

УДК 577.1

Направленный транспорт лекарственных препаратов в липидоподобных наноконтейнерах и внеклеточных везикулах

А. В. Соколов, Н. Н. Костин, Л. А. Овчинникова, Я. А. Ломакин, А. А. Кудряева*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: anna.kudriaeva@gmail.com

Поступила в редакцию 15.01.2019

Принята к печати 13.05.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-28-41

РЕФЕРАТ Возможность адресной доставки препаратов к определенным органам-мишеням, тканям и клеткам открыла невероятные перспективы для разработки новых способов терапии. Технология направленного транспорта нацелена на создание многофункциональных носителей, способных к длительной циркуляции в организме пациента и обладающих низкой токсичностью. Поверхность современных синтетических носителей обладает высоким структурным сходством с клеточной мембраной, что в сочетании с дополнительными модификациями способствует передаче и биологических свойств, позволяя эффективно преодолевать физиологические барьеры. Наряду с искусственными контейнерами все большее внимание уделяется исследованию внеклеточных везикул в качестве естественных переносчиков лекарственных средств. В обзоре рассмотрены системы направленного транспорта с помощью липидных и липидоподобных наночастиц, а также внеклеточных везикул, обладающих высоким уровнем биосовместимости. Особое внимание уделено генетически кодируемым переносчикам терапевтических средств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА внеклеточные везикулы, липосомы, наноконтейнеры, полимерные носители, самособирающиеся везикулы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БТ – бактериальные тени; ВВ – внеклеточные везикулы; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ГКВВ – генетически кодируемые внеклеточные везикулы; ГКГС – главный комплекс гистосовместимости; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ДК – дендритные клетки; ИЛ – интерлейкин; ЛПС – липополисахарид; миРНК – малые интерферирующие РНК; МСК – мезенхимальные стволовые клетки; ПЭГ – полиэтиленгликоль; РЭС – ретикулоэндотелиальная система; ФНО – фактор некроза опухоли; ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

При создании современных терапевтических препаратов наряду с низкомолекулярными соединениями все чаще используют биополимеры и их фрагменты: белки, пептиды, олигонуклеотиды, РНК или ДНК. Для исключения потери активности из-за внешних факторов способы приготовления лекарственных средств и их введения в организм пациента должны удовлетворять определенным требованиям. Однако основной проблемой на пути внедрения потенциальных терапевтических соединений в клиническую практику представляет сложность доставки препарата в целевые клетки. Доставку без использования носителей в значительной степени затрудняют пре-

ждевременная деградация препарата в организме и низкая проницаемость клеточных мембран, поэтому разработка и оптимизация методов доставки лекарственных веществ относятся к одним из наиболее изучаемых направлений нанобиомедицины.

Существующие системы доставки можно разделить на две группы: вирусные (лентивирусы, аденовирусы, ретровирусы) [1] и невирусные (макро- и наночастицы, полимерные частицы) [2]. Быстрое развитие нанотехнологий способствует созданию новых методов доставки на основе наночастиц из различных материалов, обладающих разнообразными поверхностными характеристиками и физико-химическими свойствами, удовлетворяющими

условиям конкретной задачи [3]. Однако каждый тип наночастиц обладает как преимуществами, так и определенными недостатками, ограничивающими их применение. Разрабатываемые наноконтейнеры способны выступать в качестве носителей как белковых препаратов [4], так и ДНК [5], и РНК [6]. Наночастицы, полученные из природных полимеров, таких, как фосфолипиды, полисахариды, белки и пептиды, более эффективны, чем наночастицы из синтетических полимеров, благодаря их биосовместимости [7] и отсутствию токсичных продуктов деградации [8]. Используемые в настоящее время наноразмерные фармацевтические контейнеры-носители обладают множеством полезных свойств, включая эффективную внутриклеточную доставку и длительную циркуляцию в кровотоке, сниженную токсичность благодаря преимущественному накоплению в целевой области, улучшенную фармакокинетику и биораспределение терапевтического агента, а также способность к высвобождению содержимого контейнера под действием определенных физиологических условий [9]. Кроме того, активно изучается возможность использования внеклеточных везикул в качестве природной системы доставки лекарственных препаратов. При этом исследуют как интактные везикулы, так и везикулы, предварительно нагруженные терапевтическим агентом [10]. В данном обзоре мы подробнее рассмотрим особенности липидных и липидоподобных систем доставки, уделив особое внимание перспективам использования внеклеточных везикул.

ЛИПИДНЫЕ И ЛИПИДОПОДОБНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ

Первым, универсальным, наиболее изученным и широко применяемым носителем лекарств является липосома и ее производные. За последние 10 лет разработано множество систем с использованием наноносителей на основе липидных и липидоподобных везикул, включая липосомы (liposomes), ниосомы (niosomes), этосомы (ethosomes), трансферсомы (transfersomes), твердые липидные наночастицы (SLN, solid lipid nanoparticles), наноструктурированные липидные носители (NLC, nanostructured lipid carriers), а также гибридные липид-полимерные наночастицы (LPN, lipid-polymer hybrid nanoparticles). Схематическая структура перечисленных наноносителей показана на *рис. 1*. Липидные наноносители чаще всего состоят из физиологических липидов, что обеспечивает безопасную и эффективную доставку, а также повышенную биодоступность терапевтических агентов. Эти наночастицы нетоксичны и расщепляются в организме наряду с эндогенными липидами.

Липосомы

Липосомы, являющиеся самым распространенным способом доставки, впервые были описаны в 1965 году [11]. Функциональный каркас липосомы, состоящий из двухслойной липидной оболочки, обуславливает не только высокую подвижность формы, но и способность везикул имитировать биофизические свойства живых клеток.

Липосомы состоят в основном из природных и/или синтетических фосфо- и сфинголипидов, чаще всего фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина – основных структурных элементов биологических мембран. Но и другие фосфолипиды, такие, как фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин и фосфатидилинозит могут дополнительно использоваться при получении липосом [12]. Размер липосом варьирует практически в пределах трех порядков: различают двухслойные (моноламеллярные), которые в свою очередь делятся на малые SUV (25–50 нм) и большие LUV (≥ 100 нм), а также многослойные (мультиламеллярные) липосомы MLV размером 0.05–10 мкм. Самый простой способ получения SUV – обработка дисперсии липидов ультразвуком. MLV получают путем смешивания предварительно полученных SUV с водным раствором терапевтического агента с последующей лиофилизацией [13] или гидратацией липидных пленок, при этом добавление органических растворителей в процессе гидратации увеличивает эффективность инкапсуляции с 10 до 40% [14]. LUV получают с помощью обратного фазового испарения [15] или методом удаления детергента [16]. Помимо классификации липосом по размеру, существует разделение и по заряду в зависимости от входящих в состав липидов и фосфолипидов: нейтральные (фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин), анионные (фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин, фосфатидные кислоты и фосфатидилинозит), катионные (стеариламин или ДС-холестерин) [17–19].

Традиционные «липосомы первого поколения» на основе фосфолипидов обладают низкой стабильностью и быстро деградируют после введения в организм, что является существенным недостатком, особенно при доставке цитотоксических препаратов [20]. Для стабилизации липосом может использоваться хитозан – природный гидрофильный биоразлагаемый полимер с низкой токсичностью [21]. Но даже стабильные липосомы, независимо от их заряда и размера, весьма эффективно поглощаются клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС), находящимися в печени и селезенке, что активно используется при заболеваниях, связанных с поражением данных органов. Однако для увеличения времени циркуляции и эффективности доставки в другие

