материала и трансфекции с использованием немодифицированных анионных липосом не удается [30, 32].

### 1.1.3. Электронейтральные и цвиттерионные липиды

Электронейтральные и цвиттерионные липиды имеют постоянный нейтральный заряд, поэтому их основной функцией является стабилизация структуры липосом и липидных наночастиц. К этой группе относятся фосфатидилхолин, холестерин и ЕРС (нейтрально заряженные); DSPE (1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфэтаноламин), DPPC (1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин) и DOPE (1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфэтаноламин) (цвиттерионные).

Наиболее распространенные электронейтральные липиды в составе липосом приведены на рисунке 5.

Для электронейтральных липидов сохраняется проблема инкапсуляции генетического материала: для переноса ДНК в составе частиц все еще необходима модификация катионными элементами. Нейтральные липосомы имеют преимущества в виде низкой токсичности, поскольку они не предрасположены к взаимодействию с белками сыворотки крови. Благодаря нейтральному заряду частицы могут длительное время находиться в организме, однако этот тип липосом может стохастически высвобождать свое содержимое в системном кровотоке [30].

Электронейтральные липиды используют в основном для модификаций катионных и анионных липосом в качестве линкеров в составе молекул или в качестве элементов для улучшения проникновения через мембрану клетки. Данная особенность связана со способностью цвиттерионных липидов принимать гексагональную форму при взаимодействии с клеточной мембраной (либо другими отрицательно заряженными липидами), по сути, переход из ламеллярной структуры в неламеллярную, что способствует эндоцитозу и диссоциации нуклеиновой кислоты из липоплекса, облегчая высвобождение в цитоплазму [33].

В некоторых случаях модификация цвиттерионными липидами помогает избежать стандартный путь эндоцитоза в клетки с последующей деградацией под действием лизосомальных ферментов. Липосомы, состоящие из нейтрально заряженного липида DOPE и катионного липида DOTAP, демонстрируют прямое слияние с клеточной мембраной в течение нескольких минут после контакта, что обеспечивает эффективную доставку молекулярного груза в цитоплазму клеток независимо от размера данного груза [34].

Однако существует проблема парадоксального распределения электронейтральных липидов в составе липосомы в комбинации с другими типами липидов. Молекулы цвиттерионных липидов в составе липосом обладают отрицательной кривизной, что объясняет их распределение на внутренней стороне липосомы. Такое распределение может, наоборот, увеличить энергию активации для слияния липосомы с мембраной клетки, то есть служить препятствием для данного процесса [35].

Реже сами липосомы из электронейтральных липидов модифицируют целевыми системами [36]. Нейтральный заряд облегчает внесение большинства целевых систем, например, для доставки в опухолевые новообразования.

Цвиттерионные липиды могут улучшать свойства других липидных наночастиц – увеличивать их стабильность, эффективность доставки и оптимизировать биораспределение. Например, в разработанной вакцине

мРНК-1273 против COVID-19 от компании «Moderna» (США) один из ключевых компонентов липидного состава наночастиц – DPPC (1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин). Данный фосфолипид содержит полностью насыщенные цепи, благодаря которым он создает упорядоченные липидные домены, помогающие создавать сплошную бислойную структуру для защиты мРНК от нуклеаз [37]. Также в вакцине мРНК-1273 от «Moderna» в составе липидных наночастиц содержится электронейтральный холестерин для поддержания текучести мембраны и предотвращения агрегации липидных частиц. Холестерин модулирует фазовый переход при смене температур, что позволяет хранить вакцину при  $-20^{\circ}\text{C}$ , что а не при  $-80^{\circ}\text{C}$ , что необходимо для некоторых препаратов [20].

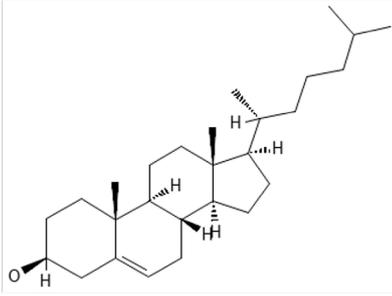
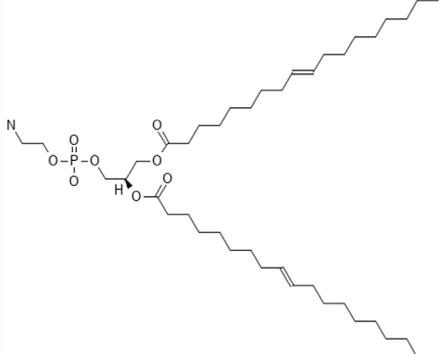
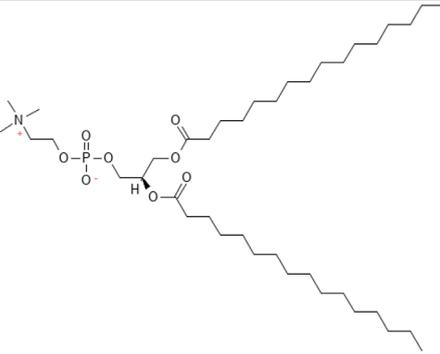
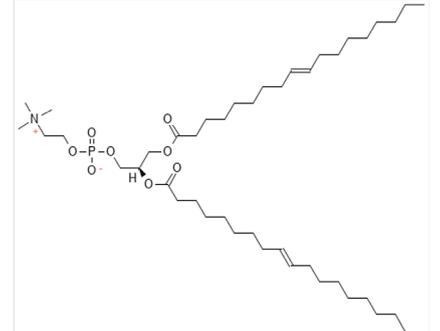
В вакцине BNT162b2 против COVID-19 компании «Pfizer-BioNTech» (Германия) фосфолипид DSPC (1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин) также благодаря насыщенным цепям обеспечивает стабильность липидного бислоя в составе наночастиц, а холестерин играет роль в текучести и механической прочности липидной мембраны и снижает проницаемость для воды, защищая инкапсулированную молекулу РНК [38].

Модификация липидных наночастиц холестерином или его производными может влиять на таргентность полученной системы. Липидные наночастицы, содержащие олеат холестерина, демонстрируют более высокую селективность в отношении эндотелиальных клеток сосудов печени нежели самих гепатоцитов [39]. Окислительные модификации холестеринового хвоста также позволяют липидным наночастицам накапливаться преимущественно в эндотелиальных клетках и клетках Купфера, но не в самих гепатоцитах [40].

Цвиттерионные липиды в основном применяются как вспомогательные соединения для стабилизации липидной оболочки в наночастицах и для облегчения эндоцитоза благодаря схожими с липидами мембраны клетки структурными свойствами. Однако для инкапсуляции нуклеиновых кислот нейтральные липиды не могут быть применены «в самостоятельном виде», для этого необходима модификация катионными липидами. В итоге все еще наблюдается сохранение токсичности, а для увеличения стабильности липидных векторов с цвиттерионными липидами и увеличения эффективности доставки нуклеиновых кислот необходима оптимизация липидных композиций.

До сих пор для *in vitro* экспериментов остается популярным способ трансфекции с использованием Липофектина – смеси катионного липида DOTMA (1,2-диолеоилокси-3-(триметиламмоний) пропан) и нейтрального липида DOPE (1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфэтаноламин) либо другой современной вариации данной липидной смеси [41]. Однако при введении в организм наличие постоянного заряда у данной системы доставки определяет уже упомянутое неприемлемое для клинических испытаний токсическое воздействие, неспецифическое связывание с внеклеточными и клеточными компонентами и короткий период полувыведения.

При попытке введения в состав липидной смеси PEG, который обволакивал заряженные липидные наночастицы, удалось добиться улучшения параметров биораспределения и продлить период полувыведения. Однако при избытке

Структура	Аббревиатура	Наименование IUPAC
	Холестерол	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-диметил-17-[(2R)-6-метилгептан-2-ил]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-додекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ол
	DOPE	[(2R)-3-[2-аминоэтокси(гидрокси) фосфорил]окси-2-[(Z)-октадек-9-еноил]оксипропил] (Z)-октадек-9-еноат
	DPPC	[(2R)-2,3-ди(гексадеканоиокси)пропил] 2-(триметилазаниумил)этилфосфат
	DOPC	[(2R)-2,3-бис[[Z]-октадек-9-еноил]окси]пропил] 2-(триметилазаниумил)этилфосфат

**Рисунок 5.** Примеры структур нейтрально заряженных липидов [13] (CC BY-SA 4.0).

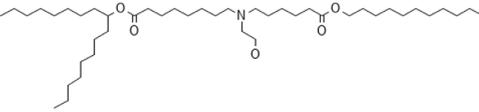
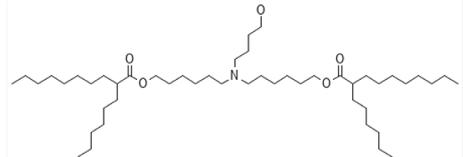
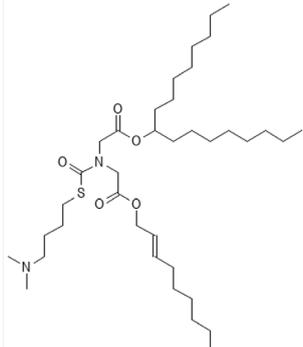
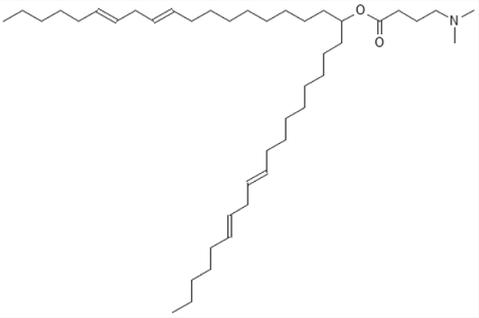
PEG понижается эффективность трансфекции и нарушается оптимальное распределение в клетке [42].

