

УДК 576.342, 576.315.2, 577.214.4, 577.352.464, 615.277, 615.849.2, 616-097

Доставка биологически активных веществ в ядра клеток-мишеней для целей трансляционной медицины

А. С. Соболев^{1,2*}¹Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*E-mail: alsobolev@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.06.2020

Принята к печати 25.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11049

РЕФЕРАТ Создание средств внутриклеточной доставки биологически активных веществ с использованием естественных процессов внутриклеточного транспорта имеет значительные перспективы в области трансляционной медицины. В обзоре обобщены результаты работ лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта ИБГ РАН, позволивших создать модульные нанотранспортеры – базовую технологию, которая за счет доставки в наиболее чувствительный клеточный компартмент клеток-мишеней обеспечивает высокую эффективность и клеточную специфичность целому ряду противоопухолевых агентов и позволяет антителомиметикам проникать в нужный компартмент клеток-мишеней («ныряющие антитела»). Кроме того, разработаны и охарактеризованы комплексы поликатионных блок-сополимеров с ДНК (полиплексы), эффективные *in vitro* и *in vivo* и способные к преимущественной трансфекции активно делящихся клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА модульные нанотранспортеры, полиплексы, доставка лекарств, антителомиметики, генотерапия, фотодинамическая терапия, радиотерапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АЧ – альфа-частицы; МНТ – модульные нанотранспортеры; МНТ_{EGF} – МНТ с EGF в качестве лигандного модуля; МНТ_F – МНТ с FA в качестве лигандного модуля; МНТ_{MSH} – МНТ с αMSH в качестве лигандного модуля; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ПЭИ – полиэтиленимин; ФС – фотосенсибилизатор; ЭО – электроны Оже; ARE – элемент антиокислительного ответа; αMSH – α-меланоцитстимулирующий гормон; DTox – фрагмент транслокационного домена дифтерийного токсина; EC₅₀ – концентрация полумаксимального эффекта; EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор EGF; FA – фолиевая кислота; НМР – гемоглобиноподобный белок *E. coli*; K_d – константа диссоциации; NLS – аминокислотная последовательность сигнала ядерной локализации; Nrf2 – фактор транскрипции, регулирующий, в частности, экспрессию генов антиокислительного ответа.

ВВЕДЕНИЕ

Ядро клетки, где находится основная программа ее функционирования, естественным образом служит мишенью для многих биологически активных веществ. Их можно подразделить на две большие группы [1]. К первой можно отнести агенты (например, цитотоксические), которые хотя и способны производить свое повреждающее действие, находясь в любом месте клетки, однако ядро является для них наиболее чувствительным компартментом. Иначе говоря, если эти вещества локализованы в ядре, то – по сравнению с другими локализациями – для проявления такого же эффекта требуется минимальная их концентрация. Вторую группу составляют вещества, проявляющие свое действие именно тогда, когда они оказываются в клеточном ядре, как, напри-

мер, ДНК. В настоящем обзоре будут рассмотрены обе эти группы.

Фотосенсибилизаторы (ФС) и радионуклиды, испускающие частицы с коротким пробегом, такие, как эмиттеры альфа-частиц (АЧ) или эмиттеры электронов Оже (ЭО), могут служить примерами веществ первой группы. И те и другие являются цитотоксическими агентами, широко используемыми в медицинской практике для лечения онкологических заболеваний, но не только их. К цитотоксическому началу ФС – активным формам кислорода (т.е. к синглетному кислороду, гидроксильному радикалу и ряду других свободных радикалов) – чрезвычайно чувствительно клеточное ядро [2]. Что касается эмиттеров АЧ и ЭО, то уже более полувека известно, что именно клеточное ядро является наиболее чув-

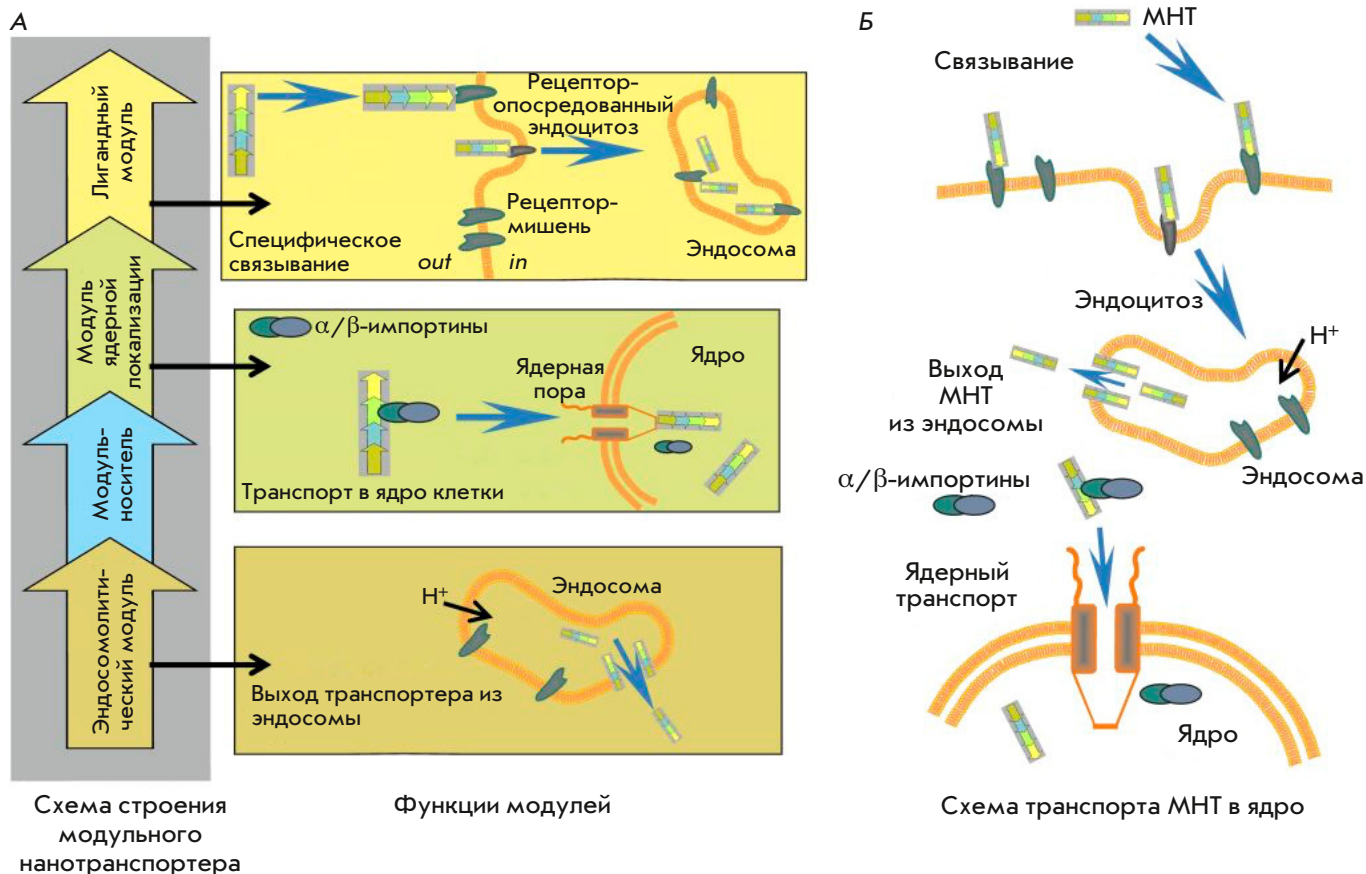


Рис. 1. Схема строения модульных нанотранспортеров (А) и их транспорта в клеточное ядро (Б) (по [15])

ствительным к ним клеточным компартментом [3]. При этом как ФС, так и эмиттеры АЧ/ЭО не только не обладают тропностью в отношении клеточного ядра, но и не имеют клеточной специфичности.

