

ПЕПТИДНЫЕ НОСИТЕЛИ КАК СРЕДСТВА ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МЕХАНИЗМЫ И ПОТЕНЦИАЛ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Обзор

© 2023 Е.Д. Тимотиевич*, И.П. Шиловский, М.Р. Хаитов

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России,
115522 Москва, Россия; электронная почта: ed0594@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.03.2023

После доработки 13.09.2023

Принята к публикации 15.09.2023

В настоящее время разрабатывается значительное количество лекарственных и профилактических средств, содержащих терапевтические нуклеиновые кислоты, для лечения онкологических, воспалительных, инфекционных заболеваний, а также заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ. Растёт число одобренных к использованию подобных препаратов, что демонстрирует перспективность генной терапии. Свой биологический эффект терапевтические нуклеиновые кислоты реализуют в цитоплазме клетки, при этом плазматическая мембрана является основным препятствием для их внутриклеточной доставки. Поэтому при разработке подобных препаратов зачастую используют специально созданные носители. Оптимальный носитель должен не только обеспечивать интернализацию нуклеиновых кислот, но и быть малотоксичным, стабильным, а также несложным и незатратным в производстве. Всем этим требованиям соответствуют так называемые проникающие пептиды (СРР), которые зарекомендовали себя как эффективные и малотоксичные носители нуклеиновых кислот. СРР представляют собой основные пептиды с положительным зарядом при физиологическом значении pH, которые способны формировать наноструктуры с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами. Многочисленные доклинические исследования, в которых СРР использовали в роли носителя, показали многообещающие результаты, что в отдельных случаях обеспечило успешное прохождение клинических испытаний и внедрение препарата в медицинскую практику. В данном обзоре мы рассматриваем многообразие терапевтических нуклеиновых кислот, а также обобщаем опыт использования СРР для их внутриклеточной доставки. Кроме того, обсуждается классификация и механизмы поглощения СРР клетками, понимание которых позволит ускорить разработку новых генно-терапевтических лекарственных средств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: проникающие пептиды, пептидные средства доставки, средства доставки нуклеиновых кислот, миРНК.

DOI: 10.31857/S032097252311012X, **EDN:** MNWBMS

ВВЕДЕНИЕ

За последние два десятилетия существенно выросло количество разработок новых лекарственных средств, в составе которых в качестве фармацевтических субстанций используются нуклеиновые кислоты. Среди терапевтических

нуклеиновых кислот широкое распространение в медицине получают РНК- и ДНК-вакцины [1]. Также создаются олигонуклеотидные препараты, в состав которых входят антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), аптамеры, молекулы малых интерферирующих РНК (миРНК) и другие [2].

Принятые сокращения: АСО – антисмысловые олигонуклеотиды; миРНК – малые интерферирующие РНК; CeNA-нуклеотиды – циклогексеновые нуклеиновые кислоты; СРР – проникающие пептиды; DRBD – РНК-связывающий домен; EGS – внешняя направляющая последовательность; HBV – вирус гепатита В человека; LNA-нуклеотиды – замкнутые нуклеиновые кислоты; PIP2 – фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; PNA-нуклеотиды – нуклеотиды, модифицированные с использованием пептидо-нуклеиновых кислот; РМО – фосфородиамидат-морфолиновый олигомер; RISC – сайленсинговый комплекс, индуцируемый молекулами РНК.

* Адресат для корреспонденции.

Несмотря на огромный потенциал, использование нуклеиновых кислот в качестве терапевтических средств сопряжено с рядом сложностей; они подвержены разрушению нуклеазами организма, могут элиминироваться фагоцитарной системой и ферментами печени. Однако главной сложностью остаётся эффективная доставка терапевтических молекул к месту действия [3]. Эта проблема частично решена путём использования различных векторов доставки как вирусной, так и невирусной природы. Известны вирусные векторы на основе лентивирусов и аденовирусов, однако, несмотря на высокую эффективность, вирусные векторы обладают рядом существенных недостатков [4, 5]. Среди невирусных векторов широко распространены наночастицы (в том числе липосомы, полимерные наночастицы) и пептиды [6].

В последние десятилетия активно разрабатывают пептидные носители для доставки различных терапевтических молекул в клетки-мишени. К настоящему моменту изучается возможность применения проникающих пептидов (cell penetrating peptides, CPP) в препаратах для лечения онкологических заболеваний (рак молочной железы, колоректальный рак, рак лёгких и пр.), для чего используют пептиды с собственной противоопухолевой (онколитической) активностью либо способных целенаправленно доставлять противоопухолевый препарат [7–9]. CPP способны доставлять терапевтические молекулы не только в определённые клетки, но и органеллы. Например, пептид на основе ТАТ способен проникать в митохондрии клеток и доставлять в них антиоксидантный белок hMT1A, который уменьшает образование активных форм кислорода и тем самым в экспериментальной модели предотвращает формирование проявлений болезни Паркинсона [10, 11]. Широко исследуется возможность применения CPP в целях ингибирования воспалительных процессов [9]. Известны CPP, направленные против STAT3, ингибирование которого значительно нивелирует воспаление при псориазе. Противовоспалительные препараты на основе CPP часто применяют трансдермально, что является оправданным, т.к. некоторые их модификации хорошо проникают через роговой слой кожных покровов [11, 12]. Ряд исследований описывает применение CPP в офтальмологии, т.к. их удобно использовать в форме глазных капель. Препарат XG-102, имеющий в своём составе пептид ТАТ, используется для уменьшения воспаления глаз после операции по удалению катаракты и успешно прошёл фазу 3

клинических испытаний (NCT02508337). Другие препараты на основе пептидов (KAI, POD, TAT-aFGF-His и TAT-μCL) находятся в стадии разработки [13]. Использование CPP является потенциальным методом улучшения биодоступности инсулина. Альтернативой подкожных инъекций является использование перорального инсулина, однако при таком способе применения он имеет низкую биодоступность. Доставка инсулина с использованием CPP является многообещающим подходом [11, 14]. Обширная область применения CPP — это разработка новых подходов для терапии и профилактики вирусных инфекций. К настоящему времени на основе CPP создают противовирусные препараты, а также вакцины [15] против таких патогенов как: вирус гепатита С, риновирус, коксакивирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус Эбола, грипп типа А, ВИЧ-1, папиллома вирус, герпесвирус, SARS-CoV-2 и др. [16].

В последние десятилетия активно развивается область использования пептидных векторных систем для доставки терапевтических нуклеиновых кислот. К достоинствам CPP, в сравнении с другими векторами, можно отнести биodeградируемость и биосовместимость, относительную простоту в получении, стандартизации и хранении. Кроме того, в отличие от вирусных векторов, они не иммуногенны и не приводят к мутациям [15]. В этом обзоре мы обобщаем последние разработки в области создания и использования векторов на основе пептидов для доставки терапевтических нуклеиновых кислот.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Благодаря своей высокой специфичности, функциональному разнообразию и низкой токсичности терапевтические нуклеиновые кислоты имеют огромные перспективы использования в медицине. Главным образом эти препараты способны специфично подавлять экспрессию целевых генов по различным механизмам: АСО, рибозимы, ДНКзимы, внешние направляющие последовательности (EGS), миРНК и т.д. (табл. 1). В настоящее время для медицинского применения одобрено не менее 15 препаратов, содержащих нуклеиновые кислоты [2], 7 из которых в своём составе содержат невирусные векторы доставки [2, 17].

АСО — это, как правило, одноцепочечные синтетические ДНК-олигонуклеотиды длиной 15–25 н. Их эффекты обусловлены

Таблица 1. Характеристика и молекулярные механизмы технологий специфического подавления генной экспрессии

Тип	Мишень	Характеристика агента	Механизм действия
АСО первого поколения	мРНК	одноцепочечные синтетические ДНК-олигонуклеотиды, состоящие из 15–25 фосфоротиоатных нуклеотидов	данный тип АСО после связывания с мРНК-мишенью способен рекрутировать клеточную РНКазу H, тем самым усиливать деградацию мРНК-мишени, что в итоге увеличивает супрессию гена; недостатки — неспецифический иммунный ответ, токсичность
АСО второго поколения	мРНК	одноцепочечные синтетические ДНК-олигонуклеотиды, состоящие из 15–25 2'МОЕ-нуклеотидов	взаимодействуют с мРНК-мишенью с увеличенной аффинностью, что приводит к подавлению генной экспрессии за счёт стерической блокады процесса трансляции; недостатки — не рекрутирует клеточный фермент РНКазу H, поэтому проявляет более слабый эффект супрессии гена в сравнении с АСО первого поколения
АСО третьего поколения	мРНК	одноцепочечные синтетические ДНК-олигонуклеотиды, состоящие из 15–25 PNA-, FANA-, CeNA-, LNA-нуклеотидов	стерическая блокада процесса трансляции; длительность биологического эффекта достигается за счёт устойчивости к ДНКазам
Аптамеры	белок	одноцепочечные синтетические молекулы ДНК или РНК длиной 56–120 н.	за счёт распознавания структуры с высокой аффинностью связываются с белковой мишенью
Рибозимы	мРНК	каталитически активные одноцепочечные молекулы РНК	рибозимы комплементарно связываются с молекулами мРНК и самостоятельно катализируют её расщепление
ДНКзимы	мРНК	каталитически активные одноцепочечные молекулы ДНК	ДНКзимы комплементарно связываются с молекулами мРНК и в присутствии двухвалентных ионов магния самостоятельно катализируют расщепление мРНК в участке между неспаренным пурином (R) и спаренным пиримидином (Y) гетеродуплекса ДНК/РНК
EGS	мРНК	синтетические одноцепочечные молекулы РНК размером 15–20 н.	EGS комплементарно связываются с молекулой мРНК, после чего расщепляет её посредством клеточного фермента РНКазы Р
ДНК-ловушки	белок (факторы транскрипции)	двухцепочечные ДНК-олигонуклеотиды	ДНК-ловушки имитируют участки промоторов, тем самым конкурируют с естественным геном за транскрипционные факторы
U1-адапторы	пре-мРНК	синтетический олигонуклеотид, состоящий из 30–50 РНК, ДНК или модифицированных нуклеотидов	в ядре клетки U1-адаптор за счёт целевого участка специфически взаимодействует с пре-мРНК-мишенью, а за счёт консервативного U1-домена взаимодействует с рибонуклеопротеиновым комплексом, который обеспечивает разрезание пре-мРНК-мишени в области сайта полиаденилирования; в результате этого пре-мРНК лишается поли-А-хвоста, защищающего её от действия РНКаз и быстро деградирует, что в итоге обеспечивает подавление экспрессии гена в целом
миРНК	мРНК	РНК-дуплексы размером 21–25 п.н.	при помощи комплекса RISC осуществляется специфическое разрезание мРНК гена-мишени в определённых участках

Таблица 1 (продолжение)

Тип	Мишень	Характеристика агента	Механизм действия
мРНК-препараты	—	одноцепочечные полноразмерные мРНК	напрямую вводятся в организм, кодируя целевой белок (например, антигены вакцин)
ДНК-препараты	—	рекомбинантные ДНК—плазмиды	

Примечание. PNA-нуклеотиды — нуклеотиды, модифицированные с использованием пептидо-нуклеиновых кислот; FANA-нуклеотиды — 2'-дезоксигуанозин-2'-фтор-β-D-арабинонуклеиновые кислоты; CeNA-нуклеотиды — циклогексенонуклеиновые кислоты; LNA-нуклеотиды — замкнутые нуклеиновые кислоты; 2'МОЕ-модификация — модифицированные нуклеотиды, содержащие алкил-модификацию в 2'-позиции рибозы.

гибридизацией с мРНК-мишенью по принципу комплементарности, в результате чего стерически затрудняется трансляция белка. Некоторые АСО проектируются таким образом, чтобы при взаимодействии с мРНК-мишенью активировалась РНКазы Н, которая расщепляет целевую мРНК, что позволяет увеличить активность. Разработано несколько поколений АСО.

АСО первого поколения состоят из модифицированных нуклеотидов (фосфоротиоатная модификация), благодаря чему они приобретают устойчивость к воздействию нуклеаз. Данный тип АСО рекрутирует РНКазу Н для деградации мРНК-мишени. Недостатками данного поколения АСО являются возможность запуска нежелательных иммунных реакций, а также способность неспецифически взаимодействовать с клеточными белками, что оказывает токсический эффект.

АСО второго поколения состоят из модифицированных нуклеотидов, содержащих алкил-модификацию в 2'-позиции рибозы (2'-O-methoxyethyl-oligonucleotides или так называемая 2'МОЕ-модификация). Данный тип АСО устойчив к действию нуклеаз, а также взаимодействует с мРНК-мишенью с увеличенной аффинностью. Однако этот тип АСО менее эффективен в сравнении с первым поколением, поскольку не привлекает клеточную РНКазу Н, а подавление генной экспрессии происходит за счёт стерической блокады ферментов трансляции.