#### 1.1.4. Ионизируемые липиды

Самым перспективными системами доставки нуклеиновых кислот на данный момент среди липидных соединений являются ионизированные липиды. Они представляют собой катионные липиды, в которых аммониевый фрагмент заменен на титруемый, в результате чего заряд данных липидов определяется

$pK_a$  соединения и pH среды [43]. Структуры наиболее распространенных ионизируемых липидов приведены на рисунке 6.

Самые первые исследования *in vivo* на приматах с синтезированными ионизируемыми липидами первого поколения (DLin-DMA (1,2-диолеил-N,N-диметил-3-аминопропан)) были проведены в 2006 году [45]. А уже в 2018 году FDA и EMA был одобрен первый препарат на основе интерференционных олигонуклеотидов и первый препарат с ионизированным липидом в составе Патисиран (коммерческое название Onpatro) [46].

Структура	Аббревиатура	Наименование IUPAC
	SM-102	Гептадекан-9-ил 8-[2-гидроксиэтил-(6-оксо-6-ундеоксигексил)амино]октаноат
	Alc-0315	6-[6-(2-гексилдеканоилокси)гексил-(4-гидроксибутил)амино]гексил 2-гексилдеканоат
	ATX-0114	[(Z)-нон-2-енил] 2-[4-(диметиламино)бутилсульфанилкарбонил-(2-гептадекан-9-илокси-2-оксоэтил)амино]ацетат
	DLin-MC3-DMA	[(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил] 4-(диметиламино)бутаноат

**Рисунок 6.** Примеры структур ионизируемых липидов [44] (CC BY-SA 4.0).

В вышеупоминавшейся вакцине мРНК-1273 против COVID-19 от компании «Moderna» основным компонентом липидного носителя является ионизируемый липид SM-102 (гептадекан-9-ил 8-((2-гидроксиэтил) (6-оксо-6-(ундецилокси)гексил)амино)октаноат), который обеспечивает эффективную упаковку молекулы РНК. Аналогичную функцию выполняет ионизируемый липид ALC-0315 ((4-гидроксибутил)азанедиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканоат) в составе вакцины BNT162b2 против COVID-19 компании «Pfizer-BioNTech». Однако, согласно данным молекулярной динамики, более

объемная головная группа молекулы липида ALC-0315 по сравнению с липидом SM-102 снижает плотность упаковки [38].

Механизм сборки липидных наночастиц на основе ионизированных липидов с включенной в них нуклеиновой кислотой и механизм дальнейшей трансфекции заключаются в следующем [44, 47]:

1) Для взаимодействия отрицательно заряженной нуклеиновой кислоты с липидным компонентом необходим положительный заряд последнего. Для этого создается кислая среда, так как ионизируемые липиды, в отличие от

нейтральных, способны приобретать положительный заряд (протонироваться) при таких условиях.

2) В физиологических условиях (рН 7.4) наночастицы на основе ионизируемых липидов становятся почти нейтральными, что позволяет избежать захват иммунными клетками в тканях и препятствует опсонизации в системном кровотоке. Нейтральный заряд также снижает токсический эффект на клетки и способствует эндоцитозу.

3) Клеточный захват наночастиц происходит по эндоцитарному пути. При внутривенном введении этому могут способствовать специфические белки сыворотки крови, которые адсорбируются на поверхности частиц [48]. Так, например, может происходить захват наночастиц гепатоцитами благодаря взаимодействию аполилиппротеина E, адсорбированного на поверхности наночастиц, с рецепторами липопротеинов низкой плотности на поверхности клеточной мембраны [49].

4) После проникновения в клетку в эндосоме под действием кислой среды (рН 5.0-6.5) ионизируемые липидные наночастицы снова приобретают положительный заряд и запускают механизм протонной помпы, дестабилизируя мембрану эндосомы. Положительные заряды липидов либо сама конусовидная структура липидов определяют образование небислойной структуры (например, гексагональной), что также дестабилизирует мембрану эндосомы и способствует высвобождению нуклеиновой кислоты в цитозоль (рН 7.2) для ее дальнейшей реализации. Однако некоторые исследователи отмечают довольно низкую эффективность высвобождения вносимой нуклеиновой кислоты из эндосомы: в цитозоле визуализируется менее 2-3% мРНК [50].

Один из самых важных этапов трансфекции – высвобождение нуклеиновой кислоты из эндосомы для последующей реализации генетической информации. Клеточные исследования с ионизированными липидными наночастицами с использованием электронной и конфокальной микроскопии показали, что в цитозоль из эндосомы при доставке с использованием ионизированного липида DLin-MC3-DMA (MC3) высвобождается только 1-2% меченых золотом или флуоресцентными метками мРНК [51]. Gilleron и соавт. также описали особенности созревания эндосомы, анализируя наличие специфических маркеров [51]. В результате трансфекции ионизируемыми липидными наночастицами наблюдалась задержка созревания эндосомы и образование гибридного эндосомального компартмента, несущего как ранние маркеры (EE1, рабанкирин-5), так и поздние маркеры (LAMP1) [51]. Однако данные методы прямой визуализации мРНК оптимизированы для липоплексов (липидных наночастиц с положительно заряженными липидами в составе) и не совсем применимы для ионизируемых липидных частиц, возможно, из-за низкой нагрузочной способности последних по сравнению с крупными липоплексами. Но и в других исследованиях при оценке косвенных индикаторов – рекрутирование белков галектинов (Gal8 и Gal9 – белки, рекрутирующие поврежденные эндосомы) – фактическая цитозольная доставка мРНК составляет менее 5% [50, 52].

При попытке внесения в клетки мРНК, более крупной молекулы по сравнению с мРНК, в составе липидных наночастиц на основе ионизируемых липидов количество

высвобожденной из эндосомального компартмента нуклеиновой кислоты снизилось до 1% [53].

Ионизируемые липиды в составе липидных наночастиц остаются одними из самых перспективных композиций для невирусной генной терапии. Однако и у данного вида липидных соединений все еще сохраняется риск токсичности из-за положительного заряда ионизируемых наночастиц, даже если он не постоянный [54].

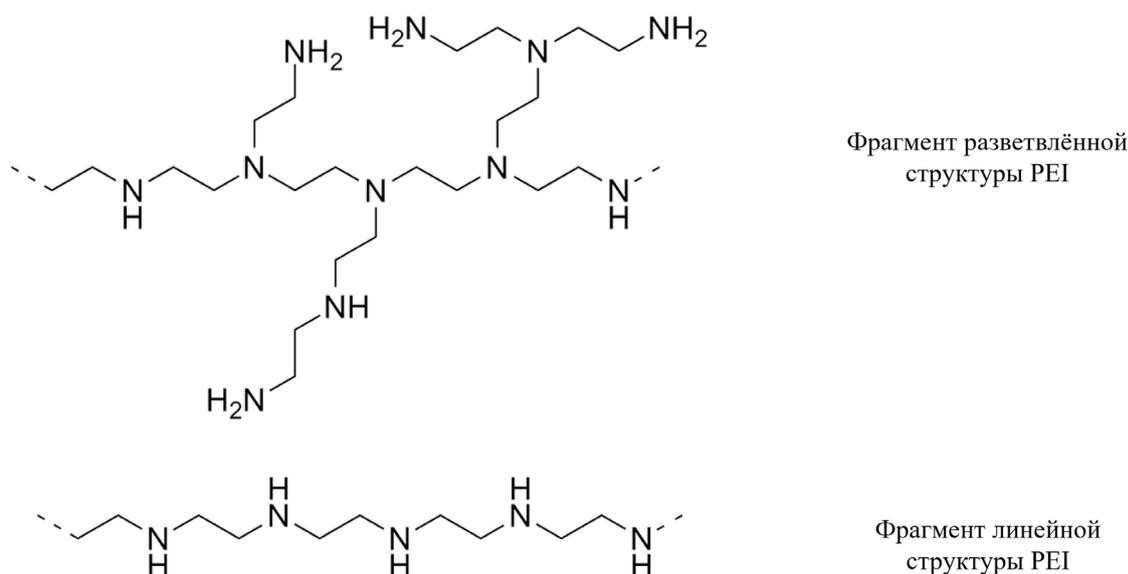
Среди разрабатываемых решений для уменьшения токсичности обычных ионизируемых липидов одним из самых успешных является их замена на гликолипиды трегалозы, которые расщепляются на нетоксичные метаболиты после доставки своего «груза». Эти модифицированные липидные наночастицы (LNP S050L) продемонстрировали значительно более низкую токсичность для различных органов при сохранении эквивалентной иммуногенности [25]. Также предлагается оптимизация липидных молекул с целью изменения кинетики гидролиза, в результате чего липиды расщепляются в организме быстрее с образованием нетоксичных метаболитов [55]. Однако такая оптимизация может уменьшить эффективность доставки генетического материала. Для решения проблемы с неблагоприятной ионизацией липидов необходима структурная модификация – изменение  $pK_a$  молекулы до оптимальных значений, позволяющих липидным носителям высвобождать нуклеиновые кислоты и не оказывать токсическое воздействие на мембраны клетки [56].

