

УДК 573.6

## НЕВИРУСНЫЕ СПОСОБЫ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ

© 2025 г. А. В. Ильина<sup>1, 2, \*</sup>, Н. В. Крылова<sup>1</sup>, Г. Аль-Халаль<sup>1</sup>, Р. Г. Сахабеев<sup>2</sup>, Д. О. Виноходов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, 190013 Россия

\*e-mail: i.arina.ilina@mail.ru

Поступила в редакцию 19.11.2024 г.

После доработки 04.12.2024 г.

Принята к публикации 06.12.2024 г.

Генная терапия (ГТ) — это новое направление в медицине, использующее нуклеиновые кислоты (НК) в качестве терапевтического агента. ГТ может использоваться в лечении как наследственных заболеваний (спинальной мышечной атрофии, миодистрофии Дюшена), так и заболеваний смешанной этиологии (онкологии, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных заболеваний) так и приобретенных (например, инфекционных) заболеваний. Основные стратегии ГТ включают генозаместительную терапию, влияние на экспрессию генов, суицидальную генную терапию. Существуют ряд сложностей в доставке терапевтических НК, так как их свободные молекулы не стабильны и не могут самостоятельно проникать в клетки-мишени. Разработка безопасных и эффективных способов доставки — одна из ключевых задач ГТ. Наиболее распространёнными в силу своей высокой эффективности являются средства доставки на основе вирусов, однако они обладают рядом нежелательных действий, что ограничивает их применение. Целью данной статьи является обзор альтернативных способов доставки генетических конструкций: при помощи физических методов, естественных и искусственных полимеров, липосом, пептидов.

**Ключевые слова:** генная терапия, системы адресной доставки, пептидные носители, модификаторы сплайсинга, генозаместительная терапия, суицидная терапия

**DOI:** 10.56304/S0234275825010065

Генная терапия (ГТ) — это подход к лечению заболеваний, позволяющий компенсировать генетические дефекты путем введения в клетку ДНК, РНК и их производных. Однако степень проникновения свободных НК в клетки сравнительно низка и не специфична [1], поэтому актуален поиск средств направленной доставки генетических конструкций. Проникновение НК в клетки осложнено

их отрицательным зарядом, из-за которого происходит электростатическое отталкивание от отрицательно заряженной мембраны [2]. На этапе внутриклеточной доставки НК подвержены деградации нуклеазами [1] и возникают трудности, связанные с преодолением биологических барьеров [2].

### ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

В ГТ существует два основных подхода: изменение экспрессии гена-мишени с помощью малых интерферирующих РНК (миРНК, small interfering RNA (siRNA)), антисмысловых олигонуклеотидов (АСО), коротких шпилечных РНК (кшРНК, short hairpin RNA (shRNA)), малых активирующих РНК (маРНК, small activate RNA, saRNA), введение ДНК или РНК последовательности гена-мишени (генозаместительная (gene replacement therapy) и суицидная терапия (suicide gene therapy), введение мРНК) (рис.1). Также существует технология редактирования генетических последовательностей с помощью нуклеаз или технологии CRISPR/Cas9, но они практически не используются на людях в

**Список сокращений:** CAR — coxsackievirus and adenovirus receptor; CPP — cell-penetrating peptides; HSV-TK/GCV — herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir; LTR — long terminal repeat; MCM — methylmalonyl-CoA mutase; NLS — nuclear localization signal; PCSK9 — proprotein convertase subtilisin/kexin Type 9; SMN — survival of motor neuron; AAV — аденоассоциированные вирусы; АДА-ТКИД — тяжелый комбинированный иммунодефицит, связанный с дефицитом аденозиндеаминазы; АДД — аденолейкодистрофии; АСО — антисмысловые олигонуклеотиды; ВИЧ — вирус иммунодефицита человека; ГАГ — гликозаминогликаны; ГТ — генная терапия; ДЛПЛ — дефицит липопротеинлипазы, кшРНК — короткая шпилечная РНК; ЛППП — липопротеины низкой плотности; маРНК — малая активирующая РНК; миРНК — малая интерферирующая РНК; НК — нуклеиновая кислота; ПАМАМ — полиамидоамин; ПЛГА — полимолочно-полиглицолевая кислота; ПЭГ — полиэтиленгликоль; ПЭИ — полиэтиленимин; СМА — спинальная мышечная атрофия.