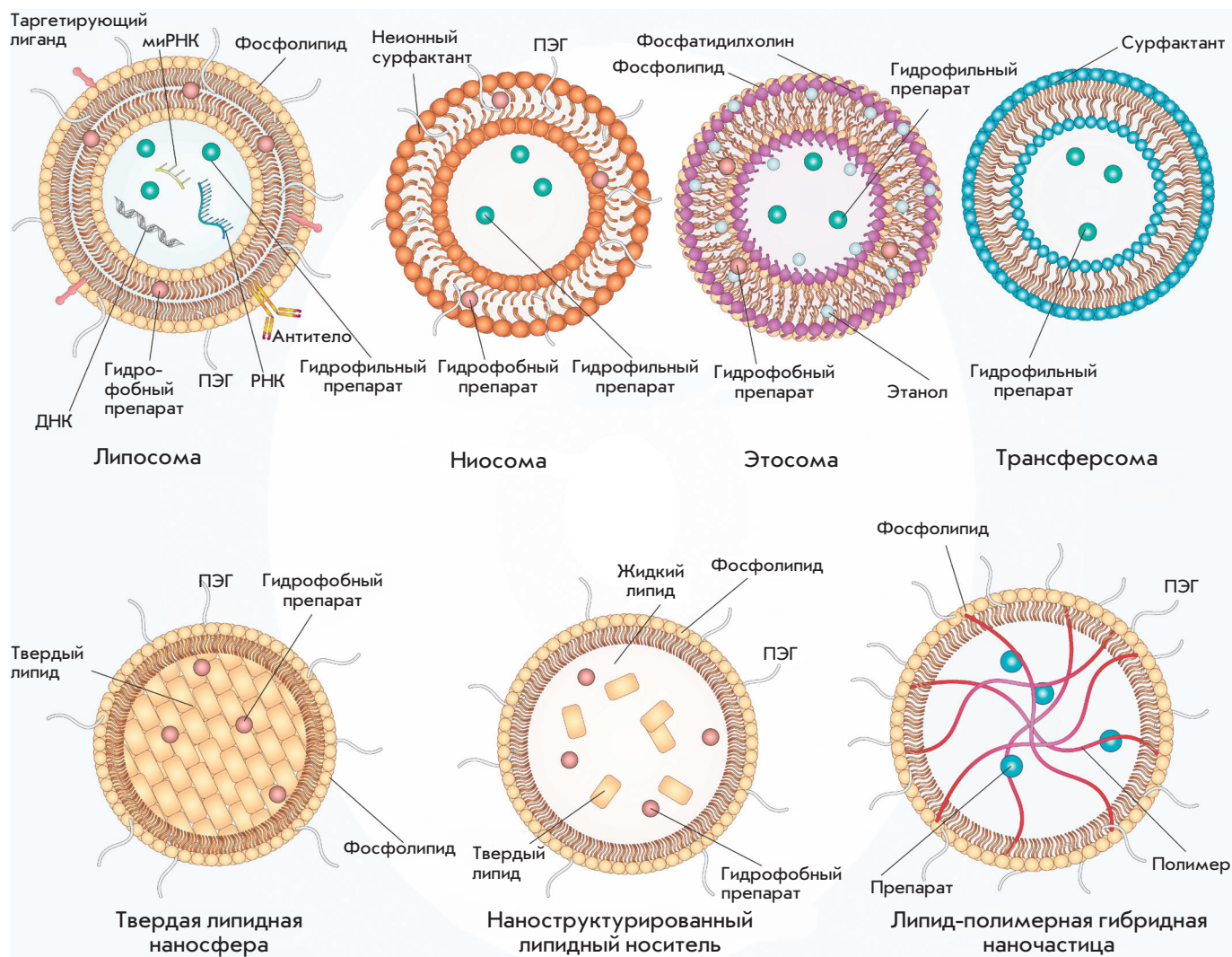


Рис. 1. Строение липидных и липидоподобных наночастиц. Липосомы, как правило, состоят из природных фосфолипидов, основного компонента биологических мембран. Ниосомы состоят из неионного сурфактанта и холестерина или его производных. Этосомы представляют собой липидные везикулы, состоящие из фосфолипидов и большого количества этанола. Трансферсомы – это эластичные липосомы, легко поддающиеся деформации, что позволяет им проникать в глубокие слои кожи. Ядра твердых липидных наночастиц состоят из смеси твердых липидов. Наноструктурированные липидные носители образованы из смеси твердых и жидких липидов. Гибридные липидные наночастицы имеют полимерное ядро, оболочка – липидный бислой

ткани и органы липосомы делают «невидимыми» для РЭС (stealth liposome) путем модификации их поверхности биосовместимым инертным гидрофильным полимером – полиэтиленгликолем (ПЭГ) [22, 23], дополнительно блокируя взаимодействия с белками крови [24, 25]. Также разработаны «суперневидимые» липосомы (SSL, super stealth liposomes), где ПЭГ закреплен посредством β -глутаминовой кислоты на нескольких молекулах фосфоэтаноламина [26]. Данная композиция, как и увеличение длины цепи ПЭГ, повышает стабильность липосом, продлевает период полувыведения, улучшает профиль биораспределения [26, 27]. Совсем недавно было показано,

что доставка терапевтических агентов путем транспортировки наночастиц на поверхности эритроцитов может быть чрезвычайно эффективной даже при малом времени циркуляции в кровотоке [28].

Помимо увеличения стабильности и времени циркуляции препарата в кровотоке, в большинстве случаев требуется направленная доставка к определенным клеткам-мишеням. Для решения подобных задач разработано множество дополнительных модификаций липосом, например, включение диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE) в состав катионных липосом способствует эффективной доставке в предшественники дендритных клеток (ДК) [29],

а маннозилирование липосом увеличивает их захват непосредственно ДК [30]. Модификация липосом искусственным полипептидом DARPin, специфичным к опухолевому рецептору HER2, способствует эффективной доставке наночастиц в клетки, экспрессирующие данный рецептор [31]. В настоящее время на стадии клинических испытаний находятся несколько препаратов на основе таргетированных липосом. Среди них наиболее перспективными кажутся препараты MCC-465 (модифицированные ПЭГ липосомы, несущие доксорубин и димеры F(ab')-фрагментов) [32], MM-302 (модифицированные ПЭГ липосомы, специфичные к HER2, несущие доксорубин) [33], 2B3-101 (липосомы, несущие на поверхности глутатион), MBP-426 и SGT-53 (липосомы, несущие в качестве вектора трансферрин и TfRscFv (anti-transferrin receptor single-chain antibody) соответственно) [34, 35]. Помимо антител, их фрагментов и пептидов, для модификации поверхности липосом с целью повышения их селективности могут также использоваться нуклеиновые кислоты и небольшие молекулы [36]. Среди перечисленных лигандов для адресной доставки особое место занимают аптамеры, которые считаются одними из самых перспективных кандидатов с уникальными характеристиками [37]. Таким образом, липосомы на настоящий момент являются одним из самых универсальных способов доставки: с их помощью возможна доставка широкого спектра лекарственных средств, в том числе противоопухолевых и противомикробных препаратов, ферментов, вакцин, ДНК и РНК.

В настоящее время в клинической практике применяется множество терапевтических агентов, инкапсулированных в липосомы, еще большее их число находится на стадии клинических испытаний [38]. Впервые липосомный носитель был введен в клиническую практику в 1995 году. Им стал противоопухолевый препарат Doxil™/Caelyx™ [39]. Кроме того, в терапии злокачественной трансформации используют препараты Myocet™, DaunoXome™, Depocyt™, Marqibo™, Onivyde™, AmBisome™, DepoDur™, Visudyne™, Abelcet™ и Curosurf™.

Липосомы также проходят испытания в качестве носителей средств против аутоиммунных заболеваний, в частности ревматоидного артрита и рассеянного склероза (РС). Например, препарат Xemus – это инкапсулированная в маннозилированные SUV смесь иммунодоминантных пептидов основного белка миелина (MBP, myelin basic protein), одного из основных аутоантигенов при рассеянном склерозе. Полноразмерный основной белок миелина, а также его фрагменты долгое время рассматривали в качестве средства, эффективного при аутоиммунной нейродегенерации [40]. Показано, что введение опре-

деленных пептидов MBP, инкапсулированных в липосомы, подавляет развитие экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у модельных животных [41]. На настоящий день успешно проведены I и II стадии клинических испытаний препарата Xemus, одобрено проведение III стадии [42]. Благодаря модификации поверхности липосом остатками маннозы, инкапсулированные в липосомы пептиды MBP захватываются в основном профессиональными АПК (антигенпредставляющими клетками) – макрофагами и ДК через маннозные рецепторы CD206. Предполагается, что избыточная презентация фрагментов MBP в составе молекул МНС класса II на поверхности АПК способствует индукции толерантности к данному белку и, как следствие, уменьшению аутоиммунного воспаления. В сыворотке больных РС, получавших препарат Xemus, выявлено снижение уровней моноцитарного хемотаксического фактора-1 (MCP-1/CCL2), макрофагов, воспалительного белка-1 (MIP-1/CCL4), интерлейкинов ИЛ-2 и ИЛ-7 [43]. Кроме того, исследовано влияние пептидов MBP46–62, 124–139 и 147–170, входящих в состав препарата, на высвобождение цитокинов и активацию иммунных клеток у больных РС и здоровых доноров [44].

Способность липосом направленно доставлять требуемый антиген к АПК и тем самым модулировать иммунный ответ широко используется при разработке противовирусных и бактериальных вакцин. В настоящее время ряд липосомных препаратов находится на стадии клинических испытаний в качестве адъювантов профилактических и терапевтических вакцин против малярии, гриппа, туберкулеза, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и лихорадки денге [45], тогда как препараты Cervarix™, Inflexal™ и Eраxal™ уже являются коммерчески доступными липосомными вакцинами против вируса папилломы человека (ВПЧ), вируса гриппа и вируса гепатита А соответственно [46].

Ниосомы

Ниосомы представляют собой везикулы (50–800 нм), состоящие из двойного слоя неионного сурфактанта, часто дополнительно содержащие холестерин или его производные [47]. Структура ниосом позволяет инкапсулировать в них как гидрофильные, так и липофильные соединения, при этом гидрофильный агент располагается во внутреннем водном пространстве, в то время как липофильный – внутри бислоя. Свойства данных везикул могут варьировать в зависимости от размера, ламеллярности и заряда поверхности. В качестве системы доставки ниосомы обладают некоторыми преимуществами перед классическими липосомами: имеют большее время полужизни, просты в получении и легко подвергаются

модификациям, обладают высокой совместимостью с биологическими системами и низкой токсичностью благодаря своей неионной природе, неиммуногенны и подвергаются биодegradации [48]. Кроме того, ниосомы практически не распознаются ретикулоэндотелиальной системой. К недостаткам ниосом относится невысокая стабильность (хотя и более высокая, чем у липосом), склонность к агрегации и частичный выход инкапсулированного агента из наноконтейнера в процессе доставки [49].

Несмотря на большое количество публикаций, посвященных изучению возможных составов и применению ниосом, лишь немногие препараты доведены до клинических испытаний [47]. Большинство испытаний показало, что инкапсуляция лекарственных препаратов в ниосомы имеет ряд преимуществ, таких, как большая эффективность, уменьшение количества побочных эффектов, удобный способ введения. Так, ниосомы эффективны при внутривенном, внутримышечном, пероральном, внутриглазном, подкожном, легочном, внутрибрюшинном и трансдермальном введении [50]. Данный вид везикул используется для инкапсуляции таких препаратов, как доксорубин, инсулин, овальбумин, олигонуклеотиды, EGFP, гемагглютинин, ДНК-вакцины, α -интерферон и многие другие [51]. Кроме того, ниосомы используют для введения в глаз препарата такролимус после трансплантации роговицы [52], пероральной доставки метформина [53], а также в косметической промышленности.