Не вызывает сомнений и необходимость доставки ДНК в клеточное ядро, если возникает потребность в ее экспрессии. К этой же, второй, группе биологически активных веществ следует отнести те регуляторные полипептиды, эффект которых проявляется при взаимодействии с макромолекулами клеточного ядра.

Таким образом, в целях трансляционной медицины биологически активные агенты необходимо доставить в ядра клеток-мишеней, чтобы их свойства могли проявиться, поскольку подавляющее большинство этих агентов не способны сами проделать этот путь.

Основная стратегия доставки макромолекул или иных биологически активных веществ (для краткости именуемых дальше «грузы») – использование естественных внутриклеточных транспортных процессов, таких, как, например, рецептор-опосредованный эндоцитоз или цитоплазмально-ядерный транспорт (они описаны в многочисленных книгах и обзорах, например, [4, 5]). Соответственно переносчик должен иметь необходимые для перемещения в желаемом направлении аминокислотные по-

следовательно или иные адресные молекулы и быть способным на пути к ядру преодолеть многочисленные барьеры как на пути к клетке-мишени [6], так и внутри нее.

МОДУЛЬНЫЕ НАНОТРАНСПОРТЕРЫ

Этим условиям соответствуют разрабатываемые в нашей лаборатории модульные нанотранспортеры (МНТ), которые можно рассматривать как технологическую платформу для доставки терапевтических агентов в заданный компартмент клеток-мишеней желаемого типа [1, 7–16]. В основу этой платформы положено: а) использование естественных процессов специфического молекулярного распознавания, а также б) уже упомянутых процессов транспорта внутрь и внутри клетки и в) принципа модульности, т.е. возможности менять транспортные или распознающие блоки/модули, чтобы адаптировать МНТ к нужному типу клеток-мишеней, клеточных компартментов, внутриклеточных мишеней и доставляемого «груза». В типичном варианте МНТ (рис. 1) в их состав входят лигандный модуль, эндосомолитический модуль, модуль транспорта в ядро клетки и модуль-носитель. Лигандный модуль обеспечивает взаимодействие с поверхностным интер-

нализуемым клеточным рецептором и тем самым узнавание клетки-мишени и транспорт внутрь этой клетки путем рецептор-опосредуемого эндоцитоза. Эндосомолитический модуль выполняет функцию pH-зависимого порообразования в эндосомах, чем обеспечивает выход МНТ с доставляемым активным компонентом в цитозоль клетки-мишени из этих компартментов со слабокислым содержимым. Модуль транспорта в ядро клетки-мишени включает аминокислотную последовательность, представляющую собой сигнал ядерной локализации (nuclear localization signal, NLS), который специфически взаимодействует с комплексом импортинов в цитозоле и обеспечивает транспорт через ядерную пору. Модуль-носитель служит для объединения остальных модулей в единое целое и присоединения «груза». Помимо четырех перечисленных модулей в состав МНТ могут быть включены и другие модули, если нужно дополнительное взаимодействие с еще какими-то внутриклеточными и внеклеточными компонентами. К настоящему времени наиболее детально исследованы свойства *in vitro* и *in vivo*:

- МНТ с эпидермальным фактором роста (EGF) в качестве лигандного модуля (МНТ_{EGF}), обладающие специфичностью по отношению к клеткам¹, сверхэкспрессирующим рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR) [9, 19, 20],
- МНТ с α-меланоцитстимулирующим гормоном в качестве лигандного модуля (МНТ_{MSH}), специфичные к клеткам² со сверхэкспрессией рецепторов меланокортина первого типа [8, 12, 22],
- МНТ с фолиевой кислотой в качестве лигандного модуля (МНТ_F), нацеленные на клетки³ со сверхэкспрессией рецепторов фолата [23, 24].

Состав модулей этих МНТ:

МНТ_{EGF}: DTox-HMP-NLS-EGF;
 МНТ_{MSH}: DTox-HMP-NLS-αMSH;
 МНТ_F: DTox-HMP-NLS-ПЭГ-FA,

где DTox – фрагмент транслокационного домена дифтерийного токсина (эндосомолитический модуль); HMP – гемоглобиноподобный белок *E. coli* (модуль-носитель); NLS – оптимизированная последовательность ядерной локализации большого ядерного Т-антигена вируса SV40 (модуль доставки в ядро); EGF, αMSH, FA – эпидермальный фактор роста, α-меланоцитстимулирующий гормон, фолиевая кислота соответственно (лигандные модули); ПЭГ – бифункциональный полиэтиленгликоль.

¹ Примеры: клетки рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, глиобластомы, колоректального рака [17, 18].

² Пример: клетки меланомы [21].

³ Примеры: клетки рака шейки матки, рака яичников [10].

Разработаны и разрабатываются другие варианты МНТ, которые будут рассмотрены в следующих разделах.

Когда в одну молекулу объединяются фрагменты других молекул, как при создании МНТ, то не очевидно, что свойства этих фрагментов сохранятся у создаваемой химерной молекулы: например, ее домены могут пространственно экранировать друг друга и препятствовать необходимому для функционирования химеры взаимодействию с клеточными белками; тем самым у создаваемой искусственной молекулы не будет желаемых свойств. Для проверки функциональности МНТ исследована как структура МНТ, так и способность их модулей осуществлять свои функции.

По данным динамического светорассеяния МНТ_{MSH} и МНТ_{EGF} имеют размеры 8.3 ± 0.6 и 10.6 ± 0.5 нм [19] соответственно.

Неоднократные попытки кристаллизовать МНТ с целью последующего изучения их структуры с высоким разрешением методом рентгеновской дифракции оказались безрезультатными. Однако применение методов малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, атомно-силовой и электронной микроскопии [25] позволило получить представление о структурах МНТ_{MSH} и МНТ_{EGF}. Один из важных выводов из этого структурного исследования состоит в том, что эндосомолитический и лигандный модули хорошо пространственно разнесены, что исключает их взаимное экранирование и, тем самым, потерю своих функций.