Липидные системы доставки хоть и обладают многообещающими возможностями для ГТ, их применение в клинике все еще ограничено токсичностью и преимущественным накоплением в печени. Но, несмотря на то, что их безопасность требует тщательного изучения, появляются инновационные подходы, позволяющие решить эти проблемы:

1) Для таргетинга нейронов и глиальных клеток исследователи медицинского комплекса Маунт-Синай из Нью-Йорка разработали липидные наночастицы, конъюгированные с аминоклидами, способные преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) для доставки мРНК при внутривенной инъекции [57].

2) Для снижения токсичности команда исследователей «Sanofi» (Франция) оценивала влияние PEGилированных липидов на эффективность доставки мРНК. Как было упомянуто ранее, наличие PEG в формуле может способствовать развитию иммунного ответа уже при повторном введении. Для снижения иммунных реакций можно подобрать биосовместимые аналоги PEG. К ним относятся полисаркозин (pSar), который способен подавлять активацию системы комплемента и секрецию провоспалительных цитокинов [25], и хитозан, способный улучшить адгезию к слизистой оболочке и понизить вероятность неспецифических межклеточных контактов [58].

3) Для снижения иммунных реакций после введения липидных наночастиц исследователи из университета Пенсильвании разработали новую формулу, в состав которой входит нитроолеиновая кислота, обладающая противовоспалительным эффектом [59].



**Рисунок 7.** Изображение фрагментов разветвленной и линейной структур PEI.

## 1.2. Системы доставки на основе катионных полимеров

### 1.2.1. Небиodeградируемые полимеры

Несмотря на относительно несложный синтез липидных соединений, применение некоторых из них ограничено достаточно выраженной токсичностью. Альтернативным вариантом систем доставки могут служить катионные полимеры. Данная группа веществ обладает большей стабильностью и структурной пластичностью по сравнению с липидами.

Катионные полимерные соединения для сборки комплекса с отрицательно заряженной молекулой ДНК положительно заряженным полимером (полиплексов) можно разделить на две группы: биodeградируемые природные полимеры и небиodeградируемые синтетические полимеры.

#### 1.2.1.1. Полиэтиленимин (PEI)

PEI был первым поликатионным полимером, синтезированным как в линейной, так и в разветвленной формах для ГТ еще в 1995 году. Он имеет уникальное расположение аминогрупп на основной цепи полимерной цепи, позволяющее только частичное протонирование в физиологическом диапазоне pH. PEI существует в двух различных химических структурах (рис. 8), а именно в разветвленной (BPEI) и линейной (LPEI), которые предпочтительно использовать при высокой молекулярной массе (HMW) 25 кДа и 22 кДа соответственно. В то время как BPEI содержит различные первичные, вторичные и третичные амины, LPEI содержит только вторичные амины [60].

После конденсации генетического материала с помощью PEI образуются очень стабильные при комнатной температуре полиплексы, которые также можно подвергать длительной заморозке.

Механизм проникновения в клетки полиплексов на основе PEI в основном клатрин-зависимый, так как частицы имеют размер в диапазоне от 60 нм до 200 нм. По такому механизму поглощенные клеткой наночастицы направляются в эндо-/ лизосомальные компартменты, что

уменьшает эффективность трансфекции из-за разрушения частиц лизосомальными ферментами. Однако присутствие заряженного PEI вызывает осмотический эффект (эффект «протонной губки»), вызывающий разрыв эндосом, что, как полагают, повышает эффективность доставки после трансфекции. Сегодня PEI с молекулярной массой 25 кДа является наиболее широко используемым агентом для переноса генов и «золотым стандартом» (положительным контролем) для оценки эффективности трансфекции невирусных векторов *in vitro* [61].

Богатая аминогруппами основа PEI позволяет легко модифицировать молекулу, что увеличивает специфичность и стабильность структуры, конъюгируя ее с лигандами и функциональными полимерами.

Несмотря на то, что PEI считается вектором с высокой эффективностью трансфекции *in vitro*, он все же обладает недостаточной специфичностью и эффективностью трансфекции *in vivo*. PEI – это небиodeградируемый полимер, который обладает цитотоксичностью. Помимо того, что токсичность тесно связана с катионными свойствами наночастиц, PEI сам имеет свойства поверхностно-активного вещества и способен разрушать целостность липидных бислоевых мембран, что приводит к их истончению и эрозии. Структура, степень разветвления и молекулярная масса полимера определяют плотность катионного заряда. Высокая плотность заряда способствует конденсации нуклеиновых кислот, проникновению в клетку и выходу из эндосомы, однако, с другой стороны, высокая плотность положительного заряда вызывает разрушение клеточных компартментов и неспецифическое связывание анионных молекул [62]. Для уменьшения токсичности из-за высокой плотности положительного заряда предлагаются попытки экранирования полисахаридными соединениями, например, декстраном [63], крахмалом [64] и хитозаном [65], и экранирования гидрофобными молекулами – бетаметазоном, гидрокортизоном [66], холестерином [67], олеиновой [68] и гиалуроновой кислотами [69].

Молекула PEI не подвергается биологическому разложению, что приводит к накоплению токсичного для клеток организма поликатиона. Однако известно, что PEI с низкой молекулярной массой обладает меньшей

токсичностью по сравнению с PEI с высокой молекулярной массой. Поэтому одним из подходов в уменьшении токсичности поликатиона является подбор биоразлагаемых линкеров для сшивания молекул PEI с низкой молекулярной массой для получения в конечном итоге высокомолекулярного PEI. Благодаря данному подходу удается добиться, с одной стороны, высокой плотности положительного заряда для конденсации нуклеиновых кислот, а с другой – сохранения низкой токсичности при биоразложении линкера. Также благодаря разрывам в цепи поликатиона в местах линкеров осуществляется высвобождение вектора для его дальнейшей реализации. В качестве линкеров могут быть окислительно-восстановительные элементы – сложные эфиры [70], дисульфиды [71] и карбаматы [72], и pH-чувствительные линкеры – глутаровый диальдегид [73], гидразон [74] и полиаспартаты [75].

Согласно литературным данным, на данный момент было проведено около 38 клинических испытаний с использованием препаратов на основе PEI для доставки нуклеиновых кислот. В большинстве из этих испытаний применяются местные способы введения PEI, такие как внутриопухолевое [76], внутримышечное [77], внутрибрюшинное [78] и внутрипузырное [79]. Например, BC-819 (инодифтаген викстеплазмида) представляет собой рекомбинантную плазмидную ДНК, которая направляет экспрессию сильнодействующего токсина специфично в злокачественных клетках, но не в нормальных тканях. Она была разработана с использованием гена Н19, который активируется и экспрессируется на высоких уровнях только в злокачественных опухолях и активирует продукцию бактериального дифтерийного токсина в клетках раковой опухоли мочевого пузыря. BC-819 вводится непосредственно в мочевой пузырь, чтобы обеспечить максимальное местное воздействие на целевые раковые клетки мочевого пузыря. Для увеличения эффективности трансфекции образовывали комплекс плазмидной ДНК с полиэтиленимином (PEI); однако в 2020 году данные клинические исследования были остановлены из-за отсутствия эффективности [80, 81].

Еще одним примером использования данной системы стал препарат CYL-02 - пДНК, кодирующий второй подтип рецептора соматостатина (SSTR2), дезоксицитидинкиназы (DCK) и уридинмонофосфаткиназы (UMK) под контролем глюкозо-зависимого промотора. Введение этого препарата пациентам с аденокарциномой поджелудочной железы осуществлялось в комплексе с коммерчески доступным *In vivo*-jetPEI, однако результаты клинических исследований данного препарата пока не опубликованы [76, 82].

Из-за все еще существующей высокой токсичности и низкой биосовместимости PEI, в клинических испытаниях избегают системного введения. И ни одна из модифицированных генных терапий на основе PEI еще не получила одобрения FDA. Основываясь на последних тенденциях в области клинических исследований терапии на основе PEI, можно предположить, что проблема токсичности до сих пор не решена. Это находит свое отражение в небольшом количестве данных в литературе о продолжающихся испытаниях.

### 1.2.1.2. Полиэтиленгликоль (PEG)

PEG является распространенным дополнительным компонентом, вносимым для модификации невирусных

наносистем, предназначенных для доставки генетического материала. Применение самого полимера PEG в качестве носителя ДНК или РНК затрудняется вследствие химических свойств полимера, у которого отсутствуют положительно заряженные группы для образования комплексов с молекулами нуклеиновых кислот. Однако PEG способен улучшать свойства наночастиц на основе катионных полимеров или липидов, увеличивая их стабильность в жидкостях организма. PEG-цепи имеют гидрофильную природу, что при их присоединении к наночастицам способствует образованию гидратированного объемного облака, которое стерически препятствует взаимодействию наночастиц с соседними наночастицами или компонентами крови. (42) Так, например, PEG-липиды могут дополнительно способствовать стабильности частиц за счет уменьшения их агрегации, а некоторые модификации PEG продлевают время циркуляции в крови наночастиц за счет уменьшения клиренса, опосредованного почками и системой мононуклеарных фагоцитов [83–85].