Этосомы

Этосомы, впервые описанные в 1996 году, представляют собой модификацию классических липосом и состоят из фосфолипидов, этанола (20–45%) и воды [54]. Помимо этанола, этосомы могут содержать пропиленгликоль или изопропиловый спирт. В зависимости от способа приготовления этосомы имеют размер от нескольких десятков нанометров до нескольких микрон. В этосомы могут быть инкапсулированы как гидрофильные, так и липофильные лекарственные средства; увеличение концентрации этанола в этосомах способствует повышению растворимости соединений и тем самым включению большего количества терапевтического агента. Известно, что этосомы значительно превосходят классические липосомы для доставки трансдермальных форм лекарственных средств из-за наличия отрицательного ζ -потенциала. Кроме того, этанол приводит к дезорганизации липидов рогового слоя кожи, что значительно повышает эффективность проникновения частиц лекарственных средств в глубокие слои дермы. Накопление препарата в дермальных слоях приводит к эффекту замедленного высвобождения вещества

из этосом, что способствует пролонгации лечебного действия [55]. К недостаткам этосом относят довольно частые аллергические реакции на спирт или другие их компоненты [56], а также возможность применения исключительно для трансдермальной доставки. Кроме того, легкая воспламеняемость этанола требует повышенных мер предосторожности при приготовлении, применении, транспортировке и хранении данных наноконтейнеров [57].

Трансферсомы

Трансферсомы – везикулы, состоящие из фосфатидилхолина, сурфактанта и этанола, обладают повышенной проникающей способностью через межклеточные поры, что достигается путем добавления мембранных модификаторов – холата натрия, стеариламина, Span 60, Span 80, Tween 60 и Tween 80 – поверхностно-активных веществ, способствующих дестабилизации липидных бислоев и увеличению деформируемости липосомных мембран [58]. В зависимости от состава трансферсомы, проникающие в слои кожи, либо сохраняют свою интактную структуру, либо происходит их слияние с клеточной мембраной [59]. Благодаря способности легко менять форму, они проходят через поры, диаметр которых в 5–10 раз меньше их собственного диаметра, что обеспечивает высокий уровень проникновения лекарственных веществ [60]. Эффективность трансферсом в качестве системы доставки показано на ибупрофене [61], тербинафине [62] и эмодине [63].

Кроме перечисленных универсальных липидоподобных систем доставки, существует множество модификаций, разработанных для многих конкретных случаев. Известны термочувствительные [64], магнитные [65], мультифункциональные SMART-липосомы [66], а также фармакосомы – амфифильные фосфолипидные комплексы лекарственных соединений [67].

Твердые липидные наночастицы

В начале 1990-х годов был разработан новый класс липидных частиц – липосферы, или твердые липидные наносферы SLN (solid lipid nanospheres) [68, 69]. В везикулах данного типа твердый липид – чаще всего нейтральный триглицерид, используют как матрицу для инкапсуляции лекарственного средства. Возможно также использование насыщенных жирных кислот, тогда как полярные фосфолипиды служат липофильными эмульгаторами. Моно- и диглицериды применяют значительно реже из-за их полярности. SLN могут быть получены различными способами: гомогенизацией при высоком давлении, микроэмульсионным методом и преципитацией липидных частиц при выпаривании растворителя [70]. SLN отличаются от липосом повышенной стабильностью, возможно-

стью контролируемого высвобождения, сравнительно легкими и дешевыми методами приготовления [71], а от везикул из полимерных материалов их отличает отсутствие токсичности [72]. Хотя SLN имеют много преимуществ по сравнению с существующими системами доставки, они обладают и некоторыми недостатками, например, низкой эффективностью инкапсулирования гидрофильных препаратов [18]. Вероятной причиной этого является низкая растворимость гидрофильных соединений в липидном бислое и матрице. Для улучшения захвата гидрофильных лекарственных средств, например доксорубицина [73] и диминазена [74], применяют два подхода. В первом используют SLN, загруженные маслом, а во втором – модифицируют липидную матрицу путем включения в нее амфифильных соединений, фосфатидилхолина, полиглицерил-3-диизостеарата и сорбита [75].

Кроме того, SLN характеризуются неравномерным по времени высвобождением лекарственного средства [68, 76]. Данный недостаток пока не удается решить, что накладывает довольно большие ограничения на применение этих наночастиц, так как высокая начальная скорость высвобождения может способствовать серьезным осложнениям, например, при доставке цитотоксичных противоопухолевых препаратов [68].

Наноструктурированные липидные носители

Наноструктурированные липидные носители (NLC, nanostructured lipid carriers) – второе поколение липидных наночастиц SLN, разработаны в 1999 году с целью устранения проблемы быстрого высвобождения терапевтического средства, наблюдаемого при использовании SLN [77]. NLC представляют собой наночастицы, состоящие из твердой липидной матрицы и содержащие дополнительно жидкий липид или масло. Смесь твердого и жидкого липида способствует равномерной инкапсуляции соединений и предотвращает их быструю диффузию [78, 79]. NLC могут быть получены несколькими способами, из которых наиболее часто используется гомогенизация при высоком давлении, а также микроэмульсионным методом, фазовой инверсией и др. Первые препараты, содержащие NLC, крем NanoRepair Q10™ и сыворотка NanoRepair Q10™ (Dr. Rimpler GmbH, Германия) были впервые представлены на косметическом рынке в 2005 году. В настоящее время в продаже представлено более 30 косметических средств, содержащих NLC, однако, фармацевтические препараты отсутствуют [80, 81].

Липид-полимерные гибридные наночастицы

Наконец, сравнительно недавно были разработаны липид-полимерные гибридные наночастицы (LPN,

lipid-polymer hybrid nanoparticles), которые сочетают в себе характеристики как полимерных наночастиц, так и липосом. В наноконтейнерах этого вида терапевтический препарат инкапсулирован в полимерное ядро, окруженное липидным бислоем, модифицированным ПЭГ [82]. LPN обладают высокой стабильностью и характеризуются равномерным высвобождением загруженного соединения, тогда как липидный бислой обеспечивает высокую биосовместимость [83]; сочетание этих факторов сулит им большое будущее в качестве новых эффективных носителей, однако пока их терапевтический эффект не доказан.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ НА ОСНОВЕ МЕМБРАН ЕСТЕСТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Отдельный интерес представляют средства доставки на основе мембран природного происхождения, основные достоинства которых – высокая биосовместимость и стабильность получаемого носителя (рис. 2). У этих методов имеется огромный потенциал для создания на их основе интеллектуальных систем доставки [84, 85]. Предполагается возможность использования этих методов для молекулярно-направленной терапии, эффективной и легко управляемой. Однако скорее всего вероятными недостатками будут высокая стоимость получения, трудность очистки, а также пониженная стабильность при хранении.

Виросомы

Виросомы – везикулы, содержащие встроенные в фосфолипидный бислой вирусные гликопротеиды (рис. 2А). В качестве последних выступают такие белки, как нейраминидаза [86], гемагглютинин вируса гриппа [87] и белок L оболочки вируса гепатита В [88]. Присутствие этих белковых молекул придает везикулам ряд положительных свойств: структурную стабильность, направленность доставки, а также способствует рецептор-опосредованному эндоцитозу и последующему высвобождению содержимого носителей в цитоплазму за счет слияния с мембраной лизосомы [89]. Благодаря этим характеристикам виросомы могут использоваться как носители терапевтических препаратов [87, 90], выступать в роли адъюванта и в качестве вакцин, некоторые из которых уже допущены к клиническому применению [91, 92]. Ввиду того, что для получения виросом используются вирусы, патогенные для человека, опасность и потенциально сильная *in vivo* иммуногенность являются основными недостатками данного носителя. В настоящее время изучение виросом направлено на возможность их применения в качестве вакцин и адъювантов, используемых в терапии опухолей [93] и при ВИЧ-инфекции [94].