Третье поколение АСО состоит из нуклеотидов с иными модификациями нуклеотидов. Например, проектируются АСО на основе пептидо-нуклеиновых кислот (PNA — peptide nucleic acids), 2'-дезоксигуанозин-2'-фтор-β-D-арабинонуклеиновых кислот (FANA — 2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinonucleic acids), «замкнутых» нуклеиновых кислот (LNA — locked nucleic acids), циклогексен-нуклеиновых кислот (CeNA — cyclohexene nucleic acids) и др. [3], ко-

торые практически не подвергаются деградации нуклеазами. Два препарата на основе АСО одобрены для медицинского применения: фомивирсен — на основе АСО первого поколения для лечения цитомегаловирусного ретинита и мипомерсен — на основе АСО второго поколения для лечения гиперхолестеринемии. Множество (более 50) подобных препаратов находится на стадии клинических исследований [18].

Аптамеры представляют собой одноцепочечные синтетические молекулы ДНК или РНК длиной 56–120 н., сходные по структуре с АСО. Аптамеры выступают в роли «ловушек» для белков; они могут с высокой аффинностью связываться целевыми белками, нарушая их функционирование. В отличие от АСО, аптамеры осуществляют свой эффект не посредством комплементарного взаимодействия оснований, а подобно антителам, взаимодействуя с белковой мишенью. Таким образом, они представляют собой привлекательную альтернативу моноклональным антителам, поскольку мало токсичны, неиммуногенны, хорошо проникают в ткани, относительно просты в получении и могут вводиться как внутривенно, так и подкожно [3].

Рибозимы — каталитически активные одноцепочечные молекулы РНК, способствующие специфичному расщеплению мРНК-мишеней. За счёт особой третичной структуры рибозимы формируют две петли, которые связываются с мРНК-мишенью и образуют каталитическое ядро, расщепляющее молекулы мРНК. Рибозимы имеют свои недостатки — они малоустойчивы к РНКазам, и поэтому требуют стабилизации, что увеличивает себестоимость синтеза.

ДНКзимы — это каталитически активные одноцепочечные молекулы ДНК. Как и рибозимы они имеют собственный каталитический центр, способный расщеплять молекулы мРНК без привлечения нуклеаз. ДНКзимы

более стабильны и менее затратны для производства, чем рибозимы, но в сравнении с миРНК обладают большими размерами и сложны в синтезе.

EGS (External guide sequence) — это синтетические одноцепочечные РНК-олигонуклеотиды размером 15–20 н. В цитоплазме клетки EGS связываются с мРНК-мишенью по принципу комплементарности, после чего мРНК разрезается в районе дуплекса посредством клеточного фермента РНКазы Р (RNase P). Благодаря активации этого фермента EGS эффективно подавляют ген-мишень, однако они неустойчивы к действию РНКаз [19].

ДНК-ловушки — это двуцепочечные ДНК-олигонуклеотиды, имитирующие участки промоторов. Благодаря такому сходству они связываются с транскрипционными факторами, тем самым конкурируют с естественным геном, подавляя его активность [20].

U1-адапторы — это синтетические олигонуклеотиды, состоящие из 30–50 н. РНК, ДНК или модифицированных нуклеотидов. Структурно U1-адаптор состоит из двух участков; целевой участок — располагается на 5'-конце U1-адаптора, он проектируется комплементарным 3'-концевому экзону мРНК-мишени, благодаря чему U1-адаптор способен распознавать мРНК-мишень; второй участок представляет собой консервативный U1-домен, который способен гибридизоваться с малой ядерной РНК (мяРНК), которая, в свою очередь, входит в состав рибонуклеопротеинового комплекса, обладающего нуклеазной активностью. Процесс подавления экспрессии посредством U1-адаптора происходит в ядре, а не в цитоплазме. U1-адаптор за счёт таргетного участка специфически взаимодействует с мРНК-предшественником (пре-мРНК), а за счёт консервативного U1-домена взаимодействует с рибонуклеопротеиновым комплексом, который обеспечивает разрезание пре-мРНК-мишени в области сайта полиаденилирования. В результате этого пре-мРНК лишается полиА-хвоста, защищающего её от действия РНКаз, и быстро деградирует, что в итоге обеспечивает подавление экспрессии целевого гена [21].

миРНК — двуцепочечные молекулы РНК размером 21–25 п.н., способные специфично подавлять экспрессию генов по механизму интерференции РНК [22] (рис. 1). Молекулярный механизм интерференции РНК включает два этапа: этап инициации и эффекторный этап [23]. На этапе инициации центральная роль принадлежит ферменту Dicer, который находится в цитоплазме и фрагментирует крупные молекулы двуцепочечной РНК, про-

никшие, например, в результате вирусной инфекции, на короткие дуплексы — миРНК. На эффекторном этапе миРНК соединяются с белковыми факторами, образуя мультисубъединичный комплекс RISC (RNA-induced silencing complex — сайленсинговый комплекс, индуцируемый молекулами РНК). В состав комплекса входит белок AGO, который обеспечивает специфичность взаимодействия с мРНК-мишенью. После связывания с целевой мРНК комплекс RISC осуществляет её первичное разрезание, а в дальнейшую деградацию вовлекаются экзонуклеазы клетки. Введение в клетки искусственных миРНК необходимого размера (в среднем 21 п.н.) с заданной последовательностью позволяет избежать процессинга ферментом Dicer, в результате чего они сразу же включаются в комплекс RISC и осуществляют специфическое подавление экспрессии гена-мишени. В отличие от одноцепочечных рибозимов, EGS и U1-адапторов, двуцепочечные молекулы миРНК более устойчивы к РНКазам, к тому же для увеличения их устойчивости и эффективности разработаны разные способы модификации нуклеотидов [24]. На сегодняшний день было инициировано более 30 клинических испытаний препаратов на основе миРНК. По данным на 2022 год, 6 препаратов на основе миРНК против вируса гепатита В (HBV) проходят клинические испытания: ARC-520, ARB-1467, AB-729, RG-6346, VIR-2218 и JNJ-3989 [25]. Недавно было зарегистрировано первое лекарственное средство — Inclesiran (разработчик Alnylam Pharmaceuticals, приобретена лицензия компанией «Novartis») для лечения пациентов с атеросклеротическим сердечно-сосудистым заболеванием и гиперхолестеринемией [26]. Позднее FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) одобрило ещё 3 препарата на основе миРНК (patisiran, givosiran и lumasiran) [27], а в РФ был зарегистрирован препарат МИР 19 для лечения COVID-19 [17, 28].

Препараты на основе мРНК. Основным классом препаратов, содержащих молекулы мРНК, являются вакцины [29]. Преимущество мРНК заключается в способности одной такой молекулы экспрессировать несколько целевых белков. К ограничениям мРНК-препаратов относят низкую стабильность и иммуногенность (т.к. часто мРНК содержат иммуностимулирующие последовательности). К тому же, в отличие от относительно небольших молекул миРНК и АСО, доставка крупных мРНК является более сложной задачей [3].

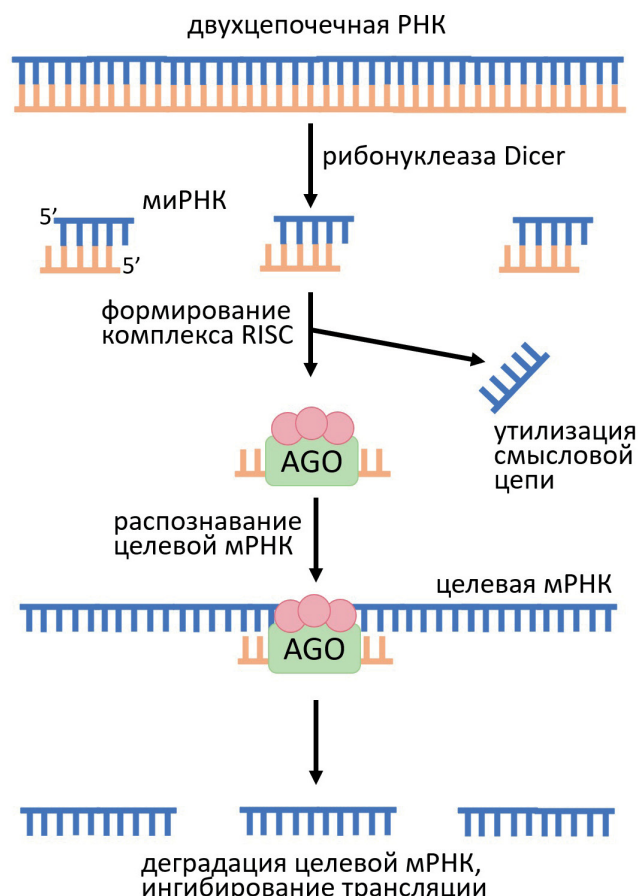


Рис. 1. Схема механизма РНК-интерференции. Молекулярный механизм интерференции РНК включает два этапа: этап инициации (I) и эффекторный этап (II). На этапе I дцРНК расщепляется ферментом Dicer с образованием миРНК. На этапе II миРНК связываются с нуклеазным комплексом RISC. Хеликаза, присутствующая в комплексе, расплетает молекулу миРНК, при этом анти-смысловая цепь остаётся в комплексе. Она направляет комплекс к родственной мРНК, что обеспечивает специфичность взаимодействия с мРНК-мишенью и приводит к её расщеплению

Тем не менее на основе этой технологии создано более 60 препаратов, включая мРНК-вакцины для профилактики COVID-19 от компаний «Pfizer-BioNTech» и «Moderna» [3, 30].

ДНК-препараты представляют собой плазмиды, несущие необходимый генетический материал. Такие плазмидные ДНК-препараты напрямую вводятся в организм, где экспрессируют целевой белок (антиген) [3]. Активно разрабатывались ДНК-вакцины, кодирующие белок-антиген. Однако они демонстрируют низкую эффективность, что побуждает множество научных коллективов по всему миру работать над оптимизацией состава и увеличением их иммуногенности. В настоящее время наиболее перспективным генотерапевтическим подходом для доставки ДНК является использование вирусных векторов. Этот подход реа-

лизован при создании таких препаратов как: Imlygic® (talimogene laherparepvec) на основе вируса простого герпеса для терапии меланом, Luxturna® (voretigene neparvovec) на основе аденоассоциированного вируса для лечения ретиальной дистрофии и Zolgensma® (onasemnogene aberparvovec) на основе аденоассоциированного вируса для терапии спинальной мышечной атрофии и других [31].

Из вышеописанных технологий самой перспективной с точки зрения эффективности и экономической целесообразности является технология РНК-интерференции. Сразу после открытия данного явления и выяснения молекулярного механизма начаты попытки его внедрения в медицинскую практику. Как уже упоминалось выше, внедрению технологии РНК-интерференции препятствует низкая стабильность молекул миРНК в сыворотке крови и отсутствие высокоэффективного и безопасного агента для их адресной доставки в цитоплазму клеток-мишеней. В настоящий момент ведутся исследования по созданию невирусных средств доставки на основе катионных липосом, пептидов и полимеров, а также создаются новые модификации молекул нуклеиновых кислот, устойчивых к действию РНКаз. Все эти разработки в скором времени увеличат возможности использования нуклеиновых кислот в терапевтических целях.

НЕВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Среди невирусных векторов можно выделить липосомы, экзосомы, наночастицы различной природы, катионные полимеры, пептиды и др. [4].

Липосомы — это один из наиболее часто используемых векторов для доставки нуклеиновых кислот. Они, как правило, состоят из катионных и/или амфифильных липидов и холестерина. Их «популярность» объясняется относительной простотой формирования комплекса с нуклеиновыми кислотами (часто за счёт электростатического взаимодействия), высокой эффективностью доставки в целевые клетки, а также тем фактом, что поверхность липосомы можно функционализировать различными лигандами для увеличения тропности к целевым клеткам и тканям. Однако липосомы не лишены таких недостатков, как низкая стабильность (из-за возможности седиментации частиц), высокая токсичность, а также необходимость в дополнительных методах контроля качества при производстве.

В настоящее время зарегистрировано не менее трёх РНК-препаратов на основе липосом, включая Patisiran компании «Alnylam», BNT162b2 компании «Pfizer» и мРНК-1273 компании «Moderna» [6].

Экзосомы представляют собой природные наночастицы (везикулы), инкапсулированные липидным бислоем, которые образуются в результате отпочкования от эукариотических клеток. Считается, что экзосомы осуществляют межклеточную коммуникацию путём транспорта макромолекул (нуклеиновых кислот, белков и липидов), по этой причине они представляют интерес с точки зрения доставки терапевтических олигонуклеотидов. Они, как правило, менее токсичны, в сравнении с липосомами, и способны проходить через биологические барьеры, например ГЭБ. Однако экзосомы менее эффективно (в сравнении с липосомами) связываются с транспортируемыми нуклеиновыми кислотами. Тем не менее несколько препаратов на их основе (производства компаний «Codiak Biosciences» и «Evov Therapeutics») находятся на стадии доклинических исследований [32].

Наночастицы различного рода также используют для доставки нуклеиновых кислот. Например, гибридные наночастицы, состоящие из различных материалов (липиды, полимеры и пептиды), объединяя преимущества каждого компонента [4]. Описаны также векторы на основе наночастиц золота [4], диоксида кремния и пр. материалов [6].