Наконец, PEG-липиды можно использовать для конъюгирования специфических лигандов с частицей для адресной доставки. Степень этих эффектов зависит от пропорций и свойств PEG-липидов. Например, 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000 (ПЭГ2000-DMG) и 1,2-дистеароил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000 (ПЭГ2000-DSG) являются нейтральными PEG-липидами, а длина их насыщенных алкильных цепей составляет C14 и C18 соответственно. Составы липидных наночастиц и миРНК, содержащие PEG2000-DMG, имеют более короткое время циркуляции и более высокую эффективность доставки *in vivo*, чем составы, содержащие PEG2000-DSG129. Это различие можно объяснить более быстрой диссоциацией PEG2000-DMG от липидных наночастиц по сравнению с PEG2000-DSG, что может способствовать клеточному поглощению и выходу из эндосом липидных наночастиц [86, 87].

В некоторых исследованиях *in vitro* при модификации поликатионных полимеров с помощью PEG ухудшилась стабильность частиц и увеличилась иммуногенность. Однако в исследованиях *in vivo*, наоборот, частицы на основе PEI, модифицированные PEG, демонстрировали более высокую стабильность, все еще вызывая иммунный ответ, но без гистологических изменений. Введение немодифицированных комплексов PEI/миРНК приводило к накоплению PEI в легких и слишком раннему высвобождению миРНК [88].

Наночастицы, модифицированные PEG, могут успешно преодолевать также и различные внеклеточные барьеры, что благоприятно при других способах введения препарата, например, через слизистую оболочку или в ткани головного мозга [42].

Как было указано ранее, включение в состав наночастиц PEG может отрицательно повлиять на эффективность трансфекции и увеличить иммуногенность при повторном введении комплексов наночастиц с нуклеиновой кислотой. Данный эффект обусловлен выработкой антител против PEG, которые ускоряют выведение наночастиц из организма и способствуют появлению побочных реакций из-за нарушения биораспределения [25].

Наличие PEG в составе наночастиц также приводит к ограничению во взаимодействии с клеточными мембранами.

Для решения данной дилеммы были предложены расщепляемые PEG-липидные комплексы, которые “сбрасываются” с поверхности наночастиц при воздействии условий клеточного микроокружения (например, восстановительных условий, pH или ферментативной активности), что позволяет мембране наночастицы и клеточной мембране взаимодействовать для дальнейшей интернализации внутрь клетки [25].

PEG является критически важным и клинически подтвержденным компонентом в нескольких одобренных FDA генотерапевтических препаратах и препаратах на основе РНК, особенно в составах LNP для доставки РНК. В том же вышеупомянутом препарате Патисиран липид в составе липидных наночастиц модифицирован PEG. Аналогичная модификация липидных компонентов в составе липидных наночастиц присутствует и в других одобренных FDA генотерапевтических препаратах – вакцинах против COVID-19 Комирнати (BNT162b2) от «Pfizer-BioNTech» и Spikevax (мРНК-1273) от «Moderna» [89].

### 1.2.2. Биодegradуемые полимеры

Учитывая, что для ГТ часто необходимо повторное введение препарата и предпочтительна сниженная цитотоксичность, биоразлагаемые полимерные векторы, как синтетические, так и природные, имеют явное преимущество перед небiorазлагаемыми. Синтетические полимеры обладают превосходной универсальностью химической структуры и стабильностью в производстве, но они могут обладать недостатками в плане взаимодействия с клетками. Напротив, природные полимеры обладают высокой биосовместимостью, но имеют проблемы в промышленном производстве из-за разницы в происхождения исходного сырья.

#### 1.2.2.1. Полилактид (PLA)

Полилактиды – гомополимеры молочной кислоты (PLA, англ. polylactic acid) и ее сополимеры с гликолевой кислотой (PLGA, англ. poly(lactide-co-glycolide) acid), а также полиалкилцианоакрилаты (PACA, англ. poly(alkylcyanoacrylates)) являются примерами относительно безопасных (малотоксичных) синтетических полимеров, подходящих для создания наносомальных лекарственных форм вследствие их биосовместимости и способности к деградации в организме.

PLA представляет собой синтетический биоразлагаемый полимер, широко применяемый для доставки лекарственных средств. Остаток карбоновой кислоты в составе полимера *in vivo* гидролизуеться в молочную кислоту и быстро превращается в глюкозу, выводимую из организма без выраженных побочных эффектов. В настоящее время PLA вызывает интерес с точки зрения разработки частиц для целевой доставки, что возможно посредством различных модификаций структуры носителя. В многочисленных исследованиях показана перспективность применения наночастиц на основе биосовместимых и биодegradуемых полимеров, таких как сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLA/PLGA), как систем доставки широкого спектра противоопухолевых веществ, антибиотиков, антисептиков, противовоспалительных веществ, антиоксидантов, белков и нуклеиновых кислот.

Сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) используется в составе многих одобренных FDA лекарственных препаратов с модифицированным высвобождением, среди которых микросферы (Vivitol®, Lupron Depot®, Sandostatin LAR®, Risperdal Consta®, Trelstar®, Bydureon®) и имплантаты *in situ* (Eligard®, Sublocade®). Сополимеры молочной и гликолевой кислот отличаются низкой токсичностью, высокой биосовместимостью и способностью к биодegradации, что обуславливает их широкое применение при разработке систем адресной доставки и депо-форм.

В некоторых исследованиях *in vivo* наночастицы PLGA применяли в качестве трансмукозальных наноносителей ДНК. Наночастицы на основе полилактоидов имеют способность преодолевать барьер слизистой оболочки носа и транспортировать связанную модельную ДНК-вакцину [90].

В другом исследовании также использовали наночастицы PLGA в качестве систем доставки генов для восстановления и регенерации хряща. Наночастицы PLGA опосредовали доставку pDNA-SOX9 в мезенхимальные стволовые клетки человека (hMSC) и стимулировали хондрогенез у самок мышей с помощью модели подкожной имплантации [91].

Авторы ряда исследований также утверждают, что наночастицы PLGA могут легко защищать нуклеиновые кислоты от разрушения, обеспечивая контролируемое высвобождение нуклеиновой кислоты в цитоплазме, что приводит к экспрессии генов, которая может поддерживаться более месяца. Наночастицы PLGA способны инкапсулировать большие (плазмидные ДНК) и малые (миРНК) нуклеиновые кислоты; однако короткие олигонуклеотиды часто демонстрируют кинетику взрывного высвобождения, что может привести к нецелевой доставке *in vivo*.

Однако все еще нет одобренных FDA генотерапевтических препаратов на основе PLA или PLGA. Также химическая модификация молекул PLGA все еще является сложной задачей [92].

#### 1.2.2.2. Хитозан (CS)

Хитозан (CS) представляет собой линейный полисахарид и один из наиболее распространенных природных углеводных полимеров; он отличается биоразлагаемостью, высокими показателями биосовместимости и низкой токсичностью. Хитозан является производным хитина – вторым по распространенности в мире природным полимером после целлюлозы. Получают хитозан путем деацетилирования хитина гидроксидами при высоких температурах. Поскольку  $pK_a$  хитозана 6.5, он растворим только в кислой среде, когда большинство аминогрупп протонируются с образованием комплекса с генетическим материалом.

На химические свойства хитозана влияет степень деацетилирования молекулы – соотношение двух звеньев в составе молекулы: D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных 1,4-гликозидными связями. Растворимость хитозана в водно-кислых средах увеличивается при достижении показателя степени деацетилирования в 50%, так как при этом происходит протонирование аминогрупп, благодаря чему молекула хитозана приобретает катионные свойства.

Хитозан, обладая рядом благоприятных свойств, является перспективным носителем для генетического материала. Однако его применение в нативной форме ограничено низкой растворимостью в физиологических условиях, что стимулировало разработку модифицированных производных с улучшенными характеристиками [93]. Наибольший интерес представляет гидрофильная модификация, поскольку она значительно увеличивает растворимость полимера. Одним из наиболее распространенных методов является РЕГиление – ковалентное присоединение PEG к хитозановой матрице. Однако, как уже было упомянуто ранее, модификация с помощью молекулы PEG может ухудшить эффективность трансфекции и вызвать иммунный ответ при повторном введении наночастиц. Поэтому появились подходы с альтернативными модификациями хитозана. При четвертичном аммониевым замещении гидроксильной группы получается производное хитозана – N,N,N-триметилхитозан (ТМС), который проявляет высокую растворимость в широком диапазоне рН и имеет повышенный положительный заряд, усиливающий взаимодействие с клеточными мембранами и, соответственно, трансфекционную эффективность [94, 95].

Улучшенная система доставки на основе ТМС, модифицированная карбоксиметилдекстраном (ТМС-CMD), менее подвержена агрегации и обладает более высокой эффективностью трансфекции – более 70% в *in vitro* экспериментах [96].