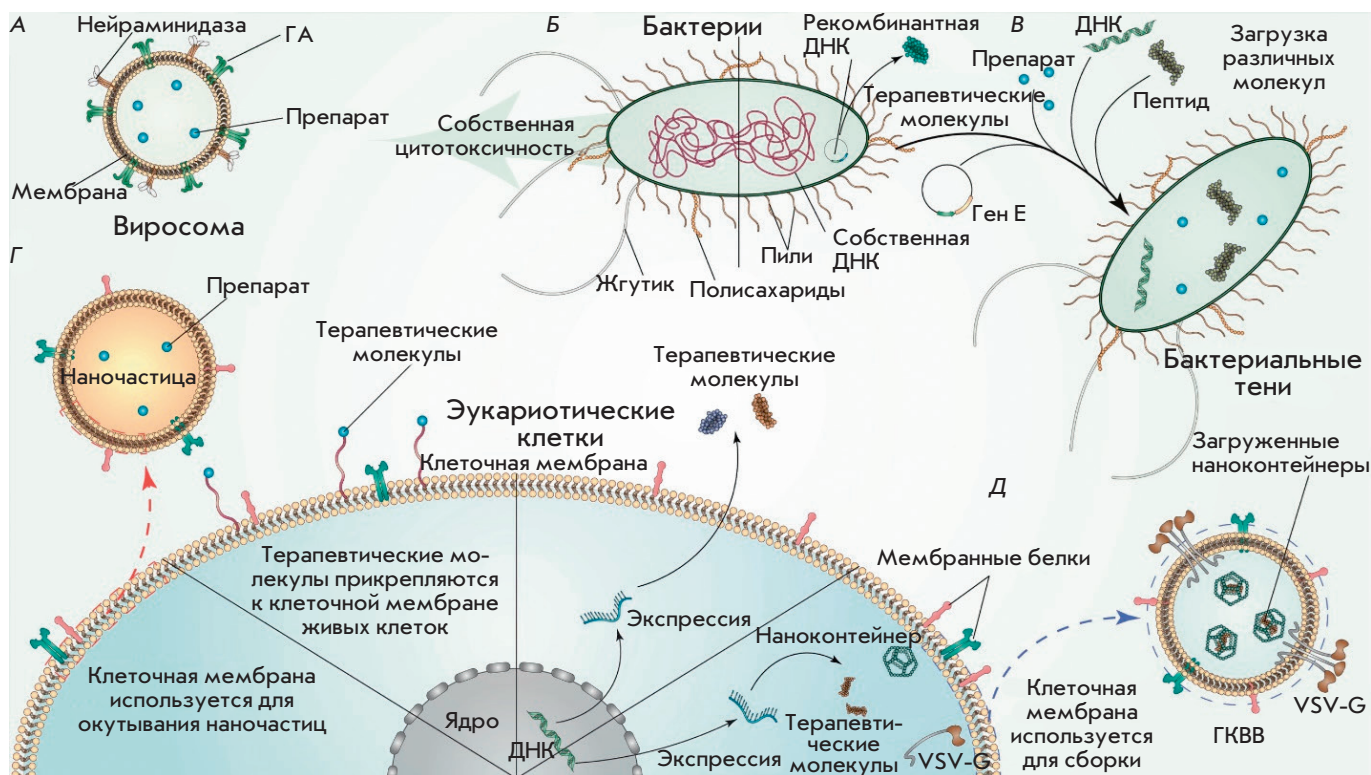


Рис. 2. Средства доставки на основе мембран естественного происхождения. Виросомы (А) представляют собой везикулы, модифицированные вирусными белками. Средства доставки на основе бактерий (Б) могут обладать собственной цитотоксичностью и быть генетически модифицированы для секреции различных молекул. Исключение содержимого цитоплазмы позволяет получить бактериальные тени, используемые для доставки не только плазмидной ДНК, но и низкомолекулярных препаратов, пептидов и нуклеиновых кислот (В). Эукариотические клетки используются для инкапсулирования искусственных наночастиц (Г), привязки лигандов к поверхности живой клетки, для экспрессии терапевтических молекул, а также для продукции ГКВВ (генетически кодируемых внеклеточных везикул, Д), которые также окружены мембраной клетки-родителя. ГА – гемагглютинин

Бактерии

С самого рождения ребенок получает от родителей множество видов бактерий, которые населяют его органы, ткани и полости. Подвергнутые генетическим модификациям или трансплантации бактерии могут использоваться для доставки различных соединений (рис. 2Б). С этой целью применяют, например, непатогенные бактерии, такие, как *Lactococcus lactis*, *Streptococcus gordonii* и др. Активно изучают рекомбинантные молочнокислые бактерии, способные доставлять нужные вещества в слизистые человека и животных [95, 96]. Другие виды бактерий применяют для разработки подходов к терапии опухолей и диагностике, что во многом обусловлено способностью таких бактерий, как грамположительные анаэробы рода *Clostridium*, проникать, колонизировать и накапливаться в гипоксических и некротических опухолевых тканях. Эти бактерии обладают собственной цитотоксичностью, а с помощью генетиче-

ских модификаций можно придавать им дополнительные полезные свойства, такие, как регулируемая экспрессия различных терапевтических и визуализирующих агентов [97, 98].

Бактериальные тени

Бактериальные тени (БТ) – носители на основе клеточных оболочек, которые получают путем экспрессии гена лизиса Е бактериофага в грамотрицательных бактериях (рис. 2В) [99]. В результате лизиса из клеток удаляется все содержимое цитоплазмы, в том числе и генетический материал, а остаются поверхностные антигенные элементы, такие, как жгутик, фимбрии и полисахариды. Оболочки на основе БТ обладают собственной адъювантной активностью, что делает их перспективными для разработки вакцин [100]. БТ можно также нагружать низкомолекулярными агентами, пептидами и ДНК. Для более контролируемой загрузки частиц разработаны раз-

личные варианты модификации внутренней поверхности клеток, в том числе такие, как изменение живых клеток перед лизисом [101, 102].

Эукариотические клетки

Рассматривается также возможность использования в качестве носителей эукариотических клеток, таких, как эритроциты, тромбоциты, лимфоциты, макрофаги, стволовые и дендритные клетки (рис. 2Г) [84, 103]. Среди этих клеток особо выделяют эритроциты, самые распространенные клетки крови, лишенные генетического материала и обладающие большим временем циркуляции в кровотоке. Для загрузки агента можно использовать внутренний объем эритроцитов или прикреплять лекарственные средства/частицы/модификаторы к поверхности клетки [104, 105]. Возможно использование клеток иммунной системы и стволовых клеток в качестве носителей благодаря их тропизму к очагам воспаления и опухолям, а также способности преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Кроме того, стволовые клетки могут быть трансдуцированы с целью продукции интерферонов и интерлейкинов *in situ*. Показано, что они способны поглощать кремниевые, полимерные и липидные наночастицы без потери жизнеспособности [84, 106]. Макрофаги могут преодолевать ГЭБ, они активно используются в качестве носителей наночастиц благодаря способности фагоцитировать частицы и концентрироваться в пораженных тканях, где загруженные препараты постепенно высвобождаются. Этот подход, получивший название «тroyанского коня», применяется в терапии глиом [107], ВИЧ-пораженных участках мозга и гипоксических солидных опухолей [84].

Генетически кодируемые внеклеточные везикулы

Совсем недавно создан новый тип носителей – генетически кодируемые внеклеточные везикулы (ГКВВ) (рис. 2Д). При помощи расчетных методов разработан самособирающийся трехмерный полый белковый додекаэдрический каркас из 20 молекул KDPG-альдолазы [108], на основе которого созданы ГКВВ. Структурной единицей данных везикул является трехдоменный полипептид, каждый из доменов которого осуществляет необходимую для сборки ГКВВ функцию. Первый домен действует как сигнал мистриоилирования, который определяет мембранную локализацию конструкции; второй домен образует трехмерный белковый каркас, а третий рекрутирует эндосомальный комплекс сортировки ESCRT, необходимый для транспорта, который отвечает за отпочкование от мембраны. Второй важный компонент везикул, определяющий их способность проникать в клетки-мишени, – наличие на поверхности заяко-

ренного в мембране белка оболочки вируса везикулярного стоматита VSV-G, отвечающего за транспорт из эндосомы. При экспрессии этих конструкций в эукариотических клетках образуются везикулы со средним радиусом 100 нм, покрытые клеточной мембраной и содержащие несколько белковых додекаэдров [109]. Полученные частицы способны загружать и доставлять необходимые вещества – низкомолекулярные соединения, РНК, пептиды, белки – в другие клетки, при этом защищая их от деградации. Кроме того, поверхность ГКВВ может быть дополнительно модифицирована антителами, рецепторами или низкомолекулярными лигандами для направленного транспорта.

ПРИРОДНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ

Внеклеточные везикулы (ВВ) – это липидные пузырьки, которые секретируются практически всеми типами клеток. Будучи переносчиками РНК, мембранных и цитоплазматических белков, липидов и углеводов, ВВ выполняют различные функции в организме, например, участвуют в межклеточной коммуникации. В зависимости от происхождения ВВ подразделяют на эктосомы (происходят от нейтрофилов/моноцитов), простатосомы (выделены из семенной жидкости), вексосомы (ассоциированы с аденовирусным вектором) и т.д. По механизму биогенеза ВВ разделяют на экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца [110]. Размер ВВ также варьирует, например, размер экзосом находится в пределах 40–120 нм, а микровезикул 50–1000 нм [111].

Благодаря таким свойствам, как биосовместимость, неиммуногенность (при получении из подходящего типа клеток), а также способности проходить через ГЭБ, ВВ рассматривают как перспективное средство доставки различных молекул [112]. Однако лишь небольшая часть внутривенно введенных ВВ проникала в сердце и мозг мышей, а наибольшее количество обнаруживалось в селезенке и печени [113]. Следует отметить, что ВВ преимущественно обладают отрицательным зарядом, что делает их фармакокинетику схожей с отрицательно заряженными липосомами [113]. Кроме того, фармакокинетика ВВ сильно зависит от набора белков и липидов на поверхности. Например, фосфатидилсерин, локализованный на поверхности экзосом, способствует их связыванию с клетками, экспрессирующими на поверхности рецептор Timd4 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule), что, в свою очередь, может указывать на усиленный захват таких экзосом макрофагами [114]. Изменение состава поверхностных белков ВВ также вызывает определенный эффект. Например, деградация интегринов- $\alpha 6$ и $-\beta 1$ значительно уменьшала накопление ВВ в легкой ткани мышцы. При этом та-