Векторы на основе полимеров имеют ряд преимуществ в сравнении с липосомами. В частности, они менее иммуногенны и легко поддаются модификации, за счёт чего можно формировать их физико-химические свойства (заряд, стабильность и молекулярную массу) и тем самым регулировать растворимость, тропность к тканям и фармакокинетику. Одним из первых полимеров для доставки нуклеиновых кислот начал использоваться полиэтиленмин и его производные. Однако широкое применение этих соединений ограничено их токсичностью [33, 34]. Другой полимер — PLGA (поли-(D,L-лактид-ко-гликолид) — нетоксичен и одобрен для использования в медицине. Однако ввиду отсутствия положительного заряда он электростатически не взаимодействует с нуклеиновыми кислотами. Тем не менее ведутся работы по созданию его производных, адаптированных для доставки терапевтических нуклеиновых кислот [34]. Дендритные (разветвлённые) полимеры (например, поли(амидоамин) дендритные полимеры (ПАМАМ-полимеры)) характеризуются большим коли-

чеством функциональных групп, которые можно модифицировать и задавать необходимые биологические свойства. Однако у таких полимеров есть некоторые недостатки: короткий период полувыведения и токсичность [4].

Основываясь на вышесказанном, можно сделать вывод, что для достижения терапевтического эффекта системы доставки должны быть нетоксичными, стабильными в биологических средах, успешно связываться нуклеиновыми кислотами и проникать в клетки-мишени. Кроме того, при внедрении в широкую медицинскую практику важными аспектами становятся относительная простота получения и контроля качества, а также возможность масштабирования производства. Большинству этих требований отвечают векторы для доставки терапевтических нуклеиновых кислот на основе СРР.

СТРУКТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ ТРАНСПОРТНЫХ ПЕПТИДОВ

СРР обычно имеют размер 5–30 а.о., при этом в их составе присутствует значительное количество основных аминокислот (аргинин и лизин), которые обеспечивают позитивный заряд молекулы в водных растворах при физиологическом значении pH. Зачастую СРР имеют амфипатичную структуру, т.е. одна часть пептида обладает гидрофобными свойствами, а другая — гидрофильными. СРР способны не только самостоятельно проникать внутрь клетки, но и транспортировать в цитоплазму различные терапевтические агенты [35, 36], включая нуклеиновые кислоты [24].

История исследований СРР началась с открытия белка ВИЧ ТАТ, который способен проникать и транспортировать различные соединения в клетки млекопитающих. На сегодняшний день база данных CPPsite 2.0 (<http://crdd.osdd.net/raghava/cppsite/>) описывает более 1700 уникальных пептидов с транспортной активностью. Кроме того, описанию свойств и характеристик СРР посвящён ряд современных обзоров [37–39].

Существует несколько классификаций СРР. Согласно классификации, учитывающей размер и физико-химические свойства, СРР подразделяют на первичные амфипатические, вторичные амфипатические и неамфипатические пептиды.

Первичные амфипатические пептиды обычно содержат более 20 а.о. и имеют в своей структуре гидрофильные и гидрофобные аминокислоты. В эту группу входят MPG, пенетратин, CADY, pVes и другие пептиды [40].

Вторичные амфипатические пептиды обычно размером менее 20 а.о. и имеют вторичную структуру в форме α -спирали или β -слоя. Вторичные α -спиральные СРР, как правило, имеют гидрофобный участок на одном из концов, тогда как другой конец пептида может быть гидрофильным (катионный или анионный).

Неамфипатические пептиды представляют собой относительно короткие пептиды (например, HIV-TAT), которые имеют высокое содержание положительно заряженных аминокислот, таких как аргинин или лизин. Исследования показывают, что для эффективного поглощения необходимо не менее восьми положительных зарядов [40].

Катионные дендримерные пептиды, отличающиеся разветвлённой структурой и значительной плотностью положительного заряда за счёт высокого содержания лизина или аргинина, можно выделить в отдельную группу. Такие соединения обладают значительными преимуществами перед линейными пептидами, поскольку благодаря неприродным ε -амидным связям более устойчивы к протеолизу, а наличие большого количества концевых заряженных групп обеспечивает эффективное связывание с нуклеиновыми кислотами. Кроме того, дендримерные СРР также обладают гораздо меньшей цитотоксичностью, чем линейные, что имеет большое значение для их применения в медицине.

Таким образом, ввиду разнообразия структур и физико-химических свойств пептидные носители представляют собой перспективный класс соединений для внутриклеточной доставки терапевтических нуклеиновых кислот. Кроме того, такое разнообразие структур позволяет пептидам задействовать различные молекулярные механизмы для проникновения внутрь клетки-мишени.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ СРР

В настоящее время для изучения механизмов интернализации СРР используется множество различных методов, которые описаны в обзоре Holm et al. [41]. В частности, используют химические вещества — ингибиторы определённых путей эндоцитоза; способность (или неспособность) пептида проникать в эукариотические клетки в присутствии таких ингибиторов позволяет судить о механизмах его проникновения. Также СРР конъюгируют с флюоресцентными метками, что даёт возможность методом конфокальной микроскопии

идентифицировать компартменты клеток, в которых накапливаются СРР, а также оценить кинетику их накопления в клетке, что в итоге позволяет выявлять молекулярные механизмы интернализации.

Согласно современным представлениям [37, 40], выделяют несколько механизмов проникновения СРР в клетки: энергонезависимый (прямое проникновение) и энергозависимый (различные виды эндоцитоза).

Энергонезависимое прямое проникновение СРР. Энергонезависимое прямое проникновение включает два этапа: 1) взаимодействие СРР с мембраной клетки; 2) проникновение в цитоплазму путём образования пор, адаптивной транслокации или образования инвертированных мицелл (рис. 2, а). Такой механизм характерен для СРР, богатых аргинином и лизином [42], наличие которых обеспечивает положительный заряд, что позволяет пептиду электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными протеогликанами или гликозаминогликанами клеточной стенки и тем самым накапливаться на поверхности мембраны. При достижении предельной концентрации пептида происходит дестабилизация структуры липидов в бислое мембраны, в результате чего пептид проникает в цитоплазму через сформированные поры (рис. 2, б). Ввиду того, что в мембране образуются поры на относительно короткие промежутки времени, это позволяет пептиду проникать внутрь клетки, не приводя к её лизису и гибели. Однако формирование пор в клеточной мембране при высоких концентрациях СРР приводит к токсическим эффектам.

Существует несколько молекулярных моделей формирования пор.

Модель «бочка» (barrel-stave model) — модель формирования пор (рис. 2, б), описывающая проникновение амфипатических α -спиральных пептидов. После взаимодействия с клеточной мембраной пептиды образуют кластеры, в центре которых образуются каналы. Поры образованы обращёнными внутрь гидрофильными поверхностями и взаимодействием обращённых наружу гидрофобных остатков с липидной мембраной.

Тороидальная модель (toroidal model) формирования пор применима к пептидам, способным образовывать α -спирали при контакте с клеточными мембранами. Согласно этой модели, взаимодействие между положительными боковыми цепями пептида и фосфатными группами мембраны клетки приводит к накоплению пептида на внешнем её слое. Затем пептиды вызывают изгиб липидного монослоя

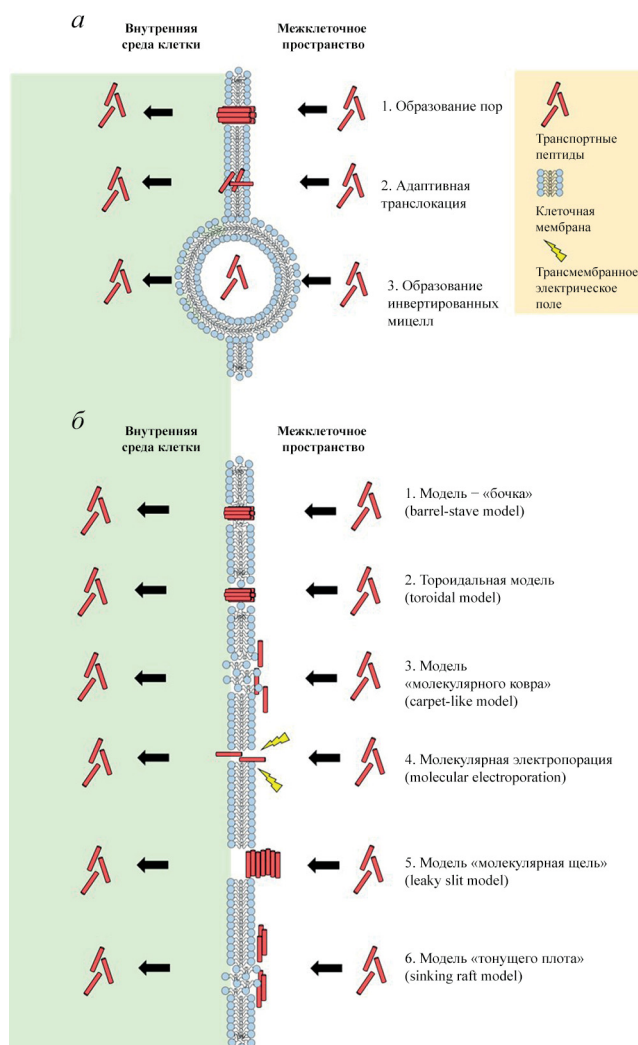


Рис. 2. Энергонезависимые механизмы проникновения СРР через клеточную мембрану. *а* – Пути энергонезависимого проникновения положительно заряженных СРР позволяют пептиду электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженной мембраной клетки с последующим проникновением путём: образования пор (1); адаптивной транслокации (2), при которой СРР как бы «протискиваются» через фосфолипиды клеточной мембраны; образования инвертированных мицелл (3), сопряжённого с инвагинацией мембраны под воздействием положительно заряженных пептидов, и захватыванием их из внеклеточной среды внутрь клетки. *б* – Механизмы молекулярных моделей формирования пор: модель «бочка» (1) предполагает образование пептидами кластеров, в центре которых образуются каналы, через которые СРР проникают в цитозоль; торондальная модель (2) основана на взаимодействии между положительными цепями пептида и фосфатными группами мембраны клетки, что приводит к изгибанию липидного монослоя внутрь с образованием гидрофильной щели в мембране и проникновению СРР внутрь клетки; модель «молекулярного ковра» (3) предполагает накопление пептидов на поверхности клетки, которые образуют слой наподобие «ковра», с последующей перегруппировкой отрицательных зарядов фосфолипидов мембраны в результате их взаимодействия с катионными группами СРР, что вызывает снижение локального поверхностного натяжения и способствует интеркаляции СРР внутрь мембраны клетки; молекулярная электропорация (4) СРР внутрь клетки возможна за счёт связывания сильно заряженного пептида с мембраной, образования локального электрического поля и разрыва клеточной мембраны; в модели «молекулярной щели» (5) пептиды ориентируются перпендикулярно мембране и агрегируют между собой боковыми поверхностями, образуя «ленту», которая проникает в клетку через «щель» в фосфолипидах клеточной мембраны; модель «тонущего плотa» (6) описывает процесс, при котором пептиды образуют агрегаты, которые диффундируют через мембрану параллельно фосфолипидному бислою

внутрь, образуя гидрофильную щель в мембране, в которой находятся фосфолипидные головки и пептиды.

В модели «молекулярного ковра» (carpet-like model) положительно заряженные пептиды накапливаются на поверхности мембраны

клетки, образуя слой наподобие «ковра» с последующим искажением в результате взаимодействия отрицательно заряженных липидов наружного слоя мембраны и катионных групп СРР. Это вызывает перегруппировку отрицательных зарядов фосфолипидов и истон-

чение мембраны. Агрегация СРР на поверхности мембраны вызывает снижение локального поверхностного натяжения и способствует интеркаляции СРР внутрь мембраны клетки. После интернализации пептида в цитоплазму мембрана вновь восстанавливается [43].

Молекулярная электропорация (molecular electroporation) – другой предполагаемый механизм порообразования, при котором бислоиная структура мембраны локально разрывается трансмембранным электрическим полем, образованным за счёт связывания заряженного пептида с мембраной (рис. 2, б).

Модель «молекулярная щель» (leaky slit). В данной модели пептиды ориентируются перпендикулярно мембране и агрегируют между собой боковыми поверхностями, образуя так называемую ленту. Затем другая сторона мембраны загибается сама на себя, образуя щель [40] (рис. 2, б).

Модель «тонущего плоты» (sinking raft model) – альтернативная модель, описывающая процесс, при котором пептиды образуют агрегаты, способные диффундировать через мембрану (рис. 2, б).

При адаптивной транслокации положительно заряженные СРР образуют переходные ионные комплексы с отрицательно заряженными компонентами мембраны (рис. 2, а). Сформированные комплексы обладают слабым положительным зарядом (т.к. происходит частичная нейтрализация заряда СРР), что позволяет пептиду адаптивно диффундировать через клеточную мембрану, при этом «движущей силой» диффузии служит мембранный потенциал [44].