Это заключение убедительно подтверждено тестами, проведенными для оценки функционирования модулей МНТ всех разработанных типов. Для экономии места ограничимся примерами. Так, константа диссоциации (K_d) комплексов МНТ_{EGF} с EGFR составила 29 нМ, что близко к K_d комплексов EGF с EGFR [9], а для комплексов МНТ_{MSH} с меланокортиновыми рецепторами – около 20 нМ [8]. Исследуемые МНТ обладали мембранолитической активностью в двух диапазонах pH: в интервале 5.5–6.5, который близок к pH эндосом и обусловлен DTox, и при pH от 3 до 4, обусловленный действием HMP [8, 9]. Поры в мембранах, создаваемые МНТ, охарактеризованы электрохимически и с помощью атомно-силовой микроскопии [7, 9, 22]. После добавления полноразмерных МНТ_{MSH} (т.е. со всеми четырьмя модулями) к плоскому липидному бислою при pH 5.5 выявлено возникновение ионных каналов с проводимостью ~2–5 нСм, тогда как МНТ_{MSH} без эндосомолитического модуля при pH 5.5 не образовывали ионных каналов. Не появлялись каналы и при действии полноразмерных МНТ_{MSH} при нейтральных значениях pH 7.0, что доказывало проявление мембранной активности эндосомолитического модуля именно при закислении

среды. Спустя 5–15 мин после закисления среды до pH 5.5 МНТ_{EGF} образовывали в липидном бислое кольцевые структуры диаметром 30–50 нм, что выявлено с помощью атомно-силовой микроскопии. По прошествии 40–60 мин в липидном бислое можно было обнаружить флуктуирующие отверстия диаметром 50–200 нм, пронизывающие бислоем. Работу эндосомолитического модуля показали и на живых клетках (меланома мышей Клаудмана S91 (клон М3)) [8], измерив pH внутриклеточного микроокружения МНТ_{MSH} методом видеомикроскопии отношения изображений: МНТ_{MSH} без эндосомолитического модуля DTox находился в везикулах со слабокислым и кислым содержимым, тогда как полноразмерный МНТ_{MSH} (с модулем DTox) оказывался в нейтральном микроокружении. Полученный результат указывал на способность полноразмерных МНТ выходить из закисляемых эндоцитозных компартментов живых клеток. Несколькими методами (поверхностный плазмонный резонанс и термофорез) охарактеризовано взаимодействие модуля с NLS в составе различных МНТ с α/β -импортиновыми димерами, обеспечивающими доставку белков с NLS в клеточное ядро [9, 26]. Измеренные значения констант сродства МНТ к импортиновым димерам были близки к значениям констант свободного природного полипептида с этим же NLS. Таким образом показали, что все модули сохранили свои функции в составе искусственной химерной молекулы МНТ.

Соответственно все полноразмерные МНТ проникали в клетки-мишени путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, что подтверждалось ингибированием их проникновения специфическими лигандами соответствующих рецепторов, и локализовались в их клеточных ядрах [8, 9, 14, 23, 26–28] (рис. 2), как это

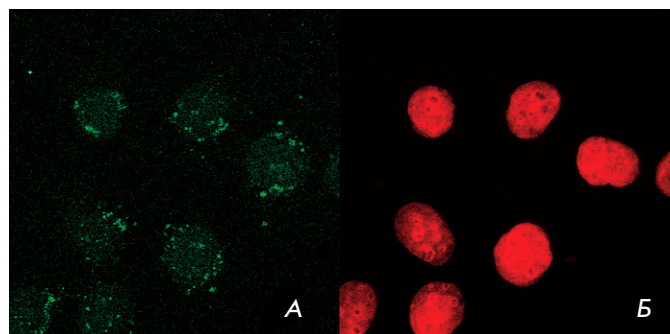


Рис. 2. Внутриклеточная локализация МНТ_{EGF} в клетках эпидермоидной карциномы человека А431 (по [9] с разрешения). Клетки инкубировали в течение 4 ч в среде с МНТ_{EGF}, после отмывали и инкубировали 3 ч в среде без МНТ_{EGF}. Одна и та же группа клеток: А – иммуноцитохимическое выявление МНТ_{EGF}, Б – окраска ядерной ДНК (ToPro-3)

и планировалось авторами для решения задачи внутриядерной доставки «грузов».

ФС, обычно применяемые для фотодинамической терапии злокачественных опухолей (хотя известны и другие направления их использования), генерируют свое цитотоксическое начало – активные формы кислорода – при освещении в оксигенируемой среде [2]. Как отмечено во «Введении», клеточное ядро является клеточным компартментом, наиболее чувствительным к поражающему действию как активных форм кислорода, так и эмиттеров АЧ и ЭО, применяемых в радиотерапии злокачественных опухолей [29, 30]. Поскольку МНТ показали свою способность проникать в клетки рецептор-опосредованным путем, а значит проникать в те клетки, где эти рецепторы представлены, т.е. специфически, и, главное, аккумулироваться в их ядрах, предстояло проверить, способна ли доставка эмиттеров АЧ и ЭО, а также ФС в ядра с помощью МНТ усилить их цитотоксичность.

Действительно, такие ФС, как хлорин e_6 и бактериохлорин p , присоединенные к МНТ_{EGF} или к МНТ_{MSH}, оказывались в сотни и тысячи раз более цитотоксичными, чем в свободном состоянии. Например, в опытах на клетках А431, сверхэкспрессирующих EGFR, концентрация полумаксимального цитотоксического эффекта (EC_{50}) МНТ_{EGF}-хлорин e_6 составила 0.53 нМ, тогда как EC_{50} свободного хлорина e_6 равна 1780 нМ, т.е. в 3360 раз больше [9]. Иными словами, тот же цитотоксический эффект ФС хлорина e_6 можно обеспечить, используя в 3360 раз меньшие его концентрации, переместив с помощью МНТ этот ФС в ядро. В этих же экспериментах показано, что МНТ_{EGF} придавали ФС клеточную специфичность: если свободный хлорин e_6 был одинаково цитотоксичен как в отношении клеток-мишеней А431, так и немисленных фибробластов NIH 3Т3, лишенных EGFR, то МНТ_{EGF}-хлорин e_6 поражали лишь клетки-мишени.

Качественно сходные результаты получены и в опытах с МНТ_{MSH} [8], где также показана необходимость наличия всех четырех модулей в МНТ: так МНТ, лишенный эндосомолитического модуля, был в 5.3 раза менее активным, чем полноразмерный МНТ, а МНТ без модуля с NLS оказывался еще менее цитотоксичным.

В опытах *in vivo* на мышах-опухоленосителях убедительно показана эффективность доставки ФС в ядра раковых клеток с помощью МНТ [19, 31]. Иммуноцитохимический анализ распределения МНТ_{EGF} и МНТ_{MSH} после внутривенного введения мышам-опухоленосителям выявил их преимущественное накопление в раковых клетках, а внутри них – в ядрах. Применение МНТ_{MSH} для терапии

двух экспериментальных меланом (внутривенное введение) показало, что ФС бактериохлорин *p*, доставляемый МНТ_{MSH}, ингибировал рост опухоли В16-F1 на 85–89% эффективнее, чем свободный бактериохлорин *p*, а меланомы Клаудмана S90 – на 93%. Отношение концентраций ФС в опухоли и коже достигало 9.8, что в 4.5 раза лучше, чем свободного бактериохлорина *p* [32]. Значительный терапевтический эффект наблюдали и при внутривенном введении МНТ_{EGF} с ФС хлорином e_6 на модели эпидермоидной карциномы человека А431, привитой мышам с иммунодефицитом: 75% мышей выжили к 92 суткам при 20% выживаемости животных, получавших свободный хлорин e_6 (положительный контроль) и полной гибели нелеченого контроля к 23 суткам.