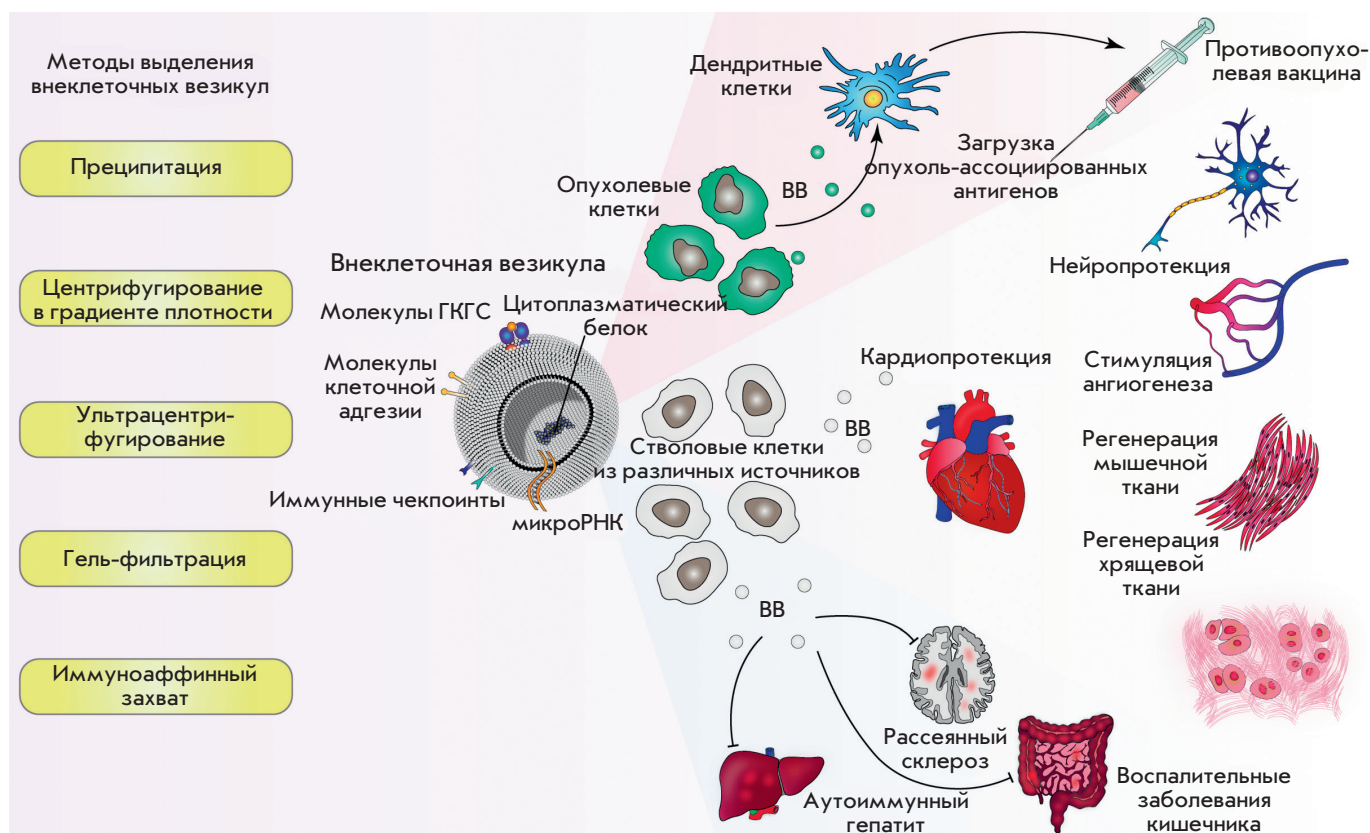


Рис. 3. Строение, способы выделения и области применения внеклеточных везикул. Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой липидные комплексы, производимые многими клетками. На их поверхности, а также во внутренней полости содержатся биологически активные молекулы, среди которых микроРНК, иммунные чекпоинты, молекулы клеточной адгезии и ГКГС. Существует несколько основных методов выделения и очистки внеклеточных везикул (слева). Опухолевые ВВ могут применяться для доставки антигенов в дендритные клетки с целью получения дендритно-клеточных вакцин. Природные ВВ, полученные из стволовых клеток, обладают множественными эффектами и могут найти применение как в регенеративной медицине (например, для регенерации и протекции различных тканей и органов), так и при аутоиммунных заболеваниях различной этиологии и локализации (справа)

кие физико-химические свойства ВВ, как размер и ζ -потенциал, практически не изменяются [115]. Таким образом, ВВ могут селективно накапливаться в тканях в зависимости от набора лигандов на поверхности, что делает их перспективными носителями для направленной доставки.

Методы выделения и очистки ВВ достаточно сложны и требуют дорогостоящего оборудования. Основными способами очистки являются ультрацентрифугирование, центрифугирование в градиенте плотности, ультрафильтрация, преципитация, а также гель-фильтрация [116–119].

Помимо доставки терапевтических молекул, ВВ из разных типов клеток обладают различными свойствами, которые могут использоваться в терапии самых разнообразных заболеваний от ишемии и осте-

онекроза до рассеянного склероза и онкопатологии (рис. 3).

Природные внеклеточные везикулы в модуляции иммунного ответа

Прежде всего, ВВ способны оказывать значительное влияние на функционирование иммунной системы, они могут как стимулировать, так и подавлять иммунный ответ. Например, экзосомы из ДК, содержат молекулы ГКГС в комплексе с антигеном и способны вызывать специфический иммунный ответ [120]. Еще одна интересная особенность экзосом, произошедших из ДК, – способность захватывать лиганды Толл-подобных рецепторов и активировать другие дендритные клетки, что также может стать причиной иммунного ответа [121].

Известны также иммуносупрессивные ВВ. Например, мышцы линии BALB/c, иммунизированные овалбумином, вырабатывают ВВ, которые индуцируют у мышей-реципиентов развитие специфической иммунной толерантности к овалбумину [122]. Иммуносупрессивные ВВ считают потенциальными терапевтическими агентами при различных аутоиммунных и воспалительных заболеваниях. Например, везикулы, полученные от мезенхимальных стволовых клеток (МСК), способны подавлять пролиферацию мононуклеарных клеток, полученных от мыши с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЭАЭ), моделирующим рассеянный склероз [123]. Иммуномодулирующее действие внеклеточных везикул показано и на моделях воспалительных заболеваний кишечника и аутоиммунного гепатита [107, 108].

Опухолевые ВВ перспективны при создании противоопухолевых вакцин, поскольку они способны переносить белки, которые могут быть онкоантигенами. Например, в мышинной модели глиобластомы доставка опухолеассоциированных антигенов к ДК была значительно более эффективной при использовании экзосом, чем опухолевого лизата [124]. Однако опухолевые ВВ следует применять с большой осторожностью. Так, апоптотические ВВ из клеток глиобластомы могут индуцировать резистентность к терапии и более агрессивное поведение соседних опухолевых клеток за счет переноса компонентов сплайсосом [125].

Природные внеклеточные везикулы в регенеративной медицине

Большие перспективы использования ВВ лежат в области регенеративной медицины и трансплантологии. Показано непосредственное плеiotропное регенеративное действие ВВ на различные органы и системы. Так, например, ВВ способны стимулировать рост сосудов, что может найти применение в трансплантологии, при ишемических нарушениях и язвах при диабетической стопе, а также для предотвращения остеонекроза [126–129]. Экзосомы, полученные от МСК, могут способствовать синтезу коллагена, регенерации хрящевой и мышечной ткани [130–132].

Описано также тканепротекторное действие ВВ, полученных от стволовых клеток. Например, благодаря активации Wnt/ β -катенин сигнального каскада экзосомы от МСК способны усиливать выживаемость кардиомиоцитов даже в условиях циклической ишемии и реперфузии [133]. На мышинной модели инфаркта миокарда показано, что экзосомы от эмбриональных стволовых клеток, содержащие различные микроРНК, улучшали функционирование сердечной мышцы, а также способствовали выживаемости ми-

оцитов [78]. Выявлено и нейропротекторное действие экзосом, полученных от различных МСК [134, 135]. Так, ВВ уменьшали глиоз, вызванный воспалением мозга при инъекции липополисахарида (ЛПС) незрелым мышам, уменьшали апоптоз нейронов, а также снижали выраженность структурных нарушений в белом веществе головного мозга [134]. Более того, под воздействием ВВ наблюдалось улучшение результатов поведенческих тестов на пространственную память у мышей. Однако механизм нейропротекторного действия ВВ не определен [134].

Природные ВВ определенно имеют огромный терапевтический потенциал. Однако из-за комплексного, часто малоизученного механизма действия, вероятной неоднородности состава, нежелательной иммуносупрессии в некоторых случаях, а также активации пролиферативных сигнальных путей эти комплексы должны применяться с повышенной осторожностью.

ВЕЗИКУЛЫ, ЗАГРУЖЕННЫЕ ИСКУССТВЕННО

Помимо перечисленных способов применения ВВ возможна их искусственная загрузка различными веществами. Основным преимуществом доставки терапевтических препаратов с помощью везикул является их природное происхождение, что обуславливает низкую иммуногенность. Дополнительное преимущество ВВ – облегченный захват клетками-мишенями за счет различных рецептор-опосредованных взаимодействий между мембраной ВВ и клеткой [10].

Существуют две стратегии получения искусственно загруженных везикул – совместная *in vitro* инкубация ВВ и терапевтических агентов, чаще всего низкомолекулярных, а также создание генетических конструкций с последующей трансфекцией клеток с целью получения клеток-доноров, вырабатывающих ВВ, загруженных необходимыми веществами. Как правило, для *in vitro* загрузки везикул используют малые липофильные молекулы, способные пассивно проникать в везикулы при совместной инкубации. Показано, что инкубация раствора куркумина и экзосом в фосфатном буфере при комнатной температуре в течение 5 мин приводит к проникновению терапевтического агента внутрь ВВ [136]. Загруженные таким способом экзосомы усиливают противовоспалительный эффект куркумина, а также ингибируют секрецию ИЛ-6 и ФНО- α у модельных животных и обладают способностью проникать через ГЭБ. Этот метод использован также для загрузки ВВ такими цитостатическими агентами, как паклитаксел и доксирубицин [137]. Показано, что везикулы, в отличие от свободных форм терапевтических агентов, обладали способностью про-

никать через ГЭБ и распределяться в тканях мозга. Наблюдалось увеличение цитотоксической активности паклитаксела и доксирубицина в составе экзосом. Возможность снижения терапевтической дозы цитостатиков при онкологических заболеваниях является несомненным преимуществом данной лекарственной формы, так как до сих пор не удается избавиться от таких побочных эффектов этих препаратов, как системное воспаление и токсическое воздействие на органы [138].