Растворимость хитозана в водной среде можно повысить, образуя соли как с органическими, так и с неорганическими кислотами. В нескольких исследованиях изучали влияние различных солей хитозана, таких как гидрохлорид хитозана (СНУ), лактат хитозана (СL), ацетат хитозана (САС), аспартат хитозана (САС) и глутамат хитозана (СGL), на комплексы хитозан-ДНК и эффективность трансфекции, и было заявлено, что их можно использовать в качестве безопасных векторов для доставки генетического материала [97, 98].

По состоянию на 2025 год ни один препарат генной терапии на основе хитозана не одобрен FDA. Однако хитозан используется в клинических испытаниях для других целей (например, для заживления ран, доставки лекарственных веществ), а доклинические исследования расширяют его потенциал в генной терапии.

## 2. ПОДХОДЫ К ВЫБОРУ СИСТЕМ ДОСТАВКИ

Большую роль в выборе систем доставки генетического материала в виде наночастиц играет их размер:

1) Частицы размером более, чем 500 нм, задерживаются во внеклеточном матриксе, что препятствует проникновению в ткани [99].

2) Частицы менее 100 нм имеют высокую удельную поверхность, что может привести к слишком быстрому высвобождению инкапсулированных действующих веществ и снижению агрегационной устойчивости наносuspensions.

3) Важной характеристикой в выборе наночастиц относительно их способности к поддержанию устойчивости коллоидной системы является дзета-потенциал ( $\zeta$ -потенциал). При значениях дзета-потенциала 0+30 мВ система обладает

низкой устойчивостью, что может привести к коагуляции и флокуляции.

К молекулярным механизмам клеточного поглощения наночастиц относятся:

1) Клатрин-зависимый эндоцитоз инициируется для частиц размером менее 200 нм путем специфического связывания лигандов с рецепторами клеточной мембраны [61].

2) Кавиолин-зависимый эндоцитоз характерен для доставки частиц размером менее 60 нм или активируется лигандами, такими как фолиевая кислота, альбумин или холестерин. Дальнейший внутриклеточный путь позволяет избежать лизосомальной деградации [100].

3) Прямое проникновение катионных частиц через клеточную мембрану за счет образования временных пор мембраны или за счет дестабилизации мембраны электростатическим взаимодействием [101].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы ГТ переживает прорыв, делая возможным её применение в различных терапевтических областях. Отсутствие популярности в клинических исследованиях у невирусных комплексов для доставки генетического материала объясняется, скорее всего, их низкой эффективностью трансфекции и, в некоторых случаях, выраженной токсичностью. Так, например, в случае поликатионных конструкций неизбежно появление “дилеммы”, связанной с наличием положительного заряда.

Одними из преимуществ невирусных систем доставки является их высокая нагрузочная способность, легкость синтеза и высокая модификационная пластичность, что позволяет в некоторых случаях устранить проблему токсичности. Среди невирусных систем доставки в клинических исследованиях многие конструкции представлены в виде сополимеров, модифицированных другими соединениями наночастиц. Примеры препаратов невирусной генной терапии, дошедших до клинических исследований, представлены в таблице 1.

Прогрессовобластивозникновения невирусных систем доставки генетического материала в качестве многообещающих препаратов кажется медленным из-за присущей многим из данных систем токсичности, не менее выраженной, чем у вирусных векторов, и низкой эффективности трансфекции. Однако, это проблема отсутствия хорошо разработанных рецептов по созданию оптимального невирусного комплекса и недостаток в исследовательской базе знаний о детальных механизмах трансфекции данных комплексов и экспрессии генов. Возможность осуществления модификации невирусных систем позволяет обрести многообещающий потенциал, в частности, в области онкологии, вакцинации и легочных заболеваний. Мы считаем, что новые рационально разработанные невирусные векторы лишаются недостатков в отношении стабильности в организме, токсичности и эффективного высвобождения нуклеиновых кислот с дальнейшей экспрессией генов. В конечном итоге такие усилия будут способствовать продвижению перспективных кандидатов к клиническим разработкам и расширят область применения генной терапии.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда №19-75-30007п (<https://rscf.ru/project/19-75-30007>)