Образование инвертированных мицелл. Прямое проникновение путём образования инвертированных мицелл первоначально было описано для пенетратина (рис. 2, а). Первым этапом процесса интернализации является формирование электростатического взаимодействия между пептидом и клеточной мембраной, что влияет на молекулярную организацию липидов и может приводить к изменению кривизны мембраны. Такие искривления или инвагинации мембраны могут привести к образованию инвертированных мицелл, которые захватывают пептид из внеклеточной среды. Гидрофильная среда внутри инвертированной мицеллы способствует накоплению пептида, после чего внутри клетки мицелла дестабилизируется и пептид высвобождается в цитозоль [40].

Энергозависимое проникновение СРР. Виды эндоцитоза. К энергозависимым способам проникновения пептидов в клетки относят

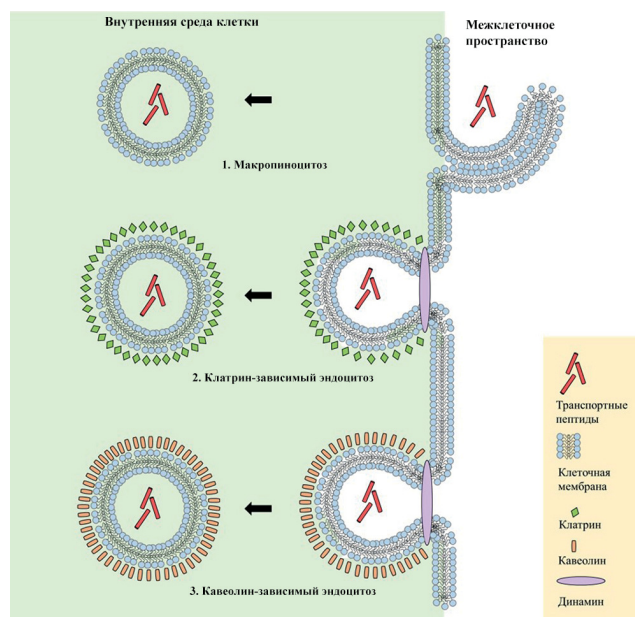


Рис. 3. Энергозависимые механизмы проникновения СРР через клеточную мембрану за счёт гидролиза АТФ: в ходе рецептор-независимого макропиноцитоза формируются выпячивания в мембране клетки, которые сливаются с плазматической мембраной, образуя макропиносомы, в которых инкапсулированный СРР взаимодействуют с протеогликанами на поверхности мембраны (1); при клатрин-зависимом эндоцитозе происходит полимеризация клатрина и актинового цитоскелета клетки, что приводит к инвагинации мембраны и формированию везикул с СРР, отделение которых от донорской мембраны катализируется динамином, затем происходит высвобождение везикулы в цитоплазму клетки и деполимеризация клатрина (2); кавеолин-зависимый эндоцитоз во многом сходен с клатрин-зависимым, однако образование везикулы обеспечивается белками Cav-1, -2 и -3 и кавинами (3)

различные виды эндоцитоза (рис. 3). Эндоцитоз – это процесс транспорта веществ в клетку, в котором задействованы различные её органеллы (мембрана, микротрубочки и пр.). Эндоцитоз подразделяют на 2 категории: фагоцитоз и пиноцитоз. Фагоцитоз используют специализированные виды клеток (макрофаги, дендритные клетки и пр.) для поглощения из внеклеточного пространства крупных макромолекул и частиц. Пиноцитоз используют все виды клеток для поглощения жидкостей из внеклеточного пространства. Он подразделяется на: макропиноцитоз, клатрин-, кавеолин-опосредованный эндоцитоз и клатрин/кавеолин-независимый эндоцитоз с привлечением таких рецепторов, как нейропилин-1 и протеогликанов гепаран сульфата [40, 45]. Вышеуказанные виды транспорта требуют затрат энергии, обычно получаемой за счёт гидролиза АТФ.

Макропиноцитоз – это рецептор-независимый вид транспорта, в котором важную роль

играют липидные рафты мембраны и актиновый цитоскелет клетки (рис. 3). Макропиноцитоз обычно индуцируется в ответ на стимуляцию клетки факторами роста (например, CSF-1, EGF и пр.). В ходе макропиноцитоза формируются выпячивания в мембране клетки, которые не «обволакивают» частицы (как в случае фагоцитоза), а сливаются с плазматической мембраной, образуя большие эндоцитарные везикулы, называемые макропиносомами. При макропиноцитозе СРР взаимодействуют с протеогликанами на поверхности мембраны и (после вовлечения Рас-белка и актина) мембрана реорганизуется, образуя макропиносому, в которых инкапсулирован СРР. Показано, что посредством этого механизма внутрь клеток проникают аргинин-богатые пептиды (R8, R9, R12) [40].

Клатрин-зависимый эндоцитоз является наиболее изученным механизмом (рис. 3). Формирование эндосомы происходит в определённых участках мембраны клетки — так называемые «горячие точки» образования везикул, которые обычно представляют собой участки клеточной мембраны, обогащенные фосфатидилинозитол-4,5-дифосфатом (PIP₂). PIP₂, в свою очередь, взаимодействует с адаптерными белками, наиболее важный из них — AP2, который связывается с PIP₂ и рекрутирует каркасные белки плазматической мембраны, что приводит к началу сборки клатрина в икосаэдрические структуры на внутренней стороне мембраны [44]. Далее, при накоплении СРР в «горячих точках» формирования везикул происходит инвагинация мембраны. Считается, что полимеризация клатрина и актинового цитоскелета клетки способствует инвагинации и формированию везикулы размером 100–150 нм в диаметре [46]. Отделение везикул от донорской мембраны катализируется белком динамином. Динамин собирается в плотные олигомеры и сжимает мембрану наверху формирующейся везикулы в тонкую перемычку в виде «песочных часов», а затем полностью отделяет её. Далее происходит высвобожденные везикулы в цитоплазму клетки и деполимеризация клатрина. В итоге формируются так называемые ранние эндосомы, которые созревают до поздних эндосом, характеризующихся низким значением pH. Поздние эндосомы, в свою очередь, транспортируют поглощённое вещество в лизосомы — органеллы с ещё более низким pH и наличием ферментов деградации. Ввиду деградации транспортируемых веществ в лизосомах, клатрин-зависимый эндоцитоз является менее предпочтительным механизмом для доставки терапевтических нуклеино-

вых кислот. Для повышения эффективности транспорта используют вспомогательные соединения, которые инициируют ранний выход транспортируемого вещества из эндосомы в цитоплазму клетки (см. ниже). Экспериментально показано, что многие СРР используют данный механизм для проникновения в клетки, среди них TAT [47], MPG α , R8 [48] и др.

Кавеолин-зависимый эндоцитоз во многом сходен с клатрин-зависимым, однако имеет ряд отличительных особенностей (рис. 3). Кавеолы представляют собой колбовидные инвагинации мембраны клетки диаметром около 50–100 нм, присутствующие на многих типах клеток. Кавеолы формируются в участках мембраны, которые богаты холестерином и сфинголипидами; в этих участках также могут располагаться молекулярные рецепторы. Такие гидрофобные участки мембраны некоторые авторы называют липидными рафтами. Главными молекулярными компонентами кавеол являются белки Cav-1, -2 и -3; из них первые два экспрессируются совместно и представлены на широком спектре клеток. Cav-1 — это главный белок, определяющий форму кавеол, гидрофобные аминокислоты которого встроены в плазматическую мембрану. Вторая группа белков, необходимых для реализации кавеолин-опосредованного эндоцитоза, называется кавинами; они локализуются на внутренней стороне мембраны клетки, обращенной к цитозолю, и необходимы для взаимодействия с цитоскелетом клетки. Показано, что кавин-1, связываясь с кавеолинами, холестерином и фосфатидилсеринем, стабилизирует кривизну мембраны и поддерживает колбовидную форму кавеол. Другими важными молекулярными компонентами кавеол являются актиновый цитоскелет клетки и холестерин, а также динамин, который взаимодействует непосредственно с Cav-1 в основании кавеолы и обеспечивает её отпочковывание с последующим образованием внутриклеточной везикулы [40]. Интернализация кавеол приводит к образованию кавеосом — везикул с гетерогенной морфологией и нейтральным pH внутри, что отличает их от поздних эндосом с низким pH. По всей видимости, транспортируемое содержимое кавеосом не подвергается деградации, как это происходит в лизосомах при клатрин-опосредованном эндоцитозе. Однако каким образом происходит высвобождение транспортируемого вещества в цитоплазму, не известно [40]. Ряд СРР задействуют данный механизм для проникновения в клетки: TAT-пептид, пролин-богатые пептиды [49], TP10 [50] и др.

Клатрин- и кавеолин-независимый эндоцитоз. Ещё одним путём энергозависимого входа СРР в клетки является клатрин- и кавеолин-независимый эндоцитоз. В реализацию этого механизма вовлечены липидные рафты — участки на поверхности мембраны клетки, богатые стеринами и сфинголипидами, размером 40–50 нм. Эти рафты могут содержать не только клатрин и кавеолин, но и другие макромолекулы (например, белки-рецепторы), которые распознают транспортируемые вещества во внешней среде и способствуют их поглощению. Было показано, что ряд СРР проникает в клетки при помощи этого механизма, например, азурин и его фрагменты p18 и p28 [51], транспортан, транспортан-10 [50] и LMWP в комплексе с молекулами мРНК [52]. Примечательно, что ранее для транспортана и транспортана-10 было показано проникновение в клетки посредством кавеолин-зависимого эндоцитоза. По всей видимости, пептиды могут задействовать одновременно несколько путей проникновения в клетку.

В целом механизм проникновения СРР зависит от физико-химических свойств пептида и транспортируемой молекулы, а также от концентрации и структурных особенностей плазматической мембраны. Например, при физиологических условиях и низкой концентрации пептиды проникают в клетки при помощи эндоцитоза, тогда как при высокой концентрации СРР непосредственно взаимодействуют с клеточной мембраной и задействуют энергонезависимые механизмы для попадания в клетки [40].

Выход СРР из эндосомы. После проникновении внутрь клетки при помощи эндоцитоза СРР (и транспортируемые ими терапевтические нуклеиновые кислоты) накапливаются в эндосомах, которые созревают и превращаются в лизосомы, что приводит к деградации содержимого эндосом гидролазами. Следовательно, своевременный выход СРР из эндосомы является необходимым условием эффективной доставки переносимой молекулы в клетку [39].

Разрушение мембраны эндосомы. Выход СРР из эндосом достигается при помощи разных молекулярных механизмов. Один из возможных механизмов — разрушение мембраны эндосомы, что обеспечивается СРР с альфа-спиральной структурой [44]. Позитивно заряженный СРР взаимодействует с негативно заряженными фосфолипидами мембраны, что приводит к образованию в ней пор и высвобождению содержимого в цитозоль [53].

Образование ионных пар. Другим возможным механизмом выхода из эндосом является

образование ионных пар между СРР и отрицательно заряженными липидами мембраны, после чего пептиды диффундируют через мембрану. Это характерно для аргинин-богатых пептидов.

Фузогенные липиды. Выход из эндосомы может быть индуцирован фузогенными липидами (например, DOPE). Такие липиды при низких значениях pH сливаются с мембраной эндосомы, что в итоге дестабилизирует её и приводит к высвобождению содержимого в цитозоль. Показано, что добавление DOPE к комплексу СРР–нуклеиновая кислота значительно увеличивало эффективность проникновения этого комплекса в цитозоль [33]. Эндосомальное ускользание также может быть достигнуто за счёт использования pH-чувствительных полимеров и pH-чувствительных липосом [54].

Модель «протонной губки» описывает выход из эндосом полиплексов, содержащих полиэтиленимин. Данный механизм подразумевает присутствие в эндосоме протон-связывающих молекул (рис. 4). Касаемо СРР, механизм «протонной губки», в частности, использует пептиды, содержащие гистидин. Имидазольная группа гистидина протонируется, а поскольку в эндосоме присутствует протонная помпа, то в эндосому «закачивается» дополнительное количество протонов. Вслед за протонами в эндосому проникают хлор-анионы. В результате осмотическое давление разрушает мембрану эндосомы, а её содержимое оказывается в цитозоли. Выход из эндосомы может быть активирован эндосомолитическими агентами, например хлорохином, который представляет собой слабое основание. Находясь в эндосоме, хлорохин связывает протоны, тем самым препятствует её закислению, а в высокой концентрации хлорохин вызывает набухание и разрушение. Ещё один способ задействовать эффект протонной губки для высвобождения СРР из эндосом — применение протон-связывающих полимеров, например полиэтиленimina. Такие полимеры могут быть присоединены к СРР ковалентно (или использоваться в виде комплекса), что незначительно снижает их способность к интернализации, но облегчает выход из эндосомы, обеспечивая в итоге более эффективную доставку [39].