АЧ и ЭО, вызывая плотную ионизацию и тем самым эффективно повреждая молекулы вдоль своих треков, обладают весьма небольшим пробегом в тканях: АЧ – 50–100 мкм, т.е. несколько клеточных диаметров, ЭО – порядка десятков и сотен нанометров, т.е. практически в пределах размеров клеточного ядра. Эти особенности эмиттеров АЧ и ЭО привлекательны тем, что в случае их избирательной доставки в клетки-мишени можно рассчитывать на минимальное повреждение окружающих нормальных клеток. При этом оба типа излучений вызывают множественные и трудно репарируемые двухцепочечные разрывы ДНК. Собственно, ядерная ДНК и является главной мишенью цитотоксического действия этих излучений [33, 34]. У них практически не происходит резкого уменьшения цитотоксичности при снижении содержания кислорода [35] (так называемого «кислородного эффекта», характерного для редкоионизирующих излучений), что дает им особое преимущество для поражения гипоксических раковых клеток. А эмиттеры ЭО интересны еще и тем, что на каждый распад продуцируют до нескольких десятков ЭО (в зависимости от природы эмиттера), что и обеспечивает их высокую биологическую эффективность, если распад происходит в непосредственной близости от ДНК [36]. С учетом перечисленных особенностей АЧ и особенно ЭО представляют интерес для терапии злокачественных опухолей, расположенных в местах, где повреждение окружающих нормальных тканей должно быть сведено к минимуму (например, опухолей мозга, особенно у детей) [37], либо для лечения микрометастазов [38].

Альфа-эмиттер ^{211}At , использованный как источник АЧ в экспериментах с МНТ, рассматривают как один из радионуклидов, наиболее перспективных для терапевтических целей [30]. Альфа-эмиттер ^{211}At имеет относительно короткий период полураспада (7.2 ч), пробег испускаемых им АЧ – до 70 мкм, дающий высокий выход двухцепочечных разрывов

ДНК [39]. ^{211}At -МНТ_{EGF} в экспериментах на клетках эпидермоидной карциномы человека А431, а также на двух линиях глиобластомы человека (D247MG и U87MG.wtEGFR) были в 8–18 раз более цитотоксичными, чем ^{211}At , не транспортируемый МНТ в ядра этих клеток [40]. Причем оказалось, что доставка этого эмиттера АЧ в клеточные ядра позволила проявиться эффектам ядер отдачи, которые из-за очень короткого пробега не выявляются при иных внутриклеточных локализациях.

В экспериментах с МНТ использовали следующие эмиттеры ЭО, широко применяемые в медицине в качестве источников гамма-излучения: ^{125}I , ^{67}Ga и ^{111}In . Они испускают в среднем 24.9, 4.7 и 14.7 ЭО на 1 распад соответственно [41], причем выход двухцепочечных разрывов ДНК, вызываемых ЭО, существенно зависит от расстояния между ДНК и эмиттером ЭО [42].

^{125}I или ^{67}Ga , доставляемые МНТ_{EGF}, весьма интенсивно накапливались в ядрах клеток эпидермоидной карциномы человека А431 [27, 28]: к первому часу инкубации около 60% радиоактивности, доставленной в клетки, оказывалось в их ядрах. ^{125}I -МНТ_{EGF} был в 3500 раз более цитотоксичным для клеток А431, чем ^{125}I -иодированный контрольный полипептид, не проникающий в клетки [27]. Похожие результаты по резкому усилению цитотоксичности эмиттеров ЭО за счет их доставки в ядра получены с ^{67}Ga [28] и ^{111}In [20]. В этих опытах на трех клеточных линиях (А431, D247MG и U87MG.wtEGFR) сравнили цитотоксичность ^{125}I и ^{67}Ga , доставленных в ядро с помощью МНТ, с их цитотоксичностью при доставке преимущественно в цитоплазму. Как и следовало ожидать, доставка этих эмиттеров в ядро обеспечивала значительно большую цитотоксичность (от 20 до 400 раз в зависимости от радионуклида и клеточной линии) [15].

Проверки безопасности МНТ, проведенные в рамках доклинических испытаний, осуществленных в «Национальном медицинском исследовательском радиологическом центре» Минздрава России, показали, что исследованные МНТ при внутриопухолевом введении обладают весьма незначительной токсичностью для мышей и крыс (как острой, так и хронической), малой иммуногенностью/аллергенностью для мышей и морских свинок и непирогенны для кроликов [19, 43–45]. В целом, считали, что этот терапевтический подход безопасен при внутриопухолевом введении МНТ [46].

^{111}In -МНТ_{EGF}, однократно введенный в раковую опухоль мочевого пузыря человека EJ, привитую подкожно иммунодефицитным мышам Balb/c *nu/nu*, удерживался внутри опухоли весьма продолжительное время (время полудержания составило 4.1 ± 0.5 сут) [20], при этом в кровь поступало не более 0.5% введенной дозы. При внутриопухолевом введе-