Пассивный транспорт в экзосомы не всегда осуществляется эффективно. Для увеличения эффективности загрузки используют различные модификации. Так, везикулы и терапевтические агенты инкубируют в присутствии поверхностно-активных веществ, например сапонины [139]. Механизм действия сапонины основан на образовании комплекса с холестерином экзосом, что облегчает проникновение терапевтического агента [140]. Другой способ увеличения эффективности загрузки везикул – применение электропорации. Использование этого метода позволило увеличить эффективность загрузки везикул доксирубицином до 20%. Широкого распространения достигло использование электропорации для загрузки везикул препаратами нуклеиновых кислот. В качестве терапевтического агента в данном случае чаще всего используются мРНК и микроРНК. Так, разработаны экзосомы, несущие микроРНК, специфичные к мутантной форме GTP-азы KRAS^{G12D}, которая способна спровоцировать развитие рака поджелудочной железы [141]. Инкубация таких везикул с клетками рака поджелудочной железы приводит к снижению уровня мРНК KRAS^{G12D}. При тестировании препарата на мышах наблюдалось увеличение выживаемости, супрессия пролиферации раковых клеток, снижение метастазирования по сравнению с контрольными животными. Помимо терапии онкологических заболеваний, комплексы микроРНК-везикулы могут быть использованы при нейродегенеративных заболеваниях. Показана эффективность таких комплексов для снижения в культуре клеток количества α -синуклеина – белка, ассоциированного с болезнью Паркинсона [142]. После внутривенного введения мышам экзосом, нагруженных микроРНК, наблюдалось снижение концентрации мРНК α -синуклеина и уровня самого белка в исследованных областях мозга. Также созданы экзосомы, нагруженные микроРНК к β -секретазе (BACE1). Продукт этого гена участвует в образовании β -амилоидов, ассоциированных с болезнью Альцгеймера. Таргетинг нейронов экзосомами осуществляли при помощи нейрон-специфичного RVG-пептида, при этом удалось достичь снижения уровня белка (62%) и синтеза мРНК (60%) BACE1 [112].

Несмотря на то что электропорация считается достаточно эффективным способом доставки нуклеиновых кислот в везикулы, этот метод имеет существенный недостаток, а именно, образование агрегатов РНК в везикулах [143]. Уменьшение агрегации наблюдается при добавлении EDTA, а также при использовании специальных полимерных электродов и кислого ацетатного буфера для электропорации.

Для увеличения эффективности загрузки предложена принципиально отличная стратегия получения нагруженных везикул. Она заключалась в трансфекции клеток-доноров, секретирующих везикулы, рекомбинантными ДНК, кодирующими, например, микроРНК. Таким образом получают клетки, секретирующие в среду нужную микроРНК [144]. Также удалось вызвать супрессию роста ксенотрансплантата рака молочной железы при помощи адресной доставки микроРНК в везикулах, изолированных из культуры трансфицированных клеток [145]. При помощи трансформации клеток можно получить ВВ, несущие не только нуклеиновые кислоты, но и белки. При этом заякоренные в мембране белки переносятся в экзосомы путем слияния белка интереса с участком миристилирования и доменом, связывающим фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат [146].

Таким образом, использование для адресной доставки как немодифицированных, так и дополнительно нагруженных терапевтическими агентами ВВ является современным и актуальным направлением исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология создания и загрузки наночастиц терапевтическими препаратами, разработанная во второй половине прошлого века, до сих пор остается одной из основных и, пожалуй, самой перспективной стратегией доставки лекарственных агентов. На первых порах изучения липидоподобных наноконтейнеров основное внимание уделялось увеличению стабильности, биосовместимости и биораспределения искусственно создаваемых наноносителей. Варьирование состава липидного слоя позволяет инкапсулировать как гидрофобные, так и гидрофильные соединения, благодаря чему можно подобрать свой способ транспортировки практически любого вещества. К перспективным направлениям следует отнести применение генетических конструкций с контролируемой экспрессией [147], а также одновременную загрузку наноконтейнеров разными по механизму действия веществами, что позволяет существенно увеличить эффективность воздействия [148]. В настоящий момент приоритетным направлением является увеличение таргетности доставки. Данная задача решается как путем модификации уже давно известных искус-

ственных наноконтейнеров, так и с помощью сравнительно недавно открытых генетически кодируемых или природных внеклеточных везикул. Высокая биосовместимость и биоразлагаемость дают им огромное преимущество перед другими искусственными наночастицами. И хотя пока сложно оценить их реальное фармацевтическое будущее во многом из-за относительно высокой себестоимости, нет сомнений в способности ВВ и ГКВВ эффективно доставлять лекарственные препараты *in vivo*. Таким образом, в ближайшие 10–20 лет можно с уверенностью ожи-

дать выхода на рынок перспективных препаратов, основанных на везикулярном транспорте, для терапии тяжелых и плохо поддающихся лечению хронических, аутоиммунных и онкологических заболеваний. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 18-74-10079 «Самособирающиеся генетически кодируемые наноконтейнеры как инструмент лечения рассеянного склероза».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yin H., Kauffman K.J., Anderson D.G. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017. V. 16. № 6. P. 387–399.
2. Ragelle H., Danhier F., Préat V., Langer R., Anderson D.G. // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2017. V. 14. № 7. P. 851–864.
3. Kreuter J. // *Int. J. Pharm.* 2007. V. 331. № 1. P. 1–10.
4. Yu M., Wu J., Shi J., Farokhzad O.C. // *J. Control. Release.* 2016. V. 240. P. 24–37.
5. Shah M.A.A., Ali Z., Ahmad R., Qadri I., Fatima K., He N. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2015. V. 15. № 1. P. 41–53.
6. Nikitenko N.A., Prassolov V.S. // *Acta Naturae.* 2013. V. 5. № 3. P. 35–53.
7. Liu Z., Jiao Y., Wang Y., Zhou C., Zhang Z. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. V. 60. № 15. P. 1650–1662.
8. Sahin S., Selek H., Ponchel G., Ercan M.T., Sargon M., Hincal A.A., Kas H.S. // *J. Control. Release.* 2002. V. 82. № 2–3. P. 345–358.
9. Blanco E., Shen H., Ferrari M. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. № 9. P. 941–951.
10. György B., Hung M.E., Breakefield X.O., Leonard J.N. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2014. V. 55. № 1. P. 439–464.
11. Bangham A.D. // *Chem. Phys. Lipids.* 1993. V. 64. № 1–3. P. 275–285.
12. Vemuri S., Rhodes C. // *Pharm. Acta Helv.* 1995. V. 70. № 2. P. 95–111.
13. Kirby C., Gregoriadis G. // *Nat. Biotechnol.* 1984. V. 2. № 11. P. 979–984.
14. Gruner S.M., Lenk R.P., Janoff A.S., Ostro N.J. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. № 12. P. 2833–2842.
15. Szoka F., Papahadjopoulos D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978. V. 75. № 9. P. 4194–4198.
16. Milsmann M.H., Schwendener R.A., Weder H.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1978. V. 512. № 1. P. 147–155.
17. Miller C.R., Bondurant B., McLean S.D., McGovern K.A., O'Brien D.F. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. № 37. P. 12875–12883.
18. Campbell R.B., Ying B., Kuesters G.M., Hemphill R. // *J. Pharm. Sci.* 2009. V. 98. № 2. P. 411–429.
19. Broekgaarden M., de Kroon A.I.P.M., Gulik T.M. van, Heger M. // *Curr. Med. Chem.* 2014. V. 21. № 3. P. 377–391.
20. Lowe S.W., Ruley H.E., Jacks T., Housman D.E. // *Cell.* 1993. V. 74. № 6. P. 957–967.
21. Guo J., Ping Q., Jiang G., Huang L., Tong Y. // *Int. J. Pharm.* 2003. V. 260. № 2. P. 167–173.
22. Allen C., Dos Santos N., Gallagher R., Chiu G.N.C., Shu Y., Li W.M., Johnstone S.A., Janoff A.S., Mayer L.D., Webb M.S., et al. // *Biosci. Rep.* 2002. V. 22. № 2. P. 225–250.
23. Suk J.S., Xu Q., Kim N., Hanes J., Ensign L.M. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. V. 99. P. 28–51.
24. Sharma A., Sharma U.S. // *Int. J. Pharm.* 1997. V. 154. № 2. P. 123–140.
25. Bergström K., Osterberg E., Holmberg K., Hoffman A.S., Schuman T.P., Kozłowski A., Harris J.H. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1994. V. 6. № 2. P. 123–132.
26. Pasut G., Paolino D., Celia C., Mero A., Joseph A.S., Wolfram J., Cosco D., Schiavon O., Shen H., Fresta M. // *J. Control. Release.* 2015. V. 199. P. 106–113.
27. Kabilova T., Shmendel E., Gladkikh D., Morozova N., Maslov M., Chernolovskaya E., Vlassov V., Zenkova M., Kabilova T., Shmendel E., et al. // *Molecules.* 2018. V. 23. № 12. P. 3101.
28. Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Shipunova V.O., Babenyshev A.V., Balalaeva I.V., Nikitin P.I., Deyev S.M., Nikitin M.P. // *Nanoscale.* 2019. V. 11. № 4. P. 1636–1646.
29. Markov O.O., Mironova N.L., Maslov M.A., Petukhov I.A., Morozova N.G., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. № 2. P. 200–210.
30. Markov O.V., Mironova N.L., Shmendel E.V., Serikov R.N., Morozova N.G., Maslov M.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // *J. Control. Release.* 2015. V. 213. P. 45–56.
31. Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., Ryabova A., Avishai G., Katrivass L., Giannini C., Levi-Kalisman Y., Kotlyar A. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 130. P. 296–305.
32. Matsumura Y., Gotoh M., Muro K., Yamada Y., Shirao K., Shimada Y., Okuwa M., Matsumoto S., Miyata Y., Ohkura H., et al. // *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2004. V. 15. № 3. P. 517–525.
33. Espelin C.W., Leonard S.C., Geretti E., Wickham T.J., Hendriks B.S. // *Cancer Res.* 2016. V. 76. № 6. P. 1517–1527.
34. Sankhala K.K., Mita A.C., Adinin R., Wood L., Beeram M., Bullock S., Yamagata N., Matsuno K., Fujisawa T., Phan A.T. // *J. Clin. Oncol.* 2009. V. 27. 15S; abstr. 2535.
35. // clinicaltrials.gov. 2008. P. 2/1/2008-12/1/2013.
36. Torchilin V.P. // *Handbook of experimental pharmacology.* New York: Springer, 2010. P. 3–53.
37. Zhou G., Wilson G., Hebbard L., Duan W., Liddle C., George J., Qiao L. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 12. P. 13446–13463.
38. Bobo D., Robinson K.J., Islam J., Thurecht K.J., Corrie S.R. // *Pharm. Res.* 2016. V. 33. № 10. P. 2373–2387.
39. Barenholz Y. (Chezy). // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. № 2. P. 117–134.
40. Stepanov A., Lomakin Y., Gabibov A., Belogurov A. // *Curr. Med. Chem.* 2017. V. 24. № 17. P. 1761–1771.
41. Belogurov A.A., Stepanov A.V., Smirnov I.V., Melamed D., Bacon A., Mamedov A.E., Boitsov V.M., Sashchenko L.P., Ponomarenko N.A., Sharanova S.N., et al. // *FASEB J.* 2013. V. 27. № 1. P. 222–231.
42. Belogurov A., Zakharov K., Lomakin Y., Surkov K.,