Модель «зонтика» описывает выход из эндосомы крупных полимерных соединений (рис. 4). Согласно этой гипотезе, полимер-носитель образует комплексы с терапевтическими нуклеиновыми кислотами за счёт электростатических взаимодействий, в результате происходит их уплотнение (конденсация ком-

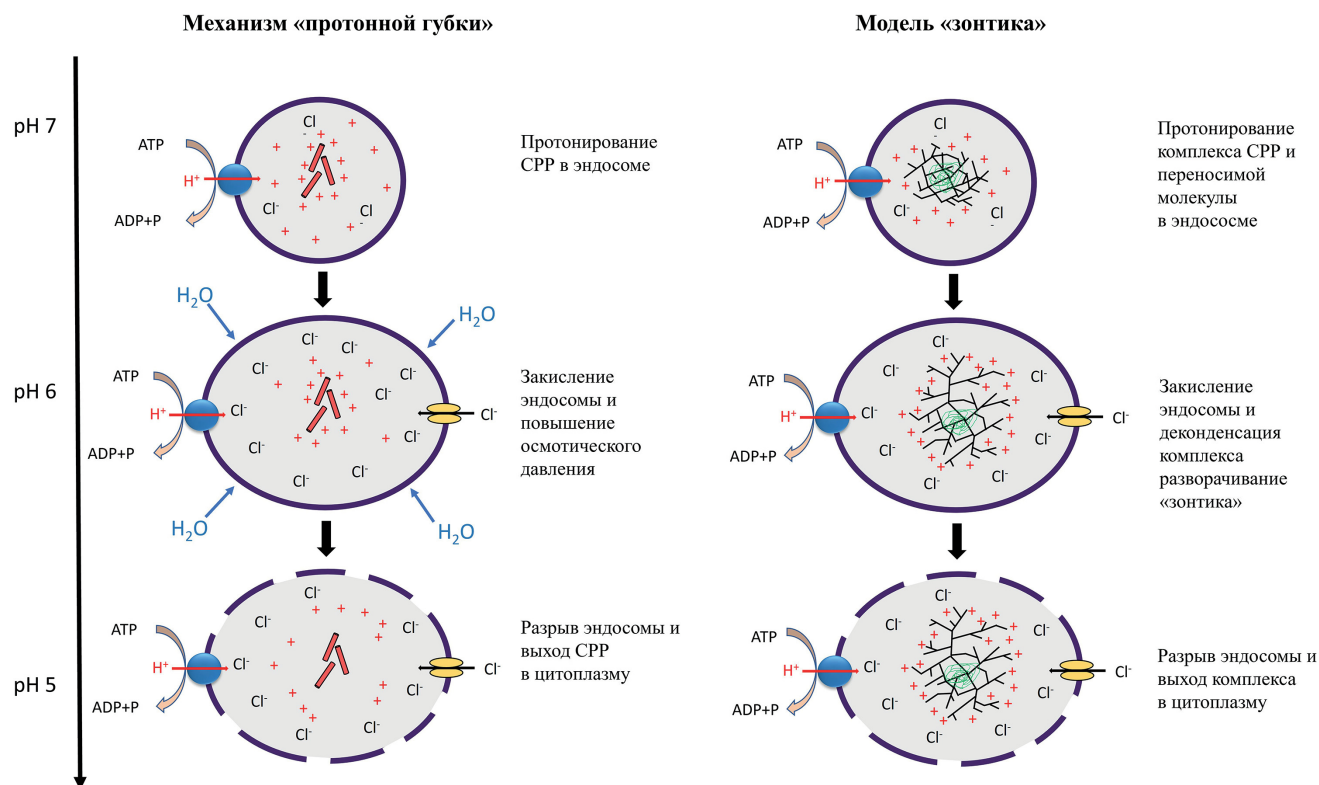


Рис. 4. Механизм выхода CPP из эндосомы

плекса). Находясь в эндосоме, при достижении низких значений рН (рН = 5–6) происходит протонирование аминокислот полимера-носителя, что приводит к его деконденсации и объёмному расширению за счёт электростатического отталкивания соседних одноимённо заряженных аминокислот. Все эти процессы приводят к увеличению объёма эндосомы и последующему разрыву её мембраны, что сопровождается попаданием содержимого в цитозоль. Данный механизм выхода из эндосомы присущ не только крупным полимерным носителям, но и CPP (например, разветвлённым пептидам).

Модель «протонной губки» (рис. 4, слева) подразумевает протонирование аминокислот в составе CPP. Дополнительное количество протонов попадает в эндосому при помощи протонной помпы. Вслед за протонами в эндосому проникают хлор-анионы, в результате чего осмотическое давление разрушает мембрану эндосомы, а её содержимое выходит в цитозоль. Модель «зонтика» (рис. 4, справа) описывает выход из эндосомы крупных полимерных или дендримерных соединений. CPP-носитель образует комплексы с переносимыми молекулами за счёт электростатических взаимодействий, в результате происходит конденсация комплекса. Находясь в эндосоме, при достижении низких значений рН происходит протони-

рование аминокислот носителя, что приводит к его деконденсации и объёмному расширению за счёт электростатического отталкивания соседних одноимённо заряженных аминокислот, увеличению объёма эндосомы и последующему разрыву её мембраны, что сопровождается попаданием содержимого в цитозоль.

Проникновение CPP в ядро. В некоторых случаях терапевтические нуклеиновые кислоты следует доставлять в ядро клетки, для чего требуется преодолеть 2 барьера — клеточную и ядерную мембраны. Некоторые CPP (ТАТ, полиаргинин и др.) способны проникать в ядро клеток [54]. Для увеличения тропности к ядру CPP модифицируют путём конъюгации с определёнными пептидными последовательностями (как правило, содержащими остатки лизина, аргинина и пролина), распознающимися ядерными транспортными белками (импортин-α и импортин-β) [55]. Такая модификация усиливает ядерную локализацию CPP.

Комплекс ядерных пор (КЯП) представляет собой цилиндрические структуры с внутренним диаметром около 30 нм и длиной 50 нм, обеспечивающие транспорт веществ в ядро. Молекулы малого размера (вода, сахара и ионы) проникают через КЯП пассивно. Однако крупные молекулы (мРНК, белки, пептиды и пр.) проходят через КЯП энергозависимым способом с помощью последова-

тельностью ядерной локализации (NLS) [54]. Они представляют собой короткие последовательности из 5–12 а.о., полученные из ядерных белков эукариот и вирусов. СРР могут быть конъюгированы с ними и таким образом нацеливаться на проникновение в ядро. Наиболее известными NLS-пептидами являются: большой Т-антиген SV40 и *Xenopus* из белка нуклеоплазмينا [54], а также 29-членный пептид белка рUL53 цитомегаловируса [56] и др. [57]. Таким образом, разнообразие структур и физико-химических свойств СРР, а также относительная простота их модификации позволяет использовать пептидные векторы для доставки терапевтических нуклеиновых кислот в ядро.

Факторы, влияющие на интернализацию СРР. Во многих экспериментах было показано, что применяемая концентрация СРР влияет на путь интернализации. Считается, что эндоцитоз обычно возникает при низкой концентрации пептида, а прямое проникновение возможно при более высокой концентрации [40]. Напротив, для пенетрации было показано, что прямое проникновение происходит при низких концентрациях. Другим фактором, влияющим на интернализацию, является заряд пептидов, особенно высокий положительный заряд, преимущественно обеспечивающийся наличием остатков аргинина. Амфипатичность – ещё один известный фактор, влияющий на поглощение. Первичные и вторичные амфипатические пептиды могут напрямую проникать через клеточную мембрану в низких концентрациях, в то время как неамфипатические СРР используют эндоцитоз. Температура, при которой проводится эксперимент, также может влиять на механизм интернализации. При низких температурах (4 °С) предпочтительна прямая транслокация, однако при повышении (37 °С) – задействуется эндоцитоз. Переносимые молекулы могут сильно влиять на путь поглощения. Размер присоединяемого соединения влияет на размер всего комплекса, что приводит к механизму поглощения, отличному от такового для свободного СРР. Чем меньше размер, тем больше вероятность, что комплекс интернализуется в клетку прямой транслокацией. Однако при больших размерах комплекса преобладает эндоцитоз [40]. К настоящему моменту накапливаются знания об эффективности доставки СРР на различных линиях клеток [58].

Резюмируя вышесказанное, механизмы интернализации СРР разнообразны и зависят как от химического состава пептида, так и от свойств клеточной мембраны. Молекулярный

механизм того, как структурные изменения в локальных участках мембраны могут вызывать транслокацию пептидов внутрь, ещё предстоит выяснить. Новые знания о взаимодействии пептида и клетки необходимы для разработки эффективных векторных систем доставки терапевтических молекул.

СТРАТЕГИИ ПРИМЕНЕНИЯ СРР

Выделяют две основные стратегии применения СРР для доставки терапевтических молекул (включая нуклеиновые кислоты) в клетки.

Первая – ковалентная стратегия подразумевает конъюгацию СРР с транспортируемым соединением, что происходит при образовании ковалентной химической связи между соединениями. Такая стратегия подходит для транспорта молекул с нейтральным зарядом, например, некоторых белков, пептидов, пептидных нуклеиновых кислот и др. Перспективным направлением в ковалентной стратегии является использование так называемой деградируемой ковалентной связи между СРР и транспортируемой молекулой. Такой конъюгат способен проникать в клетку, после чего распадаться внутри неё и высвобождать терапевтическую молекулу в цитоплазму. Примером служит деградируемый линкер с дисульфидной связью между пептидом ТАТ и нуклеиновыми кислотами [59]. В ряде случаев ковалентная стратегия не оправдана, так как в результате конъюгации СРР и терапевтической молекулы происходит химическая модификация последней, что приводит к уменьшению (или полной утрате) её биологической активности. Кроме того, ковалентная стратегия не подходит для доставки кольцевых плазмидных ДНК ввиду отсутствия у них свободных валентностей для конъюгации с СРР [60].

В соответствии со второй – не ковалентной стратегией – пептид-носитель образует комплекс с транспортируемой молекулой, например, за счёт электростатических или гидрофобных взаимодействий. Данная стратегия хорошо подходит для доставки терапевтических нуклеиновых кислот, т.к. СРР чаще всего обладают позитивным зарядом, а нуклеиновые кислоты – отрицательным.

Применение СРР для доставки нуклеиновых кислот в доклинических исследованиях. Опубликовано множество работ, в которых описаны СРР, доставляющие различные нуклеиновые кислоты в клетки млекопитающих. Подавляющее большинство таких работ описывает эксперименты *in vitro* [43, 61, 62].

Применение СРР для доставки нуклеиновых кислот сопряжено с рядом сложностей, главные из которых — относительно короткий период полувыведения СРР и отсутствие специфичности к тканям и органам. Тем не менее регулярно публикуются работы, в которых СРР применяют для доставки терапевтических нуклеиновых кислот лабораторным животным с индуцированной патологией (воспалением, опухолями или инфекцией). В данном разделе обобщён опыт применения СРР в экспериментах *in vivo* (табл. 2).

Укороченная версия амфипатического пептидного носителя MPG (MPG-8) была использована для доставки молекул миРНК против мРНК гена, кодирующего циклин В1. Этот регуляторный белок участвует в митозе и демонстрирует повышенную экспрессию при различных формах рака. Показано, что MPG-8 образует наноразмерные комплексы с молекулами миРНК. Внутривенное введение этих комплексов мышам с ксенотрансплантированными опухолями приводило к значительному уменьшению их размера [63].

В исследовании Michiue et al. [64] для доставки молекул миРНК авторы использовали производное пептида ТАТ (пептид ТАТ–DRBD), который представлял собой пептид ТАТ, слитый с РНК-связывающим доменом — DRBD. Такой гибридный пептид образовывал комплекс с миРНК за счёт домена DRBD и проникал внутрь клеток за счёт ТАТ-фрагмента, при этом транспортируя связанную с ним миРНК. Такой подход был апробирован в эксперименте *in vivo* на модели внутримозговой глиобластомы у мышей. Пептид ТАТ–DRBD доставлял в клетки опухоли молекулы миРНК против генов *Egfr* и *Akt2*, которые вовлечены в онкогенез. В свою очередь, инактивация этих генов молекулами миРНК приводила к апоптозу опухолевых клеток, что значительно увеличивало выживаемость модельных мышей [64].

Был создан конъюгат пептида-носителя ТАТ и пептидной нуклеиновой кислоты (ТАТ–PNA-DR), которая направлена против генома вируса гепатита В. Конъюгат ингибировал репликацию HBV в клетках HepG2.2.15, а также на модели HBV у мышей происходило снижение вирусной нагрузки на 80%. Примечательно, что ТАТ–PNA-DR показал низкую токсичность и иммуногенность, вместе с тем высокую стабильность в сыворотке [65].

Для доставки одноцепочечной ДНК — молекул фосфородиамидат-морфолинового олигомера (РМО, phosphorodiamidate morpholino oligomer), направленных против генома герпес-вируса человека типа 1 (HSV-1) — также исполь-

зован пептидный носитель. Применение комплекса РМО–пептид снижало репликацию вируса на 70–98% *in vitro*. Местное нанесение 10 мкг РМО–пептид на роговицу глаз мышей, инфицированных вирусом герпеса, снижало частоту заболевания на 37–50% [66].

Пептиды также применяются для доставки ДНК-вакцин. В частности, иммунизация мышей комплексом пептида MPG и плазмидных ДНК, несущих антигены вируса гепатита С, приводила к появлению специфических антител классов IgG1 и IgG2a [67].