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

- American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT). *ASGCT-Citeline Q2 2025 Report*. Retrieved from: <https://www.asgct.org/news-publications/landscape-report>
- Asokan, A. (2023). AAV vector immunotoxicity: Stopping the domino effect. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 31(12), 3357–3358. DOI: 10.1016/j.ymthe.2023.11.016
- Nayak, S., & Herzog, R. W. (2010). Progress and prospects: Immune responses to viral vectors. *Gene Therapy*, 17(3), 295–304. DOI: 10.1038/gt.2009.148
- Vranckx, L. S., Demeulemeester, J., Debyser, Z., & Gijssbers, R. (2016). Towards a Safer, More Randomized Lentiviral Vector Integration Profile Exploring Artificial LEDGF Chimeras. *PLOS ONE*, 11(10), e0164167. DOI: 10.1371/journal.pone.0164167
- Hidai, C., & Kitano, H. (2018). Nonviral Gene Therapy for Cancer: A Review. *Diseases*, 6(3), 57. DOI: 10.3390/diseases6030057
- Li, S., Huang, L. (2000) Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Therapy*, 7(1), 31-4. DOI: 10.1038/sj.gt.3301110
- Bartsch, M., Weeke-Klimp, A. H., Hoenselaar, E. P. D., Stuart, M. C. A., Meijer, D. K. F., Scherphof, G. L., & Kamps, J. A. A. M. (2004). Stabilized Lipid Coated Lipoplexes for the Delivery of Antisense Oligonucleotides to Liver Endothelial Cells In Vitro and In Vivo. *Journal of Drug Targeting*, 12(9–10), 613–621. DOI: 10.1080/10611860400013519
- Hildebrandt, I. J., Iyer, M., Wagner, E., & Gambhir, S. S. (2003). Optical imaging of transferrin targeted PEI/DNA complexes in living subjects. *Gene Therapy*, 10(9), 758–764. DOI: 10.1038/sj.gt.3301939
- Yu, W., Pirollo, K., Rait, A., Yu, B., Xiang, L., Huang, W., Zhou, Q., Ertem, G., & Chang, E. (2004). A sterically stabilized immunolipoplex for systemic administration of a therapeutic gene. *Gene Therapy*, 11(19), 1434–1440. DOI: 10.1038/sj.gt.3302304
- Zu, H., & Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *The AAPS Journal*, 23(4), 78. DOI: 10.1208/s12248-021-00608-7
- Frolov, V. A., Shnyrova, A. V., & Zimmerberg, J. (2011). Lipid Polymorphisms and Membrane Shape. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), a004747–a004747. DOI: 10.1101/cshperspect.a004747
- Zhi, D., Bai, Y., Yang, J., Cui, S., Zhao, Y., Chen, H., & Zhang, S. (2018). A review on cationic lipids with different linkers for gene delivery. *Advances in Colloid and Interface Science*, 253, 117–140. DOI: 10.1016/j.cis.2017.12.006
- Tseu, G. Y. W., & Kamaruzaman, K. A. (2023). A Review of Different Types of Liposomes and Their Advancements as a Form of Gene Therapy Treatment for Breast Cancer. *Molecules*, 28(3), 1498. DOI: 10.3390/molecules28031498
- Chatterjee, S., Kon, E., Sharma, P., & Peer, D. (2024). Endosomal escape: A bottleneck for LNP-mediated therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(11), e2307800120. DOI: 10.1073/pnas.2307800120
- Liu, Z., Wu, J., Wang, N., Lin, Y., Song, R., Zhang, M., & Li, B. (2025). Structure-guided design of endosomolytic chloroquine-like lipid nanoparticles for mRNA delivery and genome editing. *Nature Communications*, 16(1), 4241. DOI: 10.1038/s41467-025-59501-y
- Dowdy, S. F. (2023). Endosomal escape of RNA therapeutics: How do we solve this rate-limiting problem? *RNA (New York, N.Y.)*, 29(4), 396–401. DOI: 10.1261/rna.079507.122
- Cui, S., Wang, Y., Gong, Y., Lin, X., Zhao, Y., Zhi, D., Zhou, Q., & Zhang, S. (2018). Correlation of the cytotoxic effects of cationic lipids with their headgroups. *Toxicology Research*, 7(3), 473–479. DOI: 10.1039/C8TX00005K
- Dokka, S., Toledo, D., Shi, X., Castranova, V., & Rojanasakul, Y. (2000). Oxygen Radical-Mediated Pulmonary Toxicity Induced by Some Cationic Liposomes. *Pharmaceutical Research*, 17(5), 521–525. DOI: 10.1023/A:1007504613351
- Haghirsadat, F., Amoabediny, G., Naderinezhad, S., Forouzanfar, T., Helder, M. N., & Zandieh-Doulabi, B. (2018). Preparation of PEGylated cationic nanoliposome-siRNA complexes for cancer therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup1), 684–692. DOI:10.1080/21691401.2018.1434533
- Kapoor, M., & Burgess, D. J. (2012). Efficient and safe delivery of siRNA using anionic lipids: Formulation optimization studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 432(1–2), 80–90. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.058
- Malone, R. W., Felgner, P. L., & Verma, I. M. (1989). Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6077–6081. DOI: 10.1073/pnas.86.16.6077
- Felgner, J., Martin, M., Tsai, Y., & Felgner, P. L. (1993). Cationic lipid-mediated transfection in mammalian cells: “Lipofection”. *Journal of Tissue Culture Methods*, 15(2), 63–68. DOI: 10.1007/BF01667363
- Kranz, L. M., Diken, M., Haas, H., Kreiter, S., Loquai, C., Reuter, K. C., Meng, M., Fritz, D., Vascotto, F., Hefesha, H., Grunwitz, C., Vormehr, M., Hüsemann, Y., Selmi, A., Kuhn, A. N., Buck, J., Derhovanessian, E., Rae, R., Attig, S., ... Sahin, U. (2016). Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature*, 534(7607), 396–401. DOI: 10.1038/nature18300
- Krienke, C., Kolb, L., Diken, E., Streuber, M., Kirchhoff, S., Bukur, T., Akilli-Öztürk, Ö., Kranz, L. M., Berger, H., Petschenka, J., Diken, M., Kreiter, S., Yorgev, N., Waisman, A., Karikó, K., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2021). A noninflammatory mRNA vaccine for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 371(6525), 145–153. DOI: 10.1126/science.aay3638
- Wang, J., Ding, Y., Chong, K., Cui, M., Cao, Z., Tang, C., Tian, Z., Hu, Y., Zhao, Y., & Jiang, S. (2024). Recent Advances in Lipid Nanoparticles and Their Safety Concerns for mRNA Delivery. *Vaccines*, 12(10), 1148. DOI: 10.3390/vaccines12101148
- Giulimondi, F., Digiacomio, L., Pozzi, D., Palchetti, S., Vulpis, E., Capriotti, A. L., Chiozzi, R. Z., Laganà, A., Amenitsch, H., Masuelli, L., Peruzzi, G., Mahmoudi, M., Screpanti, I., Zingoni, A., & Caracciolo, G. (2019). Interplay of protein corona and immune cells controls blood residency of liposomes. *Nature Communications*, 10(1), 3686. DOI: 10.1038/s41467-019-11642-7
- Chen, Z., Place, R. F., Jia, Z.-J., Pookot, D., Dahiya, R., & Li, L.-C. (2008). Antitumor effect of dsRNA-induced p21WAF1/CIP1 gene activation in human bladder cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(3), 698–703. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2312
- Akhtar, S., Basu, S., Wickstrom, E., & Juliano, R. L. (1991). Interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipid membranes (liposomes). *Nucleic Acids Research*, 19(20), 5551–5559. DOI: 10.1093/nar/19.20.5551
- Wan, Y., Dai, W., Nevagi, R. J., Toth, I., & Moyle, P. M. (2017). Multifunctional peptide-lipid nanocomplexes for efficient targeted delivery of DNA and siRNA into breast cancer cells. *Acta Biomaterialia*, 59, 257–268. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.06.032
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 975. DOI: 10.2147/IJN.S68861
- Lasic, D. D. (2019). *LIPOSOMES in GENE DELIVERY* (1-е изд.). CRC Press. DOI: 10.1201/9780138748807
- Ibaraki, H., Takeda, A., Arima, N., Hatakeyama, N., Takashima, Y., Seta, Y., & Kanazawa, T. (2021). In Vivo Fluorescence Imaging of Passive Inflammation Site Accumulation of Liposomes via Intravenous Administration Focused on Their Surface Charge and PEG Modification. *Pharmaceutics*, 13(1), 104. DOI: 10.3390/pharmaceutics13010104
- Zuhorn, I. S., Bakowsky, U., Polushkin, E., Visser, W. H., Stuart, M. C. A., Engberts, J. B. F. N., & Hoekstra, D. (2005). Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. *Molecular Therapy*, 11(5), 801–810. DOI:10.1016/j.ymthe.2004.12.018
- Farid, M., Faber, T., Dietrich, D., & Lamprecht, A. (2020). Cell membrane fusing liposomes for cytoplasmic delivery in brain endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 194, 111193. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111193
- François-Martin, C., Bacle, A., Rothman, J. E., Fuchs, P. F. J., & Pincet, F. (2021). Cooperation of Conical and Polyunsaturated Lipids to Regulate Initiation and Processing of Membrane Fusion. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 763115. DOI: 10.3389/fmolb.2021.763115
- Pisani, M., Mobbili, G., & Bruni, P. (2011). Neutral Liposomes and DNA Transfection. В X. Yuan (Ред.), *Non-Viral Gene Therapy*. InTech. DOI: 10.5772/21283
- Wang, M. M., Wappelhorst, C. N., Jensen, E. L., Chi, Y.-C. T., Rouse, J. C., & Zou, Q. (2023). Elucidation of lipid nanoparticle surface structure in mRNA vaccines. *Scientific Reports*, 13(1), 16744. DOI: 10.1038/s41598-023-43898-x
- Biswal, M. R., Roy, S., & Singh, J. K. (2024). Comparative Analysis of Lipid Nanoparticles in Pfizer-BioNTech and Moderna COVID-19 Vaccines: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *Biophysics*. DOI: 10.1101/2024.10.04.616619
- Paunovska, K., Gil, C. J., Lokugamage, M. P., Sago, C. D., Sato, M., Lando, G. N., Gamba Castro, M., Bryksin, A. V., & Dahlman, J. E. (2018). Analyzing 2000 in Vivo Drug Delivery Data Points Reveals Cholesterol Structure Impacts Nanoparticle Delivery. *ACS Nano*, 12(8), 8341–8349. DOI: 10.1021/acsnano.8b03640
- Paunovska, K., Da Silva Sanchez, A. J., Sago, C. D., Gan, Z., Lokugamage, M. P., Islam, F. Z., Kalathoor, S., Krupczak, B. R., & Dahlman, J. E. (2019). Nanoparticles Containing Oxidized Cholesterol Deliver mRNA to the Liver Microenvironment at Clinically Relevant Doses. *Advanced Materials*, 31(14),