- Avtushenko S., Kruglyakov P., Smirnov I., Makshakov G., Lockshin C., Gregoriadis G., et al. // *Neurotherapeutics*. 2016. V. 13. № 4. P. 895–904.
43. Lomakin Y., Belogurov A., Glagoleva I., Stepanov A., Zakharov K., Okunola J., Smirnov I., Genkin D., Gabibov A. // *Mediators Inflamm*. 2016. V. 2016. P. 1–8.
44. Ivanova V.V., Khaiboullina S.F., Gomzikova M.O., Martynova E.V., Ferreira A.M., Garanina E.E., Sakhapov D.I., Lomakin Y.A., Khaibullin T.I., Granatov E.V., et al. // *Front. Immunol*. 2017. V. 8. P. 1335.
45. Bernasconi V., Norling K., Bally M., Höök F., Lycke N.Y. // *J. Immunol. Res*. 2016. V. 2016. P. 1–16.
46. Nisini R., Poerio N., Mariotti S., De Santis F., Fraziano M. // *Front. Immunol*. 2018. V. 9. P. 155.
47. Bartelds R., Nematollahi M.H., Pols T., Stuart M.C.A., Pardakhty A., Asadikaram G., Poolman B. // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 4. P. e0194179.
48. Rajera R., Nagpal K., Singh S.K., Mishra D.N. // *Biol. Pharm. Bull*. 2011. V. 34. № 7. P. 945–953.
49. Kaur D., Kumar S. // *J. Drug Deliv. Ther*. 2018. V. 8. № 5. P. 35–43.
50. Moghassemi S., Hadjizadeh A. // *J. Control. Release*. 2014. V. 185. P. 22–36.
51. Shilpa S., Srinivasan B.P., Chauhan M. // *Int. J. Drug Deliv*. 2011. V. 3. № 1. P. 14–24.
52. Zeng W., Li Q., Wan T., Liu C., Pan W., Wu Z., Zhang G., Pan J., Qin M., Lin Y., et al. // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016. V. 141. P. 28–35.
53. Marianecchi C., Di Marzio L., Rinaldi F., Celia C., Paolino D., Alhaique F., Esposito S., Carafa M. // *Adv. Colloid Interface Sci*. 2014. V. 205. P. 187–206.
54. Touitou E. US Pat. 5,716,638. 1996.
55. Yang L., Wu L., Wu D., Shi D., Wang T., Zhu X. // *Int. J. Nanomedicine*. 2017. V. 12. P. 3357–3364.
56. Bansal S., Prasad Kashyap C., Aggarwal G., Harikumar S. // *IJRPC*. 2012. V. 2. № 3. P. 704–713.
57. Sankar V., Ramesh S., Siram K. Alopecia. London: InTech., 2018. P. 138.
58. Duangjit S., Opanasopit P., Rojanarata T., Ngawhirunpat T. // *Adv. Mater. Res*. 2011. V. 194–196. P. 537–540.
59. Chen J., Lu W.-L., Gu W., Lu S.-S., Chen Z.-P., Cai B.-C. // *Expert Opin. Drug Deliv*. 2013. V. 10. № 6. P. 845–856.
60. Gupta A., Aggarwal G., Singla S., Arora R. // *Sci. Pharm*. 2012. V. 80. № 4. P. 1061–1080.
61. Irfan M., Verma S., Ram A. // *Asian J. Pharm. Clin. Res*. 2012. V. 5. № 3. P. 162–165.
62. Ghannoum M., Isham N., Herbert J., Henry W., Yurdakul S. // *J. Clin. Microbiol*. 2011. V. 49. № 5. P. 1716–1720.
63. Lu K., Xie S., Han S., Zhang J., Chang X., Chao J., Huang Q., Yuan Q., Lin H., Xu L., et al. // *J. Transl. Med*. 2014. V. 12. № 1. P. 72.
64. May J.P., Li S.-D. // *Expert Opin. Drug Deliv*. 2013. V. 10. № 4. P. 511–527.
65. Nobuto H., Sugita T., Kubo T., Shimose S., Yasunaga Y., Murakami T., Ochi M. // *Int. J. Cancer*. 2004. V. 109. № 4. P. 627–635.
66. Sawant R.R., Torchilin V.P. // *Soft Matter*. 2010. V. 6. № 17. P. 4026.
67. Khulbe P. Novel Approaches for Drug Delivery. Hershey: IGI Global, 2017. 515 p.
68. Wong H.L., Bendayan R., Rauth A.M., Li Y., Wu X.Y. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2007. V. 59. № 6. P. 491–504.
69. Mukherjee S., Ray S., Thakur R. // *Indian J. Pharm. Sci*. 2009. V. 71. № 4. P. 349.
70. Mehnert W., Mäder K. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2001. V. 47. № 2–3. P. 165–196.
71. Wissing S., Kayser O., Müller R. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2004. V. 56. № 9. P. 1257–1272.
72. Müller R.H., Mäder K., Gohla S. // *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2000. V. 50. № 1. P. 161–177.
73. Maheswaran A., Brindha P., Mullaicharam A.R., Masilamani K. // *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. 2013. V. 23. № 1. P. 295–301.
74. Olbrich C., Gessner A., Schröder W., Kayser O., Müller R.H. // *J. Control. Release*. 2004. V. 96. № 3. P. 425–435.
75. Dolatabadi J.E.N., Valizadeh H., Hamishehkar H. // *Adv. Pharm. Bull*. 2015. V. 5. № 2. P. 151–159.
76. zur Mühlen A., Schwarz C., Mehnert W. // *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 1998. V. 45. № 2. P. 149–155.
77. Müller R.H., Radtke M., Wissing S.A. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2002. V. 54. P. S131–S155.
78. Li Q., Cai T., Huang Y., Xia X., Cole S., Cai Y. // *Nanomaterials*. 2017. V. 7. № 6. P. 122.
79. Iqbal M.A., Md S., Sahni J.K., Baboota S., Dang S., Ali J. // *J. Drug Target*. 2012. V. 20. № 10. P. 813–830.
80. Khan S., Baboota S., Ali J., Khan S., Narang R., Narang J. // *Int. J. Pharm. Investig*. 2015. V. 5. № 4. P. 182.
81. Czajkowska-Kośnik A., Szekalska M., Winnicka K. // *Pharmacol. Reports*. 2019. V. 71. № 1. P. 156–166.
82. Hadinoto K., Sundaresan A., Cheow W.S. // *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2013. V. 85. № 3. P. 427–443.
83. Chan J.M., Zhang L., Yuet K.P., Liao G., Rhee J.-W., Langer R., Farokhzad O.C. // *Biomaterials*. 2009. V. 30. № 8. P. 1627–1634.
84. Yoo J.-W., Irvine D.J., Discher D.E., Mitragotri S. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2011. V. 10. № 7. P. 521–535.
85. Zhang P., Liu G., Chen X. // *Nano Today*. 2017. V. 13. P. 7–9.
86. Almeida J., Edwards D.C., Brand C., Heath T. // *Lancet*. 1975. V. 306. № 7941. P. 899–901.
87. de Jonge J., Leenhouts J.M., Holtrop M., Schoen P., Scherrer P., Cullis P.R., Wilschut J., Huckriede A. // *Biochem. J*. 2007. V. 405. № 1. P. 41–49.
88. Kuroda S., Liu Q., Jung J., Iijima M., Yoshimoto N., Niimi T., Maturana A., Shin S.H., Jeong S.-Y., Choi E.K., et al. // *Int. J. Nanomedicine*. 2015. V. 10. № 1. P. 4159.
89. Liu H., Tu Z., Feng F., Shi H., Chen K., Xu X. // *Acta Pharm*. 2015. V. 65. № 2. P. 105–116.
90. Mohammadzadeh Y., Rasouli N., Aref M.H.S., Tabib N.S.S., Abdoli A., Biglari P., Saleh M., Tabatabaieian M., Kheiri M.T., Jamali A. // *Biotechnol. Lett*. 2016. V. 38. № 8. P. 1321–1329.
91. Bovier P.A. // *Expert Rev. Vaccines*. 2008. V. 7. № 8. P. 1141–1150.
92. Blom R.A.M., Amacker M., van Dijk R.M., Moser C., Stumbles P.A., Blank F., von Garnier C. // *Front. Immunol*. 2017. V. 8. P. 359.
93. Kaneda Y. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2012. V. 64. № 8. P. 730–738.
94. Leroux-Roels G., Maes C., Clement F., van Engelenburg F., van den Dobbelen M., Adler M., Amacker M., Lopalco L., Bomsel M., Chalifour A., et al. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. P. e55438.
95. Wang M., Gao Z., Zhang Y., Pan L. // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2016. V. 100. № 13. P. 5691–5701.
96. Bron P.A., Kleerebezem M. // *Front. Microbiol*. 2018. V. 9. P. 1821.
97. Forbes N.S. // *Nat. Rev. Cancer*. 2010. V. 10. № 11. P. 785–794.
98. Hosseinidoust Z., Mostaghaci B., Yasa O., Park B.-W., Singh A.V., Sitti M. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2016. V. 106. № Pt A. P. 27–44.
99. Langemann T., Koller V.J., Muhammad A., Kudela P., Mayr