В исследовании использовали пептид (R-X-R)4XB (X представляет собой 6-аминогексановую кислоту, а В — β-аланин). Его конъюгаты с молекулами РМО, направленными против гена, кодирующего дистрофин, были успешно применены в модели мышечной дистрофии Дюшенна у мышей и собак (мышечная дистрофия золотистых ретриверов) [68].

Так как роговица глаза является одной из наиболее часто трансплантируемых тканей, то доклинические испытания безопасности и эффективности препарата AVI-5126 проводили на модели трансплантации роговиц крыс. Исследуемый препарат представляет собой пептид (R-X-R)4, конъюгированный с РМО, подавляющими экспрессию фактора транскрипции с-Мус, ключевого фактора отторжения трансплантата. По результатам исследования выявлено, что отторжение трансплантата происходило значительно хуже после хранения донорской роговицы перед трансплантацией в AVI-5126 и последующего местного нанесения AVI-5126 после трансплантации [69].

Пептид T9(dR), являющийся производным транспорта, был использован для доставки миРНК, направленных против гена нуклеопротеина вируса гриппа. Данный комплекс снижал репликацию вируса как *in vitro*, так и в модели у мышей, предотвращая случаи летального исхода [70].

Пептид R007, богатый аргинином, был конъюгирован с РМО, направленной против генома вируса Коксаки В3. Для данного конъюгата показан противовирусный эффект в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* [71]. Другой богатый аргинином пептид, R9F2, конъюгированный с молекулами РМО, направленными против генома вируса Эбола, обеспечивал полную защиту мышей после введения летальной дозы вируса [72].

Нашим коллективом авторов выпущен ряд публикаций, посвящённых катионному дендримерному пептиду LTP, богатому остатками аргинина и лизина, за счёт чего он имеет высокий положительный заряд и способен

Таблица 2. Применение СРР для доставки нуклеиновых кислот в экспериментах *in vivo*

Пептид	Последовательность	Транспортируемая нуклеиновая кислота	Модель	Биологическая активность	Ссылка
MPG-8	AFLGWLGAWGTMGWSPKKKRK	миРНК	ксенотрансплантированные опухоли у мышей	после внутриопухолевого введения 1 мкг комплекса (по содержанию миРНК) происходило замедление роста опухоли в сравнении с отрицательным контролем на 75%; введение 5 мкг комплекса (по содержанию миРНК) предотвращало рост опухоли	[63]
TAT-DRBD	НД	миРНК	модели внутримозговой глиобластомы у мышей	подавление экспрессии гена <i>Egfr</i> привело к увеличению медианы выживаемости мышей с 14 до 19 дней; одновременное подавление экспрессии генов <i>Egfr</i> и <i>Akt2</i> значительно увеличивало медиану выживаемости мышей с 14 до 31,5 дней	[64]
TAT	GRKKRRQRRRPPGC-MPA-GCAGAGGTGAA	пептидная нуклеиновая кислота	модель острого гепатита В (HBV) у мышей	приспособило снижение концентрации антигенов HBV в сыворотке мышей на 73% и 66%	[65]
(RXR)4XB	(RXR)4XB (где R обозначает аргинин, X обозначает 6-аминогексановую кислоту и B обозначает β-аланин)	РМО	модель HSV-1 у мышей	местное нанесение 10 мкг конъюгата РМО–пептид на роговицу глаз мышей, инфицированных вирусом герпеса, снизило частоту заболеваний на 37–50%	[66]
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	молекулы ДНК, кодирующие антигены HCV (вирус гепатита С)	мыши линии BALB/c	уровни антител IgG1 и IgG2a, специфичных к антигенам HCV, значительно возрастали через 3 недели после курса иммунизаций	[67]
(R-X-R)4XB	(R-X-R)4XB, в составе которого X представляет собой 6-аминогексановую кислоту, а B - β-аланин	РМО	модель мышечной дистрофии Дюшенна у собак и мышей	конъюгат (R-X-R)4XB–РМО корректировал мутантные транскрипты дистрофина в миобластах как мышей, так и собак с дистрофией Дюшенна; при концентрациях 300 нМ наблюдались высокие уровни скорректированного транскрипта	[68]
(R-X-R)4	(R-X-R)4, в составе которого X представляет собой 6-аминогексановую кислоту	РМО	модель трансплантации роговиц крыс ACI (August Copenhagen Irish)	хранение донорской роговицы перед трансплантацией в AVI-5126, а также последующее местное нанесение AVI-5126 после трансплантации улучшает приживаемость трансплантата до 40%	[69]

Таблица 2 (продолжение)

Пептид	Последовательность	Транспортируемая нуклеиновая кислота	Модель	Биологическая активность	Ссылка
T9(dR)	GWTLNSAGYLLGKINLKALAAALA KKILdRdRdRdRdRdRdRdRdR, где dR – D-arginine	миРНК	модель инфекции вирусом гриппа H1N1 у мышей	происходило восстановление массы тела мышей, а также их полное выздоровление на 14-й день после заражения	[70]
P007	CH ₃ CONH-(R-аминоксановая кислота- R)4-аминоксановая кислота-βAla	PMO	модель инфекции вирусом Коксаки у мышей линии A/J	введение комплекса P007–PMO в дозе 200 мкг на мышью уменьшало: потерю веса на 5%, количество инфекционных вирусных частиц в тканях миокарда – в 2 раза, повреждение тканей сердца – в 4 раза	[71]
R9F2	NH ₂ -RRRRRRRRRFFFC-CONH ₂	PMO	летальная модель инфекции вирусом Эбола на мышах линии C57Bl/6	доза 500 мкг на мышью комплекса R9F2–PMO, введенная однократно через 24 часа после введения летальной дозы вируса, полностью защищает от гибели	[72]
LTP	R ₈ K ₄ K ₂ KAC-NH ₂	миРНК	модель аллергического ринита у мышей; модель нейтрофильной бронхиальной астмы у мышей	модель AP: курс из 7 интраназальных аппликаций LTP–миРНК в дозе 10 мкг на мышью в сутки приводил к снижению: уровней специфических антител классов IgE и IgG1 на 50% и 25%, назальной гиперреактивности – в 2 раза, инфильтрации эозинофилов в слизистую оболочку носа – на 30%; введение нБА: 3-кратное ингаляционное введение комплекса миРНК–LTP приводило к подавлению экспрессии целевого гена в клетках БАЛ в 2 раза и к уменьшению инфильтрации лёгких нейтрофилами – в 3 раза	[74–76]
KK-46	R8K4W4T4P4E4V4K2H2KFC	плазмидная ДНК, миРНК	модель инфекции SARS-CoV-2 у сирийских хомячков	6-дневный курс siR-7-EM/KK-46 дозозависимо снижал титр вируса и воспаление в лёгких; на второй день количество вирусных копий в лёгочной ткани мышей, получавших комплекс в различных концентрациях, уменьшилось в 1,5–3 раза	[28]

Примечание. БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; НД – нет данных.

связывать отрицательно заряженные молекулы нуклеиновых кислот [73]. С помощью этого пептида была осуществлена доставка молекул миРНК против генов, кодирующих провоспалительные цитокины IL-4 и IL-13, в клетки респираторного тракта мышей с индуцированным аллергическим ринитом. Интраназальное введение комплекса миРНК–LTP приводило к снижению продукции целевых цитокинов клетками региональных лимфоузлов и к уменьшению основных проявлений патологии: уменьшению уровня IgE-антител, выраженности инфильтрации верхних дыхательных путей провоспалительными клетками и ремоделирования респираторного тракта [74]. В другой работе при помощи пептида LTP доставляли молекулы миРНК, направленные против гена *Stat3*, который вовлечён в нейтрофильное воспаление лёгких при бронхиальной астме. Показано, что 3-кратное ингаляционное введение этого комплекса миРНК–LTP приводило к подавлению экспрессии целевого гена в клетках бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) в 2 раза и к уменьшению инфильтрации лёгких нейтрофилами – в 3 раза [75].

Ещё один разветвлённый (дендримерный) пептид КК-46 был использован в качестве носителя молекул миРНК, направленных против геномной РНК вируса SARS-CoV-2. Нашим коллективом проведён скрининг библиотеки миРНК, специфичных к разным участкам генома SARS-CoV-2, на предмет их способности подавлять репродукцию вируса. Наиболее активный вариант миРНК, направленный против участка генома, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу вируса, был модифицирован путём замены пяти РНК-нуклеотидов на LNA-нуклеотиды, что существенно (в 3,7 раза) повысило устойчивость миРНК к ферментам деградации без потери антивирусной активности. В исследованиях *in vitro* на культуре клеток комплекс миРНК–КК-46 обеспечивал подавление вирусной репликации до 10 000 раз. В модели инфекции SARS-CoV-2 сирийских хомячков ингаляционное введение препарата в дозах 0,7–5,6 мг на кг веса приводило к уменьшению вирусной нагрузки в лёгких до 200 раз. Более того, снижение репликации вируса в лёгких приводило к улучшению их состояния, что выражалось в уменьшении уровня перибронхальной инфильтрации провоспалительными клетками и уменьшении толщины стенок бронхов. В ходе доклинических исследований безопасности установлено, что препарат относится к классу малотоксичных соединений [28].

Применение СРР для доставки нуклеиновых кислот в клинических исследованиях. Ряд СРР достиг клинических исследований, что свидетельствует о перспективности их применения в медицинской практике. С их помощью осуществляется доставка терапевтических молекул различной природы (белки, пептиды, циклоспорин, ботулин и пр.). Некоторые СРР-содержащие препараты достигли клинических исследований (см. обзоры Guidotti et al. [62] и Stiltner et al. [77]). При этом в двух препаратах СРР использовали для доставки терапевтических нуклеиновых кислот [27].

После успешного прохождения доклинических испытаний на модели трансплантации роговиц крыс проведены клинические исследования безопасности и эффективности препарата AVI-5126. Препарат представляет собой пептид (R-Ahx-R)₄, конъюгированный с РМО, нацеленным на фактор транскрипции с-Мус человека. Блокада данного транскрипционного фактора помогает избежать отторжение трансплантированной вены после коронарного шунтирования сосудов сердца. В ходе испытания после иссечения вены её погружали в раствор, содержащий 10 мкМ AVI-5126, а затем имплантировали в качестве шунта [78]. Однако клиническое исследование было терминировано, а его результаты не опубликованы.

На основе пептидных носителей был разработан и одобрен для медицинского применения первый в мире этиотропный препарат (МИР 19) для терапии COVID-19, который представляет собой комплекс LNA-модифицированных молекул миРНК и пептида-носителя – КК-46. Проведены клинические исследования фазы II, в ходе которых препарат вводили ингаляционно пациентам со средней тяжестью COVID-19 в условиях стационара [17]. Пациенты контрольной группы (52 пациента) получали стандартную терапию, согласно клиническим рекомендациям Министерства здравоохранения РФ. Отдельная группа пациентов со средней тяжестью COVID-19 (52 пациента) получала препарат МИР 19 ингаляционно в дозе 3,7 и 11,1 мг в сутки (эти пациенты были лишены любой другой этиотропной терапии). Клинические исследования показали, что препарат безопасен, хорошо переносится и значительно сокращает время до клинического улучшения состояния пациентов, по сравнению со стандартной терапией, что выражалось в облегчении лихорадки, нормализации частоты дыхания, уменьшении кашля и восстановлении сатурации кислорода >95% [17]. По результатам исследования, препарат показал свою клиническую эффек-

тивность и был зарегистрирован для медицинского применения (рег. № ЛП-007720).

Подводя итог, разработка безопасной и эффективной системы доставки нуклеиновых кислот на основе СРР, простота производства и низкая стоимость имеют большой потенциал и значительные перспективы с точки зрения их клинического применения. В ближайшее время ожидается появление на рынке одобренных препаратов терапевтических нуклеиновых кислот, доставляемых векторами на основе СРР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента открытия пептида ТАТ в 1988 году было разработано большое количество СРР. Эти пептиды широко используются для доставки различных видов терапевтических средств. К настоящему времени накоплен значительный опыт их применения как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo*.

Главные преимущества СРР состоят в относительной простоте их получения и хранения, хорошо разработанных методах очистки и стандартизации. Кроме того, ввиду биосовместимости, СРР зачастую не обладают токсическими свойствами, а по причине небольшого размера, как правило, не вызывают нежелательных иммунных реакций. Основными препятствиями для широкого применения СРР в медицине являются низкая специфичность к типу клеток и короткий период полувыведения.

Несмотря на вышеуказанные сложности, существуют способы их преодоления. В первую очередь, это стабилизация структуры пептидов за счёт введения точечных аминокислотных замен или дополнительных химических связей. Также путём дендримеризации пептидов (синтез разветвлённых пептидов) можно добиться повышения их стабиль-

ности за счёт наличия неприродных ε-связей. Более высокая стабильность может быть достигнута за счёт использования неприродных аминокислот или энантиомеров D, которые менее чувствительны к ферментативной деградации, чем L-форма. Ведутся разработки в области улучшения специфичности СРР к целевому сайту, такие как связывание СРР со специфическими лигандами в форме ковалентных или нековалентных комплексов. Кроме того, направленности доставки можно достичь за счёт локального применения пептидов, например, ингаляционное применение СРР-содержащих препаратов для доставки в лёгкие.