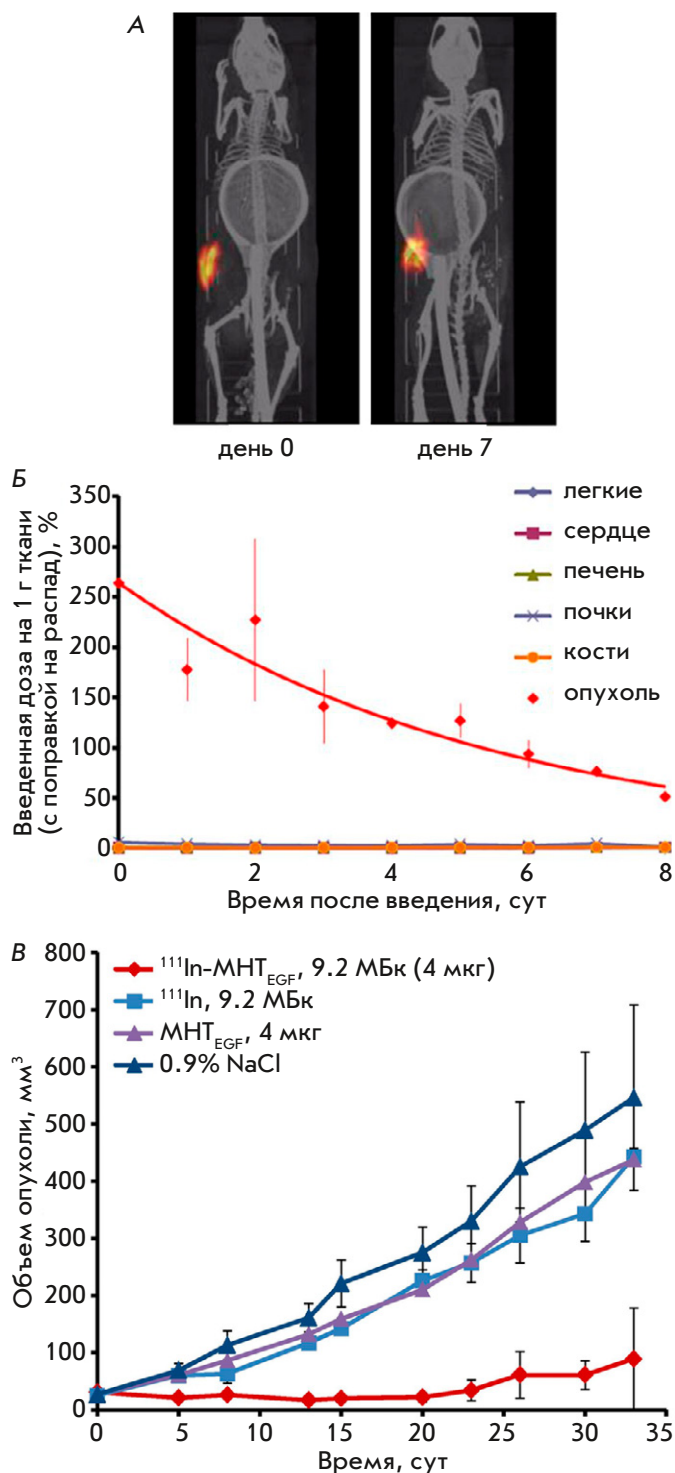


Рис. 3. $^{111}\text{In-MNT}_{\text{EGF}}$ после введения внутрь опухоли (рак мочевого пузыря человека EJ), привитой подкожно иммунодефицитным мышам Balb/c *nu/nu* (по [20] с изменениями). А – визуализация удержания радиоактивности в опухоли методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии; Б – кинетика удержания радиоактивности в опухоли и нормальных тканях; В – противораковая эффективность $^{111}\text{In-MNT}_{\text{EGF}}$ при внутриопухолевом введении

нии $^{111}\text{In-MNT}_{\text{EGF}}$ оказывал выраженный дозозависимый терапевтический эффект на опухоли EJ (до 90% по сравнению с нелеченым контролем: как немеченым MNT_{EGF} , так и свободным ^{111}In в той же дозе) [20] (рис. 3).

Похожую терапевтическую эффективность продемонстрировал другой вариант МНТ – MNT_{F} с ^{111}In [23, 24]. $^{111}\text{In-MNT}_{\text{F}}$ обеспечил дозозависимое торможение роста опухолей, привитых подкожно (клетки HeLa рака шейки матки) иммунодефицитным мышам (вплоть до 80%), при этом выживаемость животных достигла 60% (на 90-е сут) при полной гибели нелеченого контроля к 21 дню.

Результаты, полученные с различными цитотоксическими агентами (двумя ФС, одним эмиттером АЧ, тремя эмиттерами ЭО), побудили взглянуть на МНТ как на потенциальных доставщиков значительно более широкого спектра биологически активных молекул. В этом смысле особенно привлекательны биоактивные полипептиды, поскольку сами МНТ являются химерными полипептидами, и включение в их состав дополнительных полипептидных фрагментов – вопрос, решаемый генно-инженерными методами.

Один из первых вариантов таких МНТ – МНТ с фрагментом белка p21: p21- MNT_{EGF} . Белок p21 обладает широким спектром действия, образуя комплекс с белком PCNA, он влияет на процессы репарации ДНК, контролирует репликационную вилку ДНК, а взаимодействуя с циклинами и циклинзависимыми киназами, регулирует клеточный цикл [47]. Это делает p21 или его фрагменты, которыми он связывается с PCNA, привлекательным инструментом для модификации действия средств повреждения ДНК, используемых, например, в терапии рака. Исходя из этих отправных моментов, синтезированы p21- MNT_{EGF} , которые содержали С-концевой фрагмент белка p21 (аминокислотные остатки 87–164) с участком, которым p21 связывается с PCNA [48]. ДНК повреждали блеомицином – противораковым агентом, вызывающим ее двухцепочечные разрывы [49], а для анализа повреждений ДНК и ее репарации использовали метод ДНК-комет в щелочной среде, позволяющий выявлять все типы разрывов ДНК. Предварительная инкубация клеток A431 с p21- MNT_{EGF} показала, что p21- MNT_{EGF} вызывают статистически значимое ингибирование репарации ДНК по сравнению с контрольными MNT_{EGF} , т.е. аналогичными МНТ, но без фрагмента p21 [14].

Ободрающие результаты этого исследования способствовали дальнейшему продвижению по пути направленной внутриклеточной доставки биологически активных полипептидов. В ходе работ по гранту РФФ № 17-14-01304 [50] были созданы МНТ, несущие в качестве эффекторной части антителомиметик

анти-Keap1 монободы, активирующий сигнальный путь Nrf2/ARE за счет конкуренции с эндогенным Nrf2 за связывание с белком-ингибитором Keap1. Транскрипционный фактор Nrf2 регулирует несколько сотен генов, часть которых участвует в защите клетки от окислительного стресса (т.е. в антиоксидантной защите), другая – в защите от токсичных ксенобиотиков и в ряде других жизненно важных процессов [51]. Окислительный стресс сопровождается или участвует в патогенезе многих заболеваний, таких, как болезни Паркинсона и Хантингтона, сахарный диабет, атеросклероз, в старении клеток, их радиационном поражении и др. [51, 52]. В отсутствие окислителей Nrf2, находящийся в цитоплазме в комплексе со своим ингибитором Keap1, подвергается убиквитинированию и последующей деградации в протеасомах. Появляющиеся в клетке окислители, ксенобиотики взаимодействуют с тиольными группами «цистеиновых сенсоров» в составе Keap1, что приводит к высвобождению Nrf2 и его накоплению в ядре с последующим взаимодействием с «элементом антиокислительного ответа» (ARE – antioxidant response element) в области промоторов контролируемых генов, активируя их транскрипцию [51, 53]. Эксперименты с МНТ, содержащими анти-Keap1 монободы, выявили статистически значимое увеличение экспрессии ряда генов антиоксидантной защиты и защиту клеток от окислительного стресса, индуцированного *трет*-бутилгидропероксидом. На мышинной модели окислительного стресса, индуцированного гепатотоксином ацетаминофеном, показано, что предварительное введение МНТ с анти-Keap1 монободы, активирующего сигнальный путь Nrf2/ARE, препятствует гепатотоксическому действию ацетаминофена, выявляемому по увеличению активности аспартат-аминотрансферазы и аланин-аминотрансферазы в сыворотке крови [50]. Эти результаты свидетельствуют о возможности применения МНТ для доставки антителомиметиков не только *in vitro*, но и *in vivo*.

ПОЛИПЛЕКСЫ (КОМПЛЕКСЫ КАТИОННЫХ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ С ДНК) ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Перспектива изменять функционирование клеток, модифицируя их генетическую программу, уже не первое десятилетие стимулирует многих исследователей, ставящих своими конечными целями генотерапию (например, онкологических или наследственных заболеваний) или биотехнологию для продукции нужных макромолекул и т.п. Как нередко бывает при решении подобных значительных проблем, состоящих из нескольких крупных задач, нахождение оптимального варианта решения какой-то из них оказывается

не столь быстрым, как того хотелось бы. Задача направленной доставки генетического материала – одна из таких. Напрашивающимся вариантом решения могли быть вирусы как надмолекулярные структуры, наиболее приспособленные для преодоления организменных и клеточных барьеров при направленной доставке собственного генетического материала. Наибольшее число доклинических и клинических испытаний по генотерапии осуществлено именно с ними. Однако над вирусными векторами, по-видимому, надолго нависла угроза неожиданных и нередко тяжелых побочных эффектов [54, 55]. Поэтому параллельно с конструированием вирусных векторов для доставки генетического материала разрабатываются невирусные методы, привлекающие все больший интерес и число исследователей.