- U.B., Lubitz W. // *Bioeng. Bugs*. 2010. V. 1. № 5. P. 326–336.
100. Lubitz P., Mayr U.B., Lubitz W. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009. V. 655. P. 159–170.
101. Farjadian F., Moghoofoei M., Mirkiani S., Ghasemi A., Rabiee N., Hadifar S., Beyzavi A., Karimi M., Hamblin M.R. // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. № 4. P. 968–985.
102. Kudela P., Koller V.J., Lubitz W. // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 36. P. 5760–5767.
103. Chen Z., Hu Q., Gu Z. // *Acc. Chem. Res.* 2018. V. 51. № 3. P. 668–677.
104. Villa C.H., Anselmo A.C., Mitragotri S., Muzykantov V. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. V. 106. № Pt A. P. 88–103.
105. Yan J., Yu J., Wang C., Gu Z. // *Small Methods*. 2017. V. 1. № 12. P. 1700270.
106. Stuckey D.W., Shah K. // *Nat. Rev. Cancer*. 2014. V. 14. № 10. P. 683–691.
107. Ngandeu Neubi G.M., Opoku-Damoah Y., Gu X., Han Y., Zhou J., Ding Y. // *Biomater. Sci.* 2018. V. 6. № 5. P. 958–973.
108. Hsia Y., Bale J.B., Gonen S., Shi D., Sheffler W., Fong K.K., Nattermann U., Xu C., Huang P.-S., Ravichandran R., et al. // *Nature*. 2016. V. 535. № 7610. P. 136–139.
109. Votteler J., Ogohara C., Yi S., Hsia Y., Nattermann U., Belnap D.M., King N.P., Sundquist W.I. // *Nature*. 2016. V. 540. № 7632. P. 292–295.
110. Gusachenko O.N., Zenkova M.A., Vlassov V.V. // *Biochem.* 2013. V. 78. № 1. P. 1–7.
111. EL Andaloussi S., Mäger I., Breakefield X.O., Wood M.J.A. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013. V. 12. № 5. P. 347–357.
112. Loughmiller J., Klintworth G. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 4. P. 306–309.
113. Lai C.P., Mardini O., Ericsson M., Prabhakar S., Maguire C., Chen J.W., Tannous B.A., Breakefield X.O. // *ACS Nano*. 2014. V. 8. № 1. P. 483–494.
114. Miyanishi M., Tada K., Koike M., Uchiyama Y., Kitamura T., Nagata S. // *Nature*. 2007. V. 450. № 7168. P. 435–439.
115. Charoenviriyakul C., Takahashi Y., Morishita M., Nishikawa M., Takakura Y. // *Mol. Pharm.* 2018. V. 15. № 3. P. 1073–1080.
116. Merchant M.L., Rood I.M., Deegens J.K.J., Klein J.B. // *Nat. Rev. Nephrol.* 2017. V. 13. № 12. P. 731–749.
117. Vaswani K., Koh Y.Q., Almughlliq F.B., Peiris H.N., Mitchell M.D. // *Reprod. Biol.* 2017. V. 17. № 4. P. 341–348.
118. Foers A.D., Chatfield S., Dagley L.F., Scicluna B.J., Webb A.I., Cheng L., Hill A.F., Wicks I.P., Pang K.C. // *J. Extracell. Vesicles*. 2018. V. 7. № 1. P. 1490145.
119. Lane R.E., Korbie D., Trau M., Hill M.M. // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1660. P. 111–130.
120. Montecalvo A., Shufesky W.J., Stolz D.B., Sullivan M.G., Wang Z., Divito S.J., Papworth G.D., Watkins S.C., Robbins P.D., Larregina A.T., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 5. P. 3081–3090.
121. Sobo-Vujanovic A., Munich S., Vujanovic N.L. // *Cell. Immunol.* 2014. V. 289. № 1–2. P. 119–127.
122. Östman S., Taube M., Teleme E. // *Immunology*. 2005. V. 116. № 4. P. 464–476.
123. Mokarizadeh A., Delirezh N., Morshedi A., Mosayebi G., Farshid A.-A., Mardani K. // *Immunol. Lett.* 2012. V. 147. № 1–2. P. 47–54.
124. Liu H., Chen L., Liu J., Meng H., Zhang R., Ma L., Wu L., Yu S., Shi F., Li Y., et al. // *Cancer Lett.* 2017. V. 411. P. 182–190.
125. Pavlyukov M.S., Yu H., Bastola S., Minata M., Shender V.O., Lee Y., Zhang S., Wang J., Komarova S., Wang J., et al. // *Cancer Cell*. 2018. V. 34. № 1. P. 119–135.
126. Hu Y., Rao S.-S., Wang Z.-X., Cao J., Tan Y.-J., Luo J., Li H.-M., Zhang W.-S., Chen C.-Y., Xie H. // *Theranostics*. 2018. V. 8. № 1. P. 169–184.
127. Komaki M., Numata Y., Morioka C., Honda I., Tooi M., Yokoyama N., Ayame H., Iwasaki K., Taki A., Oshima N., et al. // *Stem Cell Res. Ther.* 2017. V. 8. № 1. P. 219.
128. Li X., Xie X., Lian W., Shi R., Han S., Zhang H., Lu L., Li M. // *Exp. Mol. Med.* 2018. V. 50. № 4. P. 29.
129. Liu X., Li Q., Niu X., Hu B., Chen S., Song W., Ding J., Zhang C., Wang Y. // *Int. J. Biol. Sci.* 2017. V. 13. № 2. P. 232–244.
130. Zhang J., Guan J., Niu X., Hu G., Guo S., Li Q., Xie Z., Zhang C., Wang Y. // *J. Transl. Med.* 2015. V. 13. № 1. P. 49.
131. Zhang S., Chu W.C., Lai R.C., Lim S.K., Hui J.H.P., Toh W.S. // *Osteoarthr. Cartil.* 2016. V. 24. № 12. P. 2135–2140.
132. Nakamura Y., Miyaki S., Ishitobi H., Matsuyama S., Nakasa T., Kamei N., Akimoto T., Higashi Y., Ochi M. // *FEBS Lett.* 2015. V. 589. № 11. P. 1257–1265.
133. Cui X., He Z., Liang Z., Chen Z., Wang H., Zhang J. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2017. V. 70. № 4. P. 225–231.
134. Drommelschmidt K., Serdar M., Bendix I., Herz J., Bertling F., Prager S., Keller M., Ludwig A.-K., Duhan V., Radtke S., et al. // *Brain. Behav. Immun.* 2017. V. 60. P. 220–232.
135. Liu W., Wang Y., Gong F., Rong Y., Luo Y., Tang P., Zhou Z., Zhou Z., Xu T., Jiang T., et al. // *J. Neurotrauma*. 2018. P. neu.2018.5835.
136. Zhuang X., Xiang X., Grizzle W., Sun D., Zhang S., Axtell R.C., Ju S., Mu J., Zhang L., Steinman L., et al. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 10. P. 1769–1779.
137. Yang T., Martin P., Fogarty B., Brown A., Schurman K., Phipps R., Yin V.P., Lockman P., Bai S. // *Pharm. Res.* 2015. V. 32. № 6. P. 2003–2014.
138. Wang L., Chen Q., Qi H., Wang C., Wang C., Zhang J., Dong L. // *Cancer Res.* 2016. V. 76. № 22. P. 6631–6642.
139. Fuhrmann G., Serio A., Mazo M., Nair R., Stevens M.M. // *J. Control. Release*. 2015. V. 205. P. 35–44.
140. Wassler M., Jonasson I., Persson R., Fries E. // *Biochem. J.* 2015. V. 247. № 2. P. 407–415.
141. Kamerkar S., Lebleu V.S., Sugimoto H., Yang S., Ruivo C.F., Melo S.A., Lee J.J., Kalluri R. // *Nature*. 2017. V. 546. № 7659. P. 498–503.
142. Cooper J.M., Wiklander P.B.O., Nordin J.Z., Al-Shawi R., Wood M.J., Vithlani M., Schapira A.H.V., Simons J.P., El-Andaloussi S., Alvarez-Erviti L. // *Mov. Disord.* 2014. V. 29. № 12. P. 1476–1485.
143. Kooijmans S.A.A., Stremersch S., Braeckmans K., De Smedt S.C., Hendrix A., Wood M.J.A., Schiffelers R.M., Raemdonck K., Vader P. // *J. Control. Release*. 2013. V. 172. № 1. P. 229–238.
144. Kosaka N., Iguchi H., Yoshioka Y., Takeshita F., Matsuki Y., Ochiya T. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 23. P. 17442–17452.
145. Ohno S.I., Takanashi M., Sudo K., Ueda S., Ishikawa A., Matsuyama N., Fujita K., Mizutani T., Ohgi T., Ochiya T., et al. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. № 1. P. 185–191.
146. Shen B., Wu N., Yang M., Gould S.J. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 16. P. 14383–14395.
147. Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *Gene*. 2006. V. 366. № 1. P. 97–103.
148. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodenev V.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 39. P. 9690–9695.