В итоге проведено множество доклинических исследований, в которых при помощи СРР доставлялись различные терапевтические молекулы, включая нуклеиновые кислоты. Из них не менее девяти лекарственных препаратов достигли клинических исследований, при этом в двух из них при помощи СРР осуществляется доставка терапевтических нуклеиновых кислот. Один из таких препаратов одобрен для медицинского применения. Всё это свидетельствует о перспективности использования СРР для создания генно-терапевтического лекарственных средств.

Вклад авторов. М.Р. Хаитов — концепция и руководство работой; Е.Д. Тимотиевич — написание текста; И.П. Шиловский — написание текста, редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00182, <https://rscf.ru/project/22-25-00182/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chaudhary, N., Weissman, D., and Whitehead, K. A. (2021) mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **20**, 817–838, doi: 10.1038/S41573-021-00283-5.
2. Kulkarni, J. A., Witzigmann, D., Thomson, S. B., Chen, S., Leavitt, B. R., Cullis, P. R., and van der Meel, R. (2021) The current landscape of nucleic acid therapeutics, *Nat. Nanotechnol.*, **16**, 630–643, doi: 10.1038/s41565-021-00898-0.
3. Talap, J., Zhao, J., Shen, M., Song, Z., Zhou, H., Kang, Y., Sun, L., Yu, L., Zeng, S., and Cai, S. (2021) Recent advances in therapeutic nucleic acids and their analytical methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **206**, 114368, doi: 10.1016/J.JPBA.2021.114368.
4. Wang, Y., Zhang, R., Tang, L., and Yang, L. (2022) Nonviral delivery systems of mRNA vaccines for cancer gene therapy, *Pharmaceutics*, **14**, 512, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS14030512.

5. Shirley, J. L., de Jong, Y. P., Terhorst, C., and Herzog, R. W. (2020) Immune responses to viral gene therapy vectors, *Mol. Ther.*, **28**, 709-722, doi: 10.1016/J.YMTHE.2020.01.001.
6. Yan, Y., Liu, X. Y., Lu, A., Wang, X. Y., Jiang, L. X., and Wang, J. C. (2022) Non-viral vectors for RNA delivery, *J. Control. Rel.*, **342**, 241, doi: 10.1016/J.JCONREL.2022.01.008.
7. Zou, Z., Shen, Q., Pang, Y., Li, X., Chen, Y., Wang, X., Luo, X., Wu, Z., Bao, Z., Zhang, J., Liang, J., Kong, L., Yan, L., Xiong, L., Zhu, T., Yuan, S., Wang, M., Cai, K., Yao, Y., Wu, J., Jiang, Y., Liu, H., Liu, J., Zhou, Y., Dong, Q., Wang, W., Zhu, K., Li, L., Lou, Y., Wang, H., Li, Y., and Lin, H. (2019) The synthesized transporter K16APoE enabled the therapeutic HAYED peptide to cross the blood-brain barrier and remove excess iron and radicals in the brain, thus easing Alzheimer's disease, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **9**, 394-403, doi: 10.1007/s13346-018-0579-4.
8. Matijass, M., and Neundorff, I. (2021) Cell-penetrating peptides as part of therapeutics used in cancer research, *Med. Drug Discov.*, **10**, 100092, doi: 10.1016/j.medidd.2021.100092.
9. Derakhshankhah, H., and Jafari, S. (2018) Cell penetrating peptides: a concise review with emphasis on biomedical applications, *Biomed. Pharmacother.*, **108**, 1090-1096, doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.097.
10. Kang, Y. C., Son, M., Kang, S., Im, S., Piao, Y., Lim, K. S., Song, M. Y., Park, K. S., Kim, Y. H., and Pak, Y. K. (2018) Cell-penetrating artificial mitochondria-targeting peptide-conjugated metallothionein 1A alleviates mitochondrial damage in Parkinson's disease models, *Exp. Mol. Med.*, **50**, 1-13, doi: 10.1038/s12276-018-0124-z.
11. Xie, J., Bi, Y., Zhang, H., Dong, S., Teng, L., Lee, R. J., and Yang, Z. (2020) Cell-penetrating peptides in diagnosis and treatment of human diseases: from preclinical research to clinical application, *Front. Pharmacol.*, **11**, 697, doi: 10.3389/fphar.2020.00697.
12. Lopuszynski, J., Agrawal, V., and Zahid, M. (2022) Tissue-specific cell penetrating peptides for targeted delivery of small interfering RNAs, *Med. Res. Arch.*, doi: 10.18103/mra.v10i8.2998.
13. Nhàn, N. T. T., Maidana, D. E., and Yamada, K. H. (2023) Ocular delivery of therapeutic agents by cell-penetrating peptides, *Cells*, **12**, 1071, doi: 10.3390/cells12071071.
14. Zorko, M., Jones, S., and Langel, Ü. (2022) Cell-penetrating peptides in protein mimicry and cancer therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **180**, 114044, doi: 10.1016/J.ADDR.2021.114044.
15. Jiang, J. (2021) Cell-penetrating peptide-mediated nanovaccine delivery, *Curr. Drug Targets*, **22**, 896-912, doi: 10.2174/1389450122666210203193225.
16. Delcroix, M., and Riley, L. W. (2010) Cell-penetrating peptides for antiviral drug development, *Pharmaceuticals*, **3**, 448-470, doi: 10.3390/ph3030448.
17. Khaitov, M., Nikonova, A., Kofiadi, I., Shilovskiy, I., Smirnov, V., Elisytina, O., Maerle, A., Shatilov, A., Shatilova, A., Andreev, S., Sergeev, I., Trofimov, D., Latysheva, T., Ilyna, N., Martynov, A., Rabdano, S., Ruzanova, E., Savelev, N., Pletiukhina, I., Safi, A., Ratnikov, V., Gorelov, V., Kaschenko, V., Kucherenko, N., Umarova, I., Moskaleva, S., Fabrichnikov, S., Zuev, O., Pavlov, N., Kruchko, D., Berzin, I., Goryachev, D., Merkulov, V., Shipulin, G., Udin, S., Trukhin, V., Valenta, R., and Skvortsova, V. (2023) Treatment of COVID-19 patients with a SARS-CoV-2-specific siRNA-peptide dendrimer formulation, *Allergy*, **78**, 1639-1653, doi: 10.1111/ALL.15663.
18. Sridharan, K., and Gogtay, N. J. (2016) Therapeutic nucleic acids: current clinical status, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **82**, 659-672, doi: 10.1111/BCP.12987.
19. Davies-Sala, C., Soler-Bistué, A., Bonomo, R. A., Zorreguieta, A., and Tolmasky, M. E. (2015) External guide sequence technology: a path to development of novel antimicrobial therapeutics, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1354**, 98-110, doi: 10.1111/NYAS.12755.
20. Gadgil, H., and Jarrett, H. W. (2002) Oligonucleotide trapping method for purification of transcription factors, *J. Chromatogr. A*, **966**, 99-110, doi: 10.1016/S0021-9673(02)00738-0.
21. Vickers, T. A., Sabripour, M., and Crooke, S. T. (2011) U1 adaptors result in reduction of multiple pre-mRNA species principally by sequestering U1snRNP, *Nucleic Acids Res.*, **39**, e71, doi: 10.1093/NAR/GKR150.
22. Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., and Mukherjee, S. K. (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**, 657, doi: 10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003.
23. Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., and Hannon, G. J. (2001) Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi, *Science*, **293**, 1146-1150, doi: 10.1126/science.1064023.
24. Gangopadhyay, S., and Gore, K. R. (2022) Advances in siRNA therapeutics and synergistic effect on siRNA activity using emerging dual ribose modifications, *RNA Biol.*, **19**, 452-467, doi: 10.1080/15476286.2022.2052641.
25. Wan-Hin Hui, R., Mak, L. Y., Seto, W. K., and Yuen, M. F. (2022) RNA interference as a novel treatment strategy for chronic hepatitis B infection, *Clin. Mol. Hepatol.*, **28**, 408, doi: 10.3350/CMH.2022.0012.
26. Ray, K. K., Wright, R. S., Kallend, D., Koenig, W., Leiter, L. A., Raal, F. J., Bisch, J. A., Richardson, T., Jaros, M., Wijngaard, P. L. J., and Kastelein, J. J. P. (2020) Two phase 3 trials of inclisiran in patients with elevated LDL cholesterol, *New Eng. J. Med.*, **382**, 1507-1519, doi: 10.1056/nejmoa1912387.
27. Zhang, M. M., Bahal, R., Rasmussen, T. P., Manautou, J. E., and Zhong, X.-Bo (2021) The growth of siRNA-based therapeutics: updated clinical studies,

- Biochem. Pharmacol.*, **189**, 114432, doi: 10.1016/J.BCP.2021.114432.
28. Khaitov, M., Nikonova, A., Shilovskiy, I., Kozhikhova, K., Kofiadi, I., Vishnyakova, L., Nikolskii, A., Gattinger, P., Kovchina, V., Barvinskaya, E., Yumashev, K., Smirnov, V., Maerle, A., Kozlov, I., Shatilov, A., Timofeeva, A., Andreev, S., Koloskova, O., Kuznetsova, N., Vasina, D., Nikiforova, M., Rybalkin, S., Sergeev, I., Trofimov, D., Martynov, A., Berzin, I., Gushchin, V., Kovalchuk, A., Borisevich, S., Valenta, R., Khaitov, R., and Skvortsova, V. (2021) Silencing of SARS-CoV-2 with modified siRNA-peptide dendrimer formulation, *Allergy*, **76**, 2840-2854, doi: 10.1111/all.14850.
29. Pardi, N., Hogan, M. J., and Weissman, D. (2020) Recent advances in mRNA vaccine technology, *Curr. Opin. Immunol.*, **65**, 14-20, doi: 10.1016/J.COI.2020.01.008.
30. Ledford, H. (2020) Moderna COVID vaccine becomes second to get US authorization, *Nature*, doi: 10.1038/D41586-020-03593-7.
31. Blind, J. E., McLeod, E. N., Brown, A., Patel, H., and Ghosh, S. (2020) Biosafety practices for *in vivo* viral-mediated gene therapy in the health care setting, *Appl. Biosaf.*, **25**, 194, doi: 10.1177/1535676020942195.
32. Roberts, T. C., Langer, R., and Wood, M. J. A. (2020) Advances in oligonucleotide drug delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 673, doi: 10.1038/S41573-020-0075-7.
33. Chen, H., Ren, X., Xu, S., Zhang, D., and Han, T. (2022) Optimization of lipid nanoformulations for effective mRNA delivery, *Int. J. Nanomed.*, **17**, 2893-2905, doi: 10.2147/IJN.S363990.
34. Paunovska, K., Loughrey, D., and Dahlman, J. E. (2022) Drug delivery systems for RNA therapeutics, *Nat. Rev. Genet.*, **23**, 265, doi: 10.1038/S41576-021-00439-4.
35. Khan, M. M., Filipczak, N., and Torchilin, V. P. (2021) Cell penetrating peptides: A versatile vector for co-delivery of drug and genes in cancer, *J. Controll. Rel.*, **330**, 1220-1228, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.11.028.
36. Taylor, R. E., and Zahid, M. (2020) Cell penetrating peptides, novel vectors for gene therapy, *Pharmaceutics*, **12**, 225, doi: 10.3390/pharmaceutics12030225.
37. Falato, L., Gustin, M., and Langel, Ü. (2021) Cell-penetrating peptides delivering siRNAs: An overview, *Methods Mol. Biol.*, **2282**, 329-352, doi: 10.1007/978-1-0716-1298-9_18.
38. Rádis-Baptista, G. (2021) Cell-penetrating peptides derived from animal venoms and toxins, *Toxins (Basel)*, **13**, 147, doi: 10.3390/toxins13020147.
39. Zorko, M., and Langel, Ü. (2022) Cell-penetrating peptides, *Methods Mol. Biol.*, **2383**, 3-32, doi: 10.1007/978-1-0716-1752-6_1.
40. Ruseska, I., and Zimmer, A. (2020) Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides, *Beilstein J. Nanotechnol.*, **11**, 101-123, doi: 10.3762/bjnano.11.10.
41. Holm, T., Andaloussi, S. El, and Langel, Ü. (2011) Comparison of CPP uptake methods, *Methods Mol. Biol.*, **683**, 207-217, doi: 10.1007/978-1-60761-919-2_15.
42. Li, Z., Zhang, Y., Zhu, D., Li, S., Yu, X., Zhao, Y., Ouyang, X., Xie, Z., and Li, L. (2017) Transporting carriers for intracellular targeting delivery via non-endocytic uptake pathways, *Drug Deliv.*, **24**, 45-55, doi: 10.1080/10717544.2017.1391889.
43. Sadeghian, I., Heidari, R., Sadeghian, S., Raei, M. J., and Negahdaripour, M. (2022) Potential of cell-penetrating peptides (CPPs) in delivery of antiviral therapeutics and vaccines, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **169**, 106094, doi: 10.1016/J.EJPS.2021.106094.
44. Trabulo, S., Cardoso, A. L., Mano, M., and de Lima, M. C. P. (2010) Cell-penetrating peptides – mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems, *Pharmaceutics*, **3**, 961-993, doi: 10.3390/PH3040961.
45. Nath, A. (2021) Prediction for understanding the effectiveness of antiviral peptides, *Comput. Biol. Chem.*, **95**, 107588, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2021.107588.
46. Kaksonen, M., and Roux, A. (2018) Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 313-326, doi: 10.1038/NRM.2017.132.
47. Kawaguchi, Y., Takeuchi, T., Kuwata, K., Chiba, J., Hatanaka, Y., Nakase, I., and Futaki, S. (2016) Syndecan-4 is a receptor for clathrin-mediated endocytosis of arginine-rich cell-penetrating peptides, *Bioconjug. Chem.*, **27**, 1119-1130, doi: 10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.6B00082.
48. Futaki, S., and Nakase, I. (2017) Cell-surface interactions on arginine-rich cell-penetrating peptides allow for multiplex modes of internalization, *Acc. Chem. Res.*, **50**, 2449-2456, doi: 10.1021/ACS.ACCOUNTS.7B00221.
49. Pujals, S., and Giralt, E. (2008) Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 473-484, doi: 10.1016/J.ADDR.2007.09.012.
50. Säälik, P., Padari, K., Niinep, A., Lorents, A., Hansen, M., Jokitalo, E., Langel, Ü., and Pooga, M. (2009) Protein delivery with transportans is mediated by caveolae rather than flotillin-dependent pathways, *Bioconjug. Chem.*, **20**, 877-887, doi: 10.1021/BC800416F.
51. Taylor, B. N., Mehta, R. R., Yamada, T., Lekmine, F., Christov, K., Chakrabarty, A. M., Green, A., Bratescu, L., Shilkaitis, A., Beattie, C. W., and das Gupta, T. K. (2009) Noncationic peptides obtained from azurin preferentially enter cancer cells, *Cancer Res.*, **69**, 537-546, doi: 10.1158/0008-5472.can-08-2932.
52. Ye, J., Pei, X., Cui, H., Yu, Z., Lee, H., Wang, J., Wang, X., Sun, L., He, H., and Yang, V. C. (2018) Cellular uptake mechanism and comparative *in vitro* cytotoxicity studies of monomeric LMWP-siRNA conjugate, *J. Industr. Engineer. Chem.*, **63**, 103-111, doi: 10.1016/J.JIEC.2018.02.005.