Один из вариантов невирусной доставки – применение поликатионов, образующих комплексы с нуклеиновыми кислотами, называемые полиплексами. В полиплексах ДНК (или РНК) упакована и защищена от действия гидролитических ферментов, что обеспечивает достаточную стабильность в биологических средах. Полиплексы непатогенны, многие из них неиммуногенны и малотоксичны. Модифицируя исходные полимеры, можно получать различные по свойствам частицы, а также присоединять различные функциональные компоненты для придания им, например, клеточной специфичности или иных желаемых свойств [56].

Очевидно, что к позитивным качествам собственно полимерных носителей в составе полиплексов необходимо как добавление упомянутых выше функциональных компонентов, так и оптимизация состава самих полимеров для приближения свойств полиплексов к свойствам вирионов доставлять генетический материал.

Рассмотрим это на примере хорошо известных полиплексов на основе полиэтиленimina (ПЭИ). При смешивании ПЭИ с ДНК в разных соотношениях, выражаемом как отношение N/P (где N – число аминогрупп ПЭИ, а P – число фосфатных групп ДНК), образуются частицы разного размера и заряда. Для увеличения времени циркуляции полиплексов в крови и снижения токсичности ПЭИ к нему присоединяют ПЭГ, получая блок-сополимеры ПЭГ-ПЭИ. Поскольку варьировать можно не только соотношения N/P, но и ПЭГ/ПЭИ, то возникает задача нахождения оптимальных соотношений компонентов в составе полиплекса. Для ее решения на 11 клеточных линиях протестированы варианты полиплексов с различными соотношениями компонентов, а эффективность трансфекции оценивали по активности экспрессируемого репортерного гена [57]. Показано, что получаемые зависимости эффективности трансфекции от соот-

ношений N/P и ПЭГ/ПЭИ немонотонны, но близки по форме для всех исследованных клеток, и, что важно, максимумы эффективности трансфекции разных клеточных линий наблюдаются при одних и тех же отношениях N/P и ПЭГ/ПЭИ. При этом для всех исследованных линий клеток показана значимая положительная корреляция между эффективностью трансфекции и долей наночастиц полиплексов с размерами 50–75 нм. Такой результат, полученный более чем на 10 клеточных линиях человека и животных, дает возможность трансфицировать разные линии клеток с максимальной эффективностью. Однако при сходстве зависимостей трансфекции от соотношений N/P и ПЭГ/ПЭИ для всех изученных клеточных линий замечено и существенное отличие: максимально достижимая эффективность трансфекции варьировала от почти 100% (HeLa, HEK293, меланома Клаудмана, меланома B16-F1) до 4.4% (BT-474). Эти различия можно было объяснить либо различиями в экспрессии репортерного гена, либо различиями в процессах транспорта и распаковки полиплексов у разных клеточных линий. Экспериментальная проверка [57] показала правомочность второго предположения: эффективность трансфекции положительно коррелировала со скоростью входа полиплексов в клетки и отрицательно – со скоростью их распаковки в эндцитозных компартментах.

Модификация блок-сополимеров лигандами к интернализуемым рецепторам на клетках-мишенях позволяет придавать полиплексам клеточную специфичность. Например, полиплексы с α MSH приобретали специфичность по отношению к клеткам меланомы, сверхэкспрессирующим меланокортиновые рецепторы 1-го типа (α MSH – их лиганд), и намного более эффективно трансфицировали эти раковые клетки *in vivo* [58].

Размер наиболее эффективно трансфицирующих полиплексов на основе ПЭИ (50–75 нм; см. выше) заставляет сомневаться, что наночастицы такого размера способны проникнуть через ядерные поры в ядро неделящейся клетки, поскольку их известный предел даже для частиц, имеющих NLS, – около 40 нм [59]. Эксперименты по исследованию трансфекции флуоресцентно мечеными полиплексами клеток показали, что около 90% клеток, экспрессирующих репортерный ген, доставляемый этими наночастицами, были трансфицированы именно в ходе своего деления [60], что позволяет рассматривать полиплексы как средство, подходящее для трансфекции активно делящихся, в первую очередь раковых, клеток. В этом же исследовании [60] оценено среднее число интактных молекул ДНК, приходящихся на одно ядро успешно трансфицированной клетки; оно оказалось равным примерно трем, что указыва-

ет на немалую эффективность полиплексов. В пользу целесообразности использования полиплексов в генотерапии рака говорят и их физические свойства: раковые опухоли, точнее их сосуды, обладают свойством так называемого эффекта «усиленной проницаемости и удерживания» наночастиц [61]. Полиплексы на основе ПЭИ, модифицированные α MSH, с разной эффективностью трансфицировали клетки меланомы B16-F1 и Клаудмана S91: первые лучше, чем вторые. Как показано, причина различий состоит в том, что опухоли B16-F1 более васкуляризованы, и в их эндотелии больше фенестр, что способствует более выраженному эффекту «усиленной проницаемости и удерживания» [62]. Тем не менее опухолевые ткани представляют собой определенный барьер для наночастиц полиплексов. Эти наночастицы, хотя и проникают в опухолевые ткани в отличие от нормальных, но глубина их проникновения невелика: не более 20 мкм [63] (рис. 4А). Поэтому, если есть необходимость в доставке полиплексов на большую глубину в опухоль, то нужны дополнительные воздействия на нее. Один из вариантов, позволяющий как увеличить глубину проникновения полиплексов, так и их концентрацию в опухоли, – модифицировать ее интерстиций, например, подавив продукцию коллагена типа I [62, 64] (рис. 4Б).

Полиплексы на основе ПЭИ продемонстрировали терапевтическую эффективность в случае экспериментальных опухолей (саркома мышей S37 [65] и меланома Клаудмана S91, клон M3 [58]). В более ранних экспериментах при трансфекции молочных желез мышей и овец полиплексами удалось получить с их молоком желаемый белок [66]. Такими же полиплексами можно было осуществить трансгенез ранних эмбрионов мышей и кроликов [67].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подытоживая результаты проведенных работ можно сделать следующие выводы.

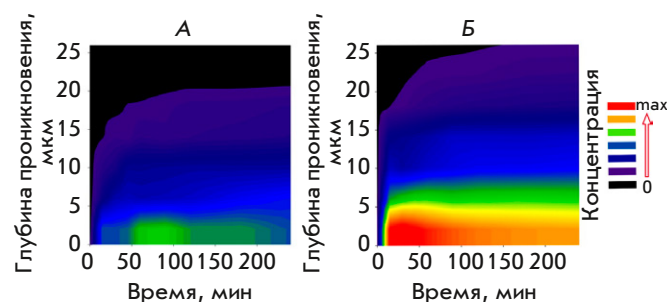


Рис. 4. Проникновение полиплексов в опухоль (по [62] с разрешения); А – без воздействия; Б – после ингибирования продукции коллагена I лозартаном

А) По доставке цитотоксических агентов с помощью модульных нанотранспортеров с целью терапии рака: разработаны модульные нанотранспортеры – технологическая платформа (т.е. базовая технология, служащая основой для решения отдельных конкретных задач), позволяющая придавать клеточную специфичность и высокую эффективность целому ряду противоопухолевых агентов путем доставки их в клеточное ядро за счет использования естественных процессов внутриклеточного транспорта.