1807748. DOI: 10.1002/adma.201807748
41. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., & Danielsen, M. (1987). Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7413–7417. DOI: 10.1073/pnas.84.21.7413
42. Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., & Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99, 28–51. DOI: 10.1016/j.addr.2015.09.012
43. Samaridou, E., Heyes, J., & Lutwyche, P. (2020). Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 154–155, 37–63. DOI: 10.1016/j.addr.2020.06.002
44. Han, X., Zhang, H., Butowska, K., Swingle, K. L., Alameh, M.-G., Weissman, D., & Mitchell, M. J. (2021). An ionizable lipid toolbox for RNA delivery. *Nature Communications*, 12(1), 7233. DOI: 10.1038/s41467-021-27493-0
45. Zimmermann, T. S., Lee, A. C. H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., Harborth, J., Heyes, J. A., Jeffs, L. B., John, M., Judge, A. D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L. V., Palmer, L. R., Racie, T., Röhl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., ... MacLachlan, I. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441(7089), 111–114. DOI: 10.1038/nature04688
46. Akinc, A., Maier, M. A., Manoharan, M., Fitzgerald, K., Jayaraman, M., Barros, S., Ansell, S., Du, X., Hope, M. J., Madden, T. D., Mui, B. L., Semple, S. C., Tam, Y. K., Ciufolini, M., Witzigmann, D., Kulkarni, J. A., Van Der Meel, R., & Cullis, P. R. (2019). The Onpatro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nature Nanotechnology*, 14(12), 1084–1087. DOI: 10.1038/s41565-019-0591-y
47. Tesei, G., Hsiao, Y.-W., Dabkowska, A., Grönberg, G., Yanez Arteta, M., Ulkoski, D., Bray, D. J., Trulsson, M., Ulander, J., Lund, M., & Lindfors, L. (2024). Lipid shape and packing are key for optimal design of pH-sensitive mRNA lipid nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(2), e2311700120. DOI: 10.1073/pnas.2311700120
48. Cheng, Q., Wei, T., Farbiak, L., Johnson, L. T., Dilliard, S. A., & Siegwart, D. J. (2020). Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. *Nature Nanotechnology*, 15(4), 313–320. DOI: 10.1038/s41565-020-0669-6
49. Akinc, A., Querbes, W., De, S., Qin, J., Frank-Kamenetsky, M., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Rajeev, K. G., Cantley, W. L., Dorkin, J. R., Butler, J. S., Qin, L., Racie, T., Sprague, A., Fava, E., Zeigerer, A., Hope, M. J., Zerial, M., Sah, D. W., ... Maier, M. A. (2010). Targeted Delivery of RNAi Therapeutics With Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms. *Molecular Therapy*, 18(7), 1357–1364. DOI: 10.1038/mt.2010.85
50. Wittrup, A., Ai, A., Liu, X., Hamar, P., Trifonova, R., Charisse, K., Manoharan, M., Kirchhausen, T., & Lieberman, J. (2015). Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nature Biotechnology*, 33(8), 870–876. DOI: 10.1038/nbt.3298
51. Gilleron, J., Querbes, W., Zeigerer, A., Borodovsky, A., Marsico, G., Schubert, U., Manygoats, K., Seifert, S., Andree, C., Stöter, M., Epstein-Barash, H., Zhang, L., Kotliansky, V., Fitzgerald, K., Fava, E., Bickle, M., Kalaidzidis, Y., Akinc, A., Maier, M., & Zerial, M. (2013). Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nature Biotechnology*, 31(7), 638–646. DOI: 10.1038/nbt.2612
52. Johansson, J. M., Du Rietz, H., Hedlund, H., Eriksson, H. C., Oude Blenke, E., Pote, A., Harun, S., Nordenfelt, P., Lindfors, L., & Wittrup, A. (2024). Cellular and biophysical barriers to lipid nanoparticle mediated delivery of RNA to the cytosol. *Bioengineering*. DOI: 10.1101/2024.05.31.596627
53. Maugeri, M., Nawaz, M., Papadimitriou, A., Angerfors, A., Camponeschi, A., Na, M., Hölltå, M., Skantze, P., Johansson, S., Sundqvist, M., Lindquist, J., Kjellman, T., Mårtensson, I.-L., Jin, T., Sunnerhagen, P., Östman, S., Lindfors, L., & Valadi, H. (2019). Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nature Communications*, 10(1), 4333. DOI: 10.1038/s41467-019-12275-6
54. Jörgensen, A. M., Wibel, R., & Bernkop-Schnürch, A. (2023). Biodegradable Cationic and Ionizable Cationic Lipids: A Roadmap for Safer Pharmaceutical Excipients. *Small*, 19(17), 2206968. DOI: 10.1002/smll.202206968
55. Suzuki, Y., & Ishihara, H. (2021). Difference in the lipid nanoparticle technology employed in three approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 vaccine) drugs. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 41, 100424. DOI: 10.1016/j.dmpk.2021.100424
56. Couture-Sénécal, J., Tilstra, G., & Khan, O. F. (2024). Engineering ionizable lipids for rapid biodegradation balances mRNA vaccine efficacy and tolerability. *Bioengineering*. DOI: 10.1101/2024.08.02.606386
57. Wang, C., Xue, Y., Markovic, T., Li, H., Wang, S., Zhong, Y., Du, S., Zhang, Y., Hou, X., Yu, Y., Liu, Z., Tian, M., Kang, D. D., Wang, L., Guo, K., Cao, D., Yan, J., Deng, B., McComb, D. W., ... Dong, Y. (2025). Blood-brain-barrier-crossing lipid nanoparticles for mRNA delivery to the central nervous system. *Nature Materials*. DOI: 10.1038/s41563-024-02114-5
58. Ly, P.-D., Ly, K.-N., Phan, H.-L., Nguyen, H. H. T., Duong, V.-A., & Nguyen, H. V. (2024). Recent advances in surface decoration of nanoparticles in drug delivery. *Frontiers in Nanotechnology*, 6, 1456939. DOI: 10.3389/fnano.2024.1456939
59. Patel, M. N., Tiwari, S., Wang, Y., O'Neill, S., Wu, J., Omo-Lamai, S., Espy, C., Chase, L. S., Majumder, A., Hoffman, E., Shah, A., Sárközy, A., Katzen, J., Pardi, N., & Brenner, J. S. (2025). Safer non-viral DNA delivery using lipid nanoparticles loaded with endogenous anti-inflammatory lipids. *Nature Biotechnology*. DOI: 10.1038/s41587-025-02556-5
60. Lungu, C., Diudea, M., Putz, M., & Grudziński, I. (2016). Linear and Branched PEIs (Polyethylenimines) and Their Property Space. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 555. DOI: 10.3390/ijms17040555
61. Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5), 313–326. DOI: 10.1038/nrm.2017.132
62. Oh, Y.-K., Suh, D., Kim, J. M., Choi, H.-G., Shin, K., & Ko, J. J. (2002). Polyethylenimine-mediated cellular uptake, nucleus trafficking and expression of cytokine plasmid DNA. *Gene Therapy*, 9(23), 1627–1632. DOI: 10.1038/sj.gt.3301735
63. Ochrimenko, S., Vollrath, A., Tauhardt, L., Kempe, K., Schubert, S., Schubert, U. S., & Fischer, D. (2014). Dextran-graft-linear poly(ethylene imine)s for gene delivery: Importance of the linking strategy. *Carbohydrate Polymers*, 113, 597–606. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.07.048
64. Yamada, H., Loretz, B., & Lehr, C.-M. (2014). Design of Starch-graft-PEI Polymers: An Effective and Biodegradable Gene Delivery Platform. *Biomacromolecules*, 15(5), 1753–1761. DOI: 10.1021/bm500128k
65. Nicolle, L., Casper, J., Willmann, M., Journot, C. M. A., Detampel, P., Einfalt, T., Grisch-Chan, H. M., Thöny, B., Gerber-Lemaire, S., & Huwyler, J. (2021). Development of Covalent Chitosan-Polyethylenimine Derivatives as Gene Delivery Vehicle: Synthesis, Characterization, and Evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3828. DOI: 10.3390/ijms22083828
66. Ma, K., Hu, M., Qi, Y., Qiu, L., Jin, Y., Yu, J., & Li, B. (2009). Structure-transfection activity relationships with glucocorticoid-polyethyl-enimine conjugate nuclear gene delivery systems. *Biomaterials*, 30(22), 3780–3789. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.042
67. Wu, P., Luo, X., Wu, H., Zhang, Q., Wang, K., Sun, M., & Oupicky, D. (2020). Combined Hydrophobization of Polyethylenimine with Cholesterol and Perfluorobutyrate Improves siRNA Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 31(3), 698–707. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00834
68. Dunn, A. W., Kalinichenko, V. V., & Shi, D. (2018). Highly Efficient In Vivo Targeting of the Pulmonary Endothelium Using Novel Modifications of Polyethylenimine: An Importance of Charge. *Advanced Healthcare Materials*, 7(23), 1800876. DOI: 10.1002/adhm.201800876
69. Ito, T., Yoshihara, C., Hamada, K., & Koyama, Y. (2010). DNA/polyethylenimine/hyaluronic acid small complex particles and tumor suppression in mice. *Biomaterials*, 31(10), 2912–2918. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.12.032
70. Russ, V., Elfberg, H., Thoma, C., Kloeckner, J., Ogris, M., & Wagner, E. (2008). Novel degradable oligoethylenimine acrylate ester-based pseudodendrimers for in vitro and in vivo gene transfer. *Gene Therapy*, 15(1), 18–29. DOI: 10.1038/sj.gt.3303046
71. Yu, H., Russ, V., & Wagner, E. (2009). Influence of the Molecular Weight of Bioreducible Oligoethylenimine Conjugates on the Polyplex Transfection Properties. *The AAPS Journal*, 11(3), 445. DOI: 10.1208/s12248-009-9122-3
72. Xu, S., Chen, M., Yao, Y., Zhang, Z., Jin, T., Huang, Y., & Zhu, H. (2008). Novel poly(ethylene imine) biscalbamate conjugate as an efficient and nontoxic gene delivery system. *Journal of Controlled Release*, 130(1), 64–68. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.04.025
73. Kim, Y. H., Park, J. H., Lee, M., Kim, Y.-H., Park, T. G., & Kim, S. W. (2005). Polyethylenimine with acid-labile linkages as a biodegradable gene carrier. *Journal of Controlled Release*, 103(1), 209–219. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.11.008
74. Fang, G., Zeng, F., Yu, C., & Wu, S. (2014). Low molecular weight PEIs modified by hydrazone-based crosslinker and betaine as improved gene carriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 472–481. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.07.007
75. Xiong, M. P., Laird Forrest, M., Ton, G., Zhao, A., Davies, N. M., & Kwon, G. S. (2007). Poly(aspartate-g-PEI800), a polyethylenimine analogue of low toxicity and high transfection efficiency for gene delivery. *Biomaterials*, 28(32), 4889–4900. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.043
76. Buscaïl, L., Bournet, B., Vernejoul, F., Cambois, G., Lulka, H., Hanoun, N., Dufresne, M., Meulle, A., Vignolle-Vidoni, A., Ligat, L., Saint-Laurent, N., Pont, F., Dejean, S., Gayral, M., Martins, F., Torrisani, J., Barbey, O., Gross, F., Guimbaud, R., ... Cordelier, P. (2015). First-in-man Phase I Clinical Trial of Gene Therapy for Advanced Pancreatic Cancer: Safety, Biodistribution, and Preliminary Clinical Findings. *Molecular Therapy*, 23(4), 779–789. DOI: 10.1038/mt.2015.1
77. Meleshko, A. N., Petrovskaya, N. A., Savelyeva, N., Vashkevich, K. P., Doronina, S. N., & Sachivko, N. V. (2017). Phase I clinical trial of idiopathic DNA vaccine administered as a complex with polyethylenimine to patients with B-cell lymphoma. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(6), 1398–1403. DOI: 10.1080/21645515.2017.1285477
78. Thaker, P. H., Brady, W. E., Lankes, H. A., Odunsi, K., Bradley, W. H., Moore, K. N., Muller, C. Y., Anwer, K., Schilder, R. J., Alvarez, R. D., & Fracasso, P. M. (2017). A phase I trial of intraperitoneal GEN-1, an IL-12 plasmid formulated with PEG-PEI-cholesterol lipopolymer, administered