53. Yang, S. T., Zaitseva, E., Chernomordik, L. V., and Melikov, K. (2010) Cell-penetrating peptide induces leaky fusion of liposomes containing late endosome-specific anionic lipid, *Biophys. J.*, **99**, 2525-2533, doi: 10.1016/J.BPJ.2010.08.029.
54. Cerrato, C. P., and Langel, Ü. (2022) An update on cell-penetrating peptides with intracellular organelle targeting, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **19**, 133-146, doi: 10.1080/17425247.2022.2034784.
55. Wang, H. Y., Chen, J. X., Sun, Y. X., Deng, J. Z., Li, C., Zhang, X. Z., and Zhuo, R. X. (2011) Construction of cell penetrating peptide vectors with N-terminal stearylated nuclear localization signal for targeted delivery of DNA into the cell nuclei, *J. Control Rel.*, **155**, 26-33, doi: 10.1016/J.JCONREL.2010.12.009.
56. Alkhashrom, S., Kicuntod, J., Stillger, K., Lützenburg, T., Anzenhofer, C., Neundorf, I., Marschall, M., and Eichler, J. (2022) A peptide inhibitor of the human cytomegalovirus core nuclear egress complex, *Pharmaceuticals*, **15**, 1040, doi: 10.3390/PH15091040.
57. Huang, S., Zhu, Z., Jia, B., Zhang, W., and Song, J. (2021) Design of acid-activated cell-penetrating peptides with nuclear localization capacity for anticancer drug delivery, *J. Pept. Sci.*, **27**, e3354, doi: 10.1002/PSC.3354.
58. Mueller, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R., and Boissguerin, P. (2008) Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines, *Bioconjug. Chem.*, **19**, 2363-2374, doi: 10.1021/BC800194E.
59. Chiu, Y. L., Ali, A., Chu, C. Y., Cao, H., and Rana, T. M. (2004) Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells, *Chem. Biol.*, **11**, 1165-1175, doi: 10.1016/j.chembiol.2004.06.006.
60. Tai, W., and Gao, X. (2017) Functional peptides for siRNA delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **110-111**, 157-168, doi: 10.1016/J.ADDR.2016.08.004.
61. Wang, F., Wang, Y., Zhang, X., Zhang, W., Guo, S., and Jin, F. (2014) Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery, *J. Control Rel.*, **174**, 126-136, doi: 10.1016/J.JCONREL.2013.11.020.
62. Guidotti, G., Brambilla, L., and Rossi, D. (2017) Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics, *Trends Pharmacol. Sci.*, **38**, 406-424, doi: 10.1016/J.TIPS.2017.01.003.
63. Crombez, L., Morris, M. C., Dufort, S., Aldrian-Herrada, G., Nguyen, Q., Mc Master, G., Coll, J. L., Heitz, F., and Divita, G. (2009) Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 4559-4569, doi: 10.1093/NAR/GKP451.
64. Michiue, H., Eguchi, A., Scadeng, M., and Dowdy, S. F. (2009) Induction of *in vivo* synthetic lethal RNAi responses to treat glioblastoma, *Cancer Biol. Ther.*, **8**, 2304-2311, doi: 10.4161/CBT.8.23.10271.
65. Zeng, Z., Han, S., Hong, W., Lang, Y., Li, F., Liu, Y., Li, Z., Wu, Y., Li, W., Zhang, X., and Cao, Z. (2016) A Tat-conjugated peptide nucleic acid Tat-PNA-DR inhibits hepatitis B virus replication *in vitro* and *in vivo* by targeting LTR direct repeats of HBV RNA, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **5**, e295, doi: 10.1038/MTNA.2016.11.
66. Moerdyk-Schauwecker, M., Stein, D. A., Eide, K., Blouch, R. E., Bildfell, R., Iversen, P., and Jin, L. (2009) Inhibition of HSV-1 ocular infection with morpholino oligomers targeting ICP0 and ICP27, *Antiviral Res.*, **84**, 131-141, doi: 10.1016/J.antiviral.2009.07.020.
67. Mehrlatifan, S., Mirnurollahi, S. M., Motevalli, F., Rahimi, P., Soleymani, S., and Bolhassani, A. (2016) The structural HCV genes delivered by MPG cell penetrating peptide are directed to enhance immune responses in mice model, *Drug Deliv.*, **23**, 2852-2859, doi: 10.3109/10717544.2015.1108375.
68. Moulton, H. M., Fletcher, S., Neuman, B. W., McClorey, G., Stein, D. A., Abes, S., Wilton, S. D., Buchmeier, M. J., Lebleu, B., and Iversen, P. L. (2007) Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication *in vivo*, *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 826-828, doi: 10.1042/BST0350826.
69. Hosseini, A., Lattanzio, F. A., Samudre, S. S., Disandro, G., Sheppard, J. D., and Williams, P. B. (2012) Efficacy of a phosphorodiamidate morpholino oligomer antisense compound in the inhibition of corneal transplant rejection in a rat cornea transplant model, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **28**, 194-201, doi: 10.1089/JOP.2011.0135.
70. Zhang, C., Ren, W., Liu, Q., Tan, Z., Li, J., and Tong, C. (2019) Transportan-derived cell-penetrating peptide delivers siRNA to inhibit replication of influenza virus *in vivo*, *Drug Des. Devel. Ther.*, **13**, 1059-1068, doi: 10.2147/DDDT.S195481.
71. Yuan, J., Stein, D. A., Lim, T., Qiu, D., Coughlin, S., Liu, Z., Wang, Y., Blouch, R., Moulton, H. M., Iversen, P. L., and Yang, D. (2006) Inhibition of Coxsackievirus B3 in cell cultures and in mice by peptide-conjugated morpholino oligomers targeting the internal ribosome entry site, *J. Virol.*, **80**, 11510, doi: 10.1128/JVI.00900-06.
72. Enterlein, S., Warfield, K. L., Swenson, D. L., Stein, D. A., Smith, J. L., Gamble, C. S., Kroeker, A. D., Iversen, P. L., Bavari, S., and Mühlberger, E. (2006) VP35 knockdown inhibits Ebola virus amplification and protects against lethal infection in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 984, doi: 10.1128/AAC.50.3.984-993.2006.
73. Kozhikhova, K. V., Shilovskiy, I. P., Shatilov, A. A., Timofeeva, A. V., Turetskiy, E. A., Vishniakova, L. I., Nikolskii, A. A., Barvinskaya, E. D., Karthikeyan, S., Smirnov, V. V., Kudlay, D. A., Andreev, S. M., and Khaitov, M. R. (2020) Linear and dendrimeric antiviral

- peptides: design, chemical synthesis and activity against human respiratory syncytial virus, *J. Mater. Chem. B*, **8**, 2607-2617, doi: 10.1039/c9tb02485a.
74. Shilovskiy, I., Nikonova, A., Barvinskaia, E., Kaganova, M., Nikolskii, A., Vishnyakova, L., Kovchina, V., Yumashev, K., Korneev, A., Petukhova, O., Kudlay, D., Smirnov, V., Andreev, S., Kozhikhova, K., Shatilov, A., Shatilova, A., Maerle, A., Sergeev, I., Trofimov, D., and Khaitov, M. (2022) Anti-inflammatory effect of siRNAs targeted *il-4* and *il-13* in a mouse model of allergic rhinitis, *Allergy*, **77**, 2829-2832, doi: 10.1111/ALL.15366.
 75. Nikolskii, A. A., Shilovskiy, I. P., Yumashev, K. V., Vishniakova, L. I., Barvinskaia, E. D., Kovchina, V. I., Korneev, A. V., Turenko, V. N., Kaganova, M. M., Brylina, V. E., Nikonova, A. A., Kozlov, I. B., Kofiadi, I. A., Sergeev, I. V., Maerle, A. V., Petukhova, O. A., Kudlay, D. A., and Khaitov, M. R. (2021) Effect of local suppression of Stat3 gene expression in a mouse model of pulmonary neutrophilic inflammation, *Immunologiya*, **42**, 600-614, doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-6-600-614.
 76. Shilovskiy, I., Sundukova, M., Korneev, A., Nikolskii, A., Barvinskaya, E., Kovchina, V., Vishniakova, L., Turenko, V., Yumashev, K., Kaganova, M., Brilina, V., Sergeev, I., Maerle, A., Kudlay, D., Petukhova, O., Khaitov, M. (2022) The mixture of siRNAs targeted to IL-4 and IL-13 genes effectively reduces the airway hyperreactivity and allergic inflammation in a mouse model of asthma, *Int. Immunopharmacol.*, **103**, 108432, doi: 10.1016/J.INTIMP.2021.108432.
 77. Stiltner, J., McCandless, K., and Zahid, M. (2021) Cell-penetrating peptides: applications in tumor diagnosis and therapeutics, *Pharmaceutics*, **13**, 890, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13060890.
 78. Abes, R., Arzumanov, A. A., Moulton, H. M., Abes, S., Ivanova, G. D., Iversen, P. L., Gait, M. J., and Lebleu, B. (2007) Cell-penetrating-peptide-based delivery of oligonucleotides: an overview, *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 775-779, doi: 10.1042/BST0350775.

PEPTIDE CARRIERS AS DELIVERY VEHICLES FOR THERAPEUTIC NUCLEIC ACIDS. MECHANISMS AND POTENTIAL APPLICATIONS IN MEDICINE

Review

E. D. Timotievich*, I. P. Shilovskiy, and M. R. Khaitov

*Institute of Immunology, National Research Center, Federal Medical-Biological Agency of Russia
115522 Moscow, Russia; e-mail: ed0594@yandex.ru*

Currently, a significant number of drugs based on therapeutic nucleic acids are being under development for the treatment of oncological, inflammatory, infectious diseases, and metabolic disorders. A growing number of approved nucleic acid therapeutics demonstrate the potential of gene therapy approaches. Therapeutic nucleic acids realize their biological effect in the cytoplasm, while plasma membrane is the main barrier to their intracellular delivery. Therefore, specially designed carriers are often used during the development of such drugs. The optimal carrier should not only facilitate the internalization of nucleic acids, but also exhibit no toxic effects, provide stabilization, and must be suitable for large scale production at low cost. Cell penetrating peptides (CPPs) match all these requirements. CPPs are effective and low-toxic carriers of nucleic acids. They usually represent basic peptides with a positive charge at physiological pH that capable to form nanostructures with negatively charged nucleic acids. Numerous preclinical studies in which CPP has been used as a carrier have shown promising results. In some cases, CPP-containing drugs successfully passed through clinical trials and the implemented into clinical practice. In this review, we consider the variety of therapeutic nucleic acids and summarize the experience of using CPP for their intracellular delivery. In addition, the classification and mechanisms of CPP cellular uptake are discussed, the understanding of which will accelerate the development of new gene therapy drugs.

Keywords: cell penetrating peptides, peptide delivery systems, nucleic acid delivery vehicles, siRNA