Б) По доставке биологически активных полипептидов: на основе модульных нанотранспортеров созданы проникающие в живую клетку антителомиметики, которые можно назвать «ныряющими антителами», способные влиять на функции молекул-мишеней, а также новый тип модульных нанотранспортеров, воздействующих на функционирование транскрипционных факторов как в клетках *in vitro*, так и *in vivo*. Мы полагаем, что разрабатываемый подход может стать прорывным направлением как в создании инструментов для изучения функционирования живых клеток, так и, возможно, для разработки терапевтических средств.

В) По доставке генетического материала с помощью полиплексов: показана преимущественная трансфекция полиплексами делящихся клеток, что должно учитываться при их возможном практическом применении; эффективность трансфекции полиплексами показана *in vitro* и *in vivo*.

В перспективе планируется расширение спектра доставляемых биологически активных агентов, в первую очередь – антителомиметиков (создание новых «ныряющих антител»), а также гуманизация МНТ для возможного системного их применения. Эти работы уже начаты [68, 69]. ●

Автор благодарен своим коллегам
А.А. Розенкранцу, Ю.В. Храмову и А.В. Уласову
за пожелания, сделанные в процессе подготовки
рукописи.

Работа выполнена при финансовой
поддержке Российского научного фонда
(грант № 17-14-01304).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sobolev A.S. // Herald Russ. Acad. Sci. 2013. V. 83. № 4. P. 324–335.
- Sobolev A.S., Jans D.A., Rosenkranz A.A. // Progress Biophys. Mol. Biol. 2000. V. 73. № 1. P. 51–90.
- Hall E.J., Giaccia A.J. Radiobiology for the Radiologist. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2019. 1161 p.
- Baade I., Kehlenbach R.H. // Curr. Opin. Cell Biol. 2019. V. 58. P. 1–7.
- Targeted Intracellular Drug Delivery by Receptor Mediated Endocytosis. / Ed. Devarajan P.V. et al. Cham: Springer, 2019. 560 p.
- Ferrati S., Streiff A.K., Srinivasan S., Alexander J.F., Bhargava N., Peters A.M., Song N.E., Tasciotti E., Godin B., Ferrari M., et al. // Intracellular Delivery. Fundamentals and Applications. / Ed. Prokop A. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, 2011. P. 3–56.
- Sobolev A.S. // Bioessays. 2008. V. 30. № 3. P. 278–287.
- Rosenkranz A.A., Lunin V.G., Gulak P.V., Sergienko O.V., Shumiantseva M.A., Voronina O.L., Gilyazova D.G., John A.P., Kofner A.A., Mironov A.F., et al. // FASEB J. 2003. V. 17. № 9. P. 1121–1123.
- Gilyazova D.G., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Lunin V.G., Sergienko O.V., Khramtsov Y.V., Timofeyev K.N., Grin M.A., Mironov A.F., Rubin A.B., et al. // Cancer Res. 2006. V. 66. № 21. P. 10534–10540.
- Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. // Curr. Pharm. Design. 2015. V. 21. № 9. P. 1227–1238.
- Sobolev A.S., Aliev R.A., Kalmykov S.N. // Russian Chem. Rev. 2016. V. 85. № 9. P. 1011–1032.
- Slastnikova T., Rosenkranz A., Morozova N., Vorontsova M., Petriev V., Lupanova T., Ulasov A., Zalutsky M., Yakubovskaya R., Sobolev A. // Internat. J. Nanomed. 2017. V. 12. P. 395–410.
- Sobolev A.S. // Encyclopedia of Cancer. / Ed. Schwab M. Berlin, Heidelberg: Springer, 2017. P. 2891–2894.
- Kamaletdinova T.R., Rosenkranz A.A., Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Tsvetkova A.D., Georgiev G.P., Sobolev A.S. // Doklady Biochem. Biophys. 2018. V. 479. № 1. P. 95–97.
- Sobolev A.S. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 952.
- Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Georgiev G.P., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. // Nucl. Med. Biol. 2020. V. 80. P. 45–56.
- Haddad J., Slika S., Mahfouz R. // Meta Gene. 2017. V. 11. P. 157–163.
- Xu M.J., Johnson D.E., Grandis J.R. // Cancer Metastasis Rev. 2017. V. 36. № 3. P. 463–473.
- Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Schiffelers R.M., Lupanova T.N., Khramtsov Y.V., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. // Internat. J. Nanomed. 2012. V. 7. P. 467–482.
- Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Karmakova T.A., Vorontsova M.S., Morozova N.B., Petriev V.M., Abrosimov A.S., Khramtsov Y.V., Lupanova T.N., Ulasov A.V., et al. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 1331.
- Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Durymanov M.O., Sobolev A.S. // Biochemistry (Moscow). 2013. V. 78. № 11. P. 1228–1237.
- Khramtsov Y.V., Rokitskaya T.I., Rosenkranz A.A., Trusov G.A., Gnuchev N.V., Antonenko Y.N., Sobolev A.S. // J. Controlled Release. 2008. V. 128. № 3. P. 241–247.
- Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., Karyagina T.S., Ovechko S.A., Sobolev A.S. // Drug Design. Dev. Therapy. 2017. V. 11. P. 1315–1334.
- Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Khramtsov Y.V., Karyagina T.S., Georgiev G.P., Sobolev A.S. // Doklady Biochem. Biophys. 2017. V. 473. № 1. P. 85–87.
- Khramtsov Y.V., Vlasova A.D., Vlasov A.V., Rosenkranz A.A., Ulasov A.V., Ryzhykau Y.L., Kuklin A.I., Orekhov A.S., Eydlin I.B., Georgiev G.P., Gordeliy V.I., Sobolev A.S. // Acta Cryst. 2020. V. D76. № 12. P. 1270–1279.