- with pegylated liposomal doxorubicin in patients with recurrent or persistent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancers: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology*, 147(2), 283–290. DOI: 10.1016/j.ygyno.2017.08.001
79. Halachmi, S., Leibovitch, I., Zisman, A., Stein, A., Benjamin, S., Sidi, A., Knickerbocker, R., Limor, M., & Moore, Y. (2018). Phase II trial of BC-819 intravesical gene therapy in combination with BCG in patients with non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC). *Journal of Clinical Oncology*, 36(6\_suppl), 499–499. DOI: 10.1200/JCO.2018.36.6\_suppl.499
80. *A Phase 1/2a Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of mRNA-1944 in Healthy Adults: Phase 1/2a clinical trial NCT03719300*. Sponsor: ModernaTX, Inc. (2018–2021). Retrieved from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03719300>
81. Gofrit, O. N., Benjamin, S., Halachmi, S., Leibovitch, I., Dotan, Z., Lamm, D. L., Ehrlich, N., Yutkin, V., Ben-Am, M., & Hochberg, A. (2014). DNA Based Therapy with Diphtheria Toxin-A BC-819: A Phase 2b Marker Lesion Trial in Patients with Intermediate Risk Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. *Journal of Urology*, 191(6), 1697–1702. DOI: 10.1016/j.juro.2013.12.011
82. *A Phase 1, First-in-Human, Open-Label, Dose-Escalation Study of mRNA-2752, a Lipid Nanoparticle Encapsulating mRNAs Encoding Human OX40L, IL-23, and IL-36γ, for Intratumoral Injection to Patients with Advanced Malignancies: Phase 1 clinical trial NCT02806687*. Sponsor: ModernaTX, Inc. (2016–2021). Retrieved from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02806687>
83. Kim, J., Eygeris, Y., Gupta, M., & Sahay, G. (2021). Self-assembled mRNA vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 170, 83–112. DOI: 10.1016/j.addr.2020.12.014
84. Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., & Schubert, U. S. (2010). Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(36), 6288–6308. DOI: 10.1002/anie.200902672
85. Meng, C., Chen, Z., Li, G., Welte, T., & Shen, H. (2021). Nanoplatfoms for mRNA Therapeutics. *Advanced Therapeutics*, 4(1), 2000099. DOI: 10.1002/adtp.202000099
86. Akinc, A., Goldberg, M., Qin, J., Dorkin, J. R., Gamba-Vitalo, C., Maier, M., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Rajeev, K. G., Manoharan, M., Koteliansky, V., Röhl, I., Leshchiner, E. S., Langer, R., & Anderson, D. G. (2009). Development of Lipidoid–siRNA Formulations for Systemic Delivery to the Liver. *Molecular Therapy*, 17(5), 872–879. DOI: 10.1038/mt.2009.36
87. Zhu, X., Tao, W., Liu, D., Wu, J., Guo, Z., Ji, X., Bharwani, Z., Zhao, L., Zhao, X., Farokhzad, O. C., & Shi, J. (2017). Surface De-PEGylation Controls Nanoparticle-Mediated siRNA Delivery In Vitro and In Vivo. *Theranostics*, 7(7), 1990–2002. DOI: 10.7150/thno.18136
88. Casper, J., Schenk, S. H., Parhizkar, E., Detampel, P., Dehshahri, A., & Huwyler, J. (2023). Polyethylenimine (PEI) in gene therapy: Current status and clinical applications. *Journal of Controlled Release*, 362, 667–691. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.09.001
89. Teo, S. P. (2022). Review of COVID-19 mRNA Vaccines: BNT162b2 and mRNA-1273. *Journal of Pharmacy Practice*, 35(6), 947–951. DOI: 10.1177/08971900211009650
90. Csaba, N. S., Sánchez, A., & Alonso, M. J. (2010). Preparation of Poly(Lactic Acid) (PLA) and Poly(Ethylene Oxide) (PEO) Nanoparticles as Carriers for Gene Delivery. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(8), pdb.prot5468. DOI: 10.1101/pdb.prot5468
91. Kim, J.-H., Park, J. S., Yang, H. N., Woo, D. G., Jeon, S. Y., Do, H.-J., Lim, H.-Y., Kim, J. M., & Park, K.-H. (2011). The use of biodegradable PLGA nanoparticles to mediate SOX9 gene delivery in human mesenchymal stem cells (hMSCs) and induce chondrogenesis. *Biomaterials*, 32(1), 268–278. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.086
92. Mollé, L. M., Smyth, C. H., Yuen, D., & Johnston, A. P. R. (2022). Nanoparticles for vaccine and gene therapy: Overcoming the barriers to nucleic acid delivery. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 14(6), e1809. DOI: 10.1002/wnan.1809
93. Chuan, D., Jin, T., Fan, R., Zhou, L., & Guo, G. (2019). Chitosan for gene delivery: Methods for improvement and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 268, 25–38. DOI: 10.1016/j.cis.2019.03.007
94. Germershaus, O., Mao, S., Sitterberg, J., Bakowsky, U., & Thomas Kissel. (2008). Gene delivery using chitosan, trimethyl chitosan or polyethyleneglycol-graft-trimethyl chitosan block copolymers: Establishment of structure–activity relationships in vitro. *Journal of Controlled Release*, 125(2), 145–154. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.10.013
95. Mourya, V. K., & Inamdar, N. N. (2009). Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(5), 1057–1079. DOI: 10.1007/s10856-008-3659-z
96. Nikkhoo, A., Rostami, N., Farhadi, S., Esmaily, M., Moghadaszadeh Ardebili, S., Atyabi, F., Baghaei, M., Haghnavaz, N., Yousefi, M., Aliparasti, M. R., Ghalamfarsa, G., Mohammadi, H., Sojoodi, M., & Jadidi-Niaragh, F. (2020). Codelivery of STAT3 siRNA and BV6 by carboxymethyl dextran trimethyl chitosan nanoparticles suppresses cancer cell progression. *International Journal of Pharmaceutics*, 581, 119236. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119236
97. Weecharangsan, W., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T., Apirakaramwong, A., Rojanarata, T., Ruktanonchai, U., & Lee, R. J. (2008). Evaluation of chitosan salts as non-viral gene vectors in CHO-K1 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 348(1–2), 161–168. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.07.011
98. Weecharangsan, W., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., & Apirakaramwong, A. (2006). Chitosan lactate as a nonviral gene delivery vector in COS-1 cells. *AAPS PharmSciTech*, 7(3), E74–E79. DOI: 10.1208/pt070366
99. Rabeea Banoon, S., Mahdi, D. S., Gasaem, N. A., Abed Hussein, Z., & Ghasemian, A. (2024). The Role of Nanoparticles in Gene Therapy: A Review. *Journal of Nanostructures*, 14(1). DOI: 10.22052/JNS.2024.01.005
100. Pelkmans, L., & Helenius, A. (2002). Endocytosis Via Caveolae. *Traffic*, 3(5), 311–320. DOI: 10.1034/j.1600-0854.2002.30501.x
101. Sabin, J., Alatorre-Meda, M., Miñones, J., Domínguez-Arca, V., & Prieto, G. (2022). New insights on the mechanism of polyethylenimine transfection and their implications on gene therapy and DNA vaccines. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 210, 112219. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.112219

Поступила: 20.08.2025  
 После доработки: 28.12.2025  
 Принята к публикации: 15.01.2026

**MODERN MATERIALS FOR NON-VIRAL DELIVERY SYSTEMS IN GENE THERAPY***A.V. Radnaeva<sup>1,2\*</sup>, E.A. Slobodkina<sup>1</sup>, V.A. Tkachuk<sup>1-3</sup>, P. I. Makarevich<sup>1-3</sup>*

<sup>1</sup>Center for Regenerative Medicine, Medical Scientific and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskie Gory St., Moscow, 119234 Russia; \*e-mail: arina.radnaeva05@gmail.com

<sup>2</sup>Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskie Gory St., Moscow 119234 Russia

<sup>3</sup>National Medical Research Center of Cardiology named after Academician E.I. Chazov, 15A Akademika Chazova St., Moscow, 121552 Russia

Modern gene delivery systems are classified into viral and non-viral vectors. Despite the predominance of viral vectors in gene therapy drug development due to their high transduction efficiency, their application is limited by immunogenicity, the risk of insertional mutagenesis, and inflammatory responses. Non-viral systems offer a superior safety profile, scalable manufacturing potential, and flexibility in genetic cargo loading but are less effective in transfection efficiency. The main challenges affecting non-viral vector transfection include the low stability of nucleic acids *in vivo*, problems in delivering the genetic material into the cell nucleus, and the toxicity of chemical components within the vector design. To overcome the low delivery efficiency of genetic material by non-viral vector systems, further research should focus on optimizing the chemical structure of carrier molecules, their modification to enhance targeting, and detailed investigation of intracellular vector transport pathways. Currently, the most promising application areas for non-viral delivery systems are oncology, vaccine development, and pulmonary diseases.

**Key words:** gene therapy; vector; non-viral delivery systems; lipid vector; polycationic vector

**FUNDING**

This study was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 19-75-30007π (<https://rscf.ru/project/19-75-30007>).

Received: 20.08.2025, revised: 28.12.2025, accepted: 15.01.2026