26. Karyagina T.S., Ulasov A.V., Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Lupanova T.N., Khramtsov Y.V., Georgiev G.P., Sobolev A.S. // *Front. Pharmacol.* 2020. V. 11. P. 176.
27. Slastnikova T.A., Koumariou E., Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Lupanova T.N., Sobolev A.S., Zalutsky M.R. // *EJNMMI Res.* 2012. V. 2. № 1. P. 1–10.
28. Koumariou E., Slastnikova T.A., Pruszynski M., Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Sobolev A.S., Zalutsky M.R. // *Nucl. Med. Biol.* 2014. V. 41. № 6. P. 441–449.
29. Ku A., Facca V.J., Cai Z., Reilly R.M. // *EJNMMI Radiopharm. Chem.* 2019. V. 4. P. 1.
30. Vaidyanathan G., Zalutsky M.R. // *Curr. Radiopharm.* 2011. V. 4. № 4. P. 283–294.
31. Slastnikova T., Rosenkranz A., Lupanova T., Gulak P., Gnuchev N., Sobolev A. // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2012. V. 446. № 1. P. 235–237.
32. Mironov A.F., Grin M.A., Pantushenko IV., Ostroverkhov P.V., Ivanenkov Y.A., Filkov G.I., Plotnikova E.A., Karmakova T.A., Starovoitova A.V., Burmistrova N.V., et al. // *J. Med. Chem.* 2017. V. 60. № 24. P. 10220–10230.
33. Buchegger F., Perillo-Adamer F., Dupertuis Y.M., Delaloye A.B. // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2006. V. 33. № 11. P. 1352–1363.
34. Baidoo K.E., Yong K., Brechbiel M.W. // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. № 3. P. 530–537.
35. Chadwick K.H., Leenhouts H.P. // *Molecular Theory of Radiation Biology. Monographs on Theoretical and Applied Genetics. V. 5* / Ed. Frankel R., et al. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1981. 377 p.
36. Kassis A.I. // *Rad. Protect. Dosimetry.* 2011. V. 143. № 2–4. P. 241–247.
37. Raghavan R., Howell R.W., Zalutsky M.R. // *Biomed. Phys. Engin. Express.* 2017. V. 3. P. 035005.
38. Falzone N., Lee B.Q., Able S., Malcolm J., Terry S., Alayed Y., Vallis K.A. // *J. Nucl. Med.* 2019. V. 60. № 2. P. 250–258.
39. Claesson A.K., Stenerlöw B., Jacobsson L., Elmroth K. // *Radiat. Res.* 2007. V. 167. № 3. P. 312–318.
40. Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Pozzi O.R., Lunin V.G., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. // *Internat. J. Radiat. Oncol. Biol. Physics.* 2008. V. 72. № 1. P. 193–200.
41. Howell R.W. // *Med. Phys.* 1992. V. 19. № 6. P. 1371–1383.
42. Balagurumorthy P., Xu X., Wang K., Adelstein S.J., Kassis A.I. // *Internat. J. Radiat. Biol.* 2012. V. 12. P. 998–1008.
43. Воронцова М.С., Морозова Н.Б., Кармакова Т.А., Панкратов А.А., Андреева Т.Н., Плотнова Е.А., Розенкранц А.А., Слостникова Т.А., Лупанова Т.Н., Соболев А.С. // *Рос. биотерапевт. журн.* 2016. Т. 15. № 1. С. 20–21.
44. Vorontsova M.S., Morozova N.B., Karmakova T.A., Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Petriev V.M., Smoryzanova O.A., Tischenko V.K., Yakubovskaya R.I., Kaprin A.D., et al. // *AIP Conf. Proc.* V. 1882. AIP Publ., 2017. P. 0200781-1–0200781-4.
45. Воронцова М.С., Морозова Н.Б., Кармакова Т.А., Тищенко В.К., Сморязанова О.А., Петриев В.М., Розенкранц А.А., Слостникова Т.А., Лупанова Т.Н., Якубовская Р.И. и др. // *Исследования и практика в медицине.* 2017. Т. 4 (спецвыпуск). С. 37.
46. Соболев А.С., Розенкранц А.А., Слостникова Т.А., Кармакова Т.А., Воронцова М.С., Морозова Н.Б., Петриев В.М., Лупанова Т.Н., Храмцов Ю.В., Уласов А.В. и др. // *Исследования и практика в медицине.* 2018. Т. 5 (спецвыпуск 2). С. 266.
47. Karimian A., Ahmadi Y., Yousefi B. // *DNA Repair (Amst.)* 2016. V. 42. P. 63–71.
48. Bruning J.B., Shamoo Y. // *Structure.* 2004. V. 12. № 12. P. 2209–2219.
49. Liddle P., Lafon-Hughes L., Di Tomaso M.V., Reyes-Abalos A.L., Jara J., Cerda M., Hartel S., Folle G.A. // *Chromosome Res.* 2014. V. 22. № 4. P. 463–481.
50. Sobolev A.S., Ulasov A.V., Georgiev G.P., Khramtsov Y.V., Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Lupanova T.N., Karyagina T.S. The development of new types of modular nanotransporters carrying biologically active macromolecules as a tool for selective adjustment of specified functions of living cells. RSF Grant #17-14-01304. 2019. URL: <https://rscf.ru/contests/search-projects/17-14-01304/> (Access date: 26.05.2020).
51. Cuadrado A., Rojo A.I., Wells G., Hayes J.D., Cousin S.P., Rumsey W.L., Attucks O.C., Franklin S., Levonen A.L., Kensler T.W., et al. // *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2019. V. 18. № 4. P. 295–317.
52. Sekhar K.R., Freeman M.L. // *Free Rad. Biol. Med.* 2015. V. 88 (Pt B). P. 268–274.
53. Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T. // *Trends Biochem. Sci.* 2014. V. 39. № 4. P. 199–218.
54. van der Eb M.M., de Leeuw B., van der Eb A.J., Hoeben R.C. // *Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews* / Ed. Springer C.J. Totowa: Humana Press, 2004. P. 479–490. doi: 10.1385/1-59259-429-8:479.
55. Liu T.C., Kirn D.H. // *Gene Therapy for Cancer* / Ed. Hunt K.K., et al. Totowa: Humana Press, 2007. P. 351–385.
56. Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. // *Russ. Chem. Bull.* 2015. V. 64. № 12. P. 2749–2755.
57. Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. // *Mol. Therapy.* 2011. V. 19. № 1. P. 103–112.
58. Durymanov M.O., Beletkaia E.A., Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Rodichenko N.S., Slastnikova T.A., Vinogradova T.V., Uspenskaya N.Y., Kopantsev E.P., et al. // *J. Controlled Release.* 2012. V. 163. № 2. P. 211–219.
59. Panté N., Kann M. // *Mol. Biol. Cell.* 2002. V. 13. № 2. P. 425–434.
60. Durymanov M.O., Yarutkin A.V., Khramtsov Y.V., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. // *J. Controlled Release.* 2015. V. 215. P. 73–81.
61. Wong A.D., Ye M., Ulmschneider M.B., Searson P.C. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 5. P. e0123461.
62. Durymanov M.O., Yarutkin A.V., Bagrov D.V., Klinov D.V., Kedrov A.V., Chemeris N.K., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. // *J. Controlled Release.* 2016. V. 232. P. 20–28.
63. Durymanov M.O., Slastnikova T.A., Kuzmich A.I., Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Egorov S.Y., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 38. P. 10209–10216.
64. Durymanov M.O., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. // *Theranostics.* 2015. V. 5. № 9. P. 1007–1020.
65. Alekseenko I.V., Snezhko E.V., Chernov I.P., Pleshkan V.V., Potapov V.K., Sass A.V., Monastyrskaya G.S., Kopantsev E.P., Vinogradova T.V., Khramtsov Y.V., et al. // *J. Translat. Med.* 2015. V. 13. P. 78.
66. Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Neugodova G.L., Naroditsky B.S., Shilov I.N., Shatski I.N., Ernst L.K. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 14. P. 7928–7933.
67. Ivanova M.M., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Sobolev A.S., Landa V., Naroditsky B.S., Ernst L.K. // *Mol. Reprod. Dev.* 1999. V. 54. № 2. P. 112–120.
68. Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Lupanova T.N., Tsvetkova A.D., Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. // *Doklady Biochem. Biophys.* 2018. V. 479. № 1. P. 62–65.
69. Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Tsvetkova A.D., Rosenkranz A.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. // *Doklady Biochem. Biophys.* 2017. V. 472. № 1. P. 81–83.