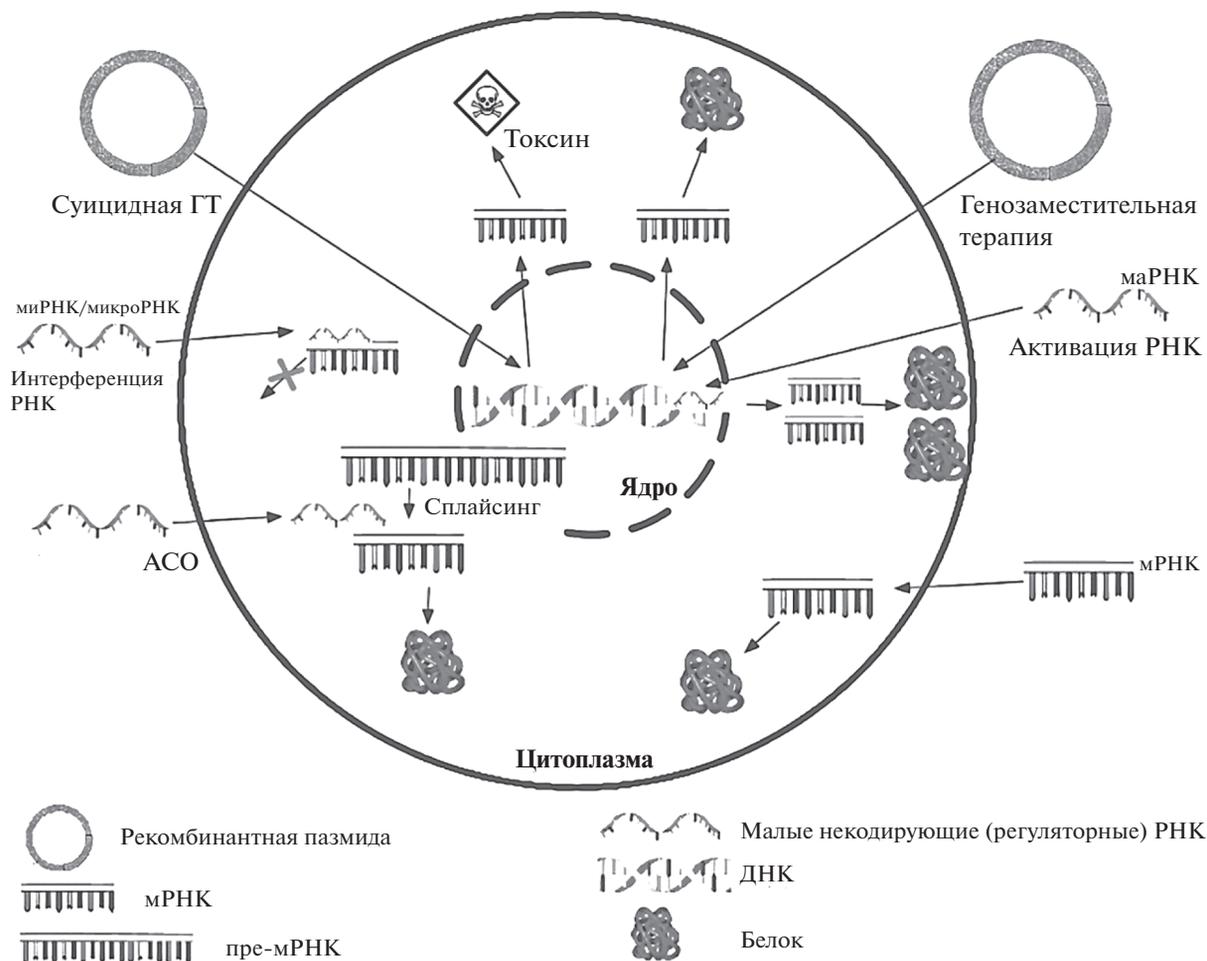


Рис. 1. Механизм работы разных типов генотерапевтических агентов.

Fig. 1. The mechanism of operation of different types of gene therapeutic agents.

силу сложностей с предсказанием результата и этическими проблемами [3, 4].

АСО представляют собой класс искусственных малых некодирующих одноцепочечных нуклеиновых кислот, состоящих из 18–30 оснований, которые комплементарны последовательностям целевых мРНК и способны влиять на процессы созревания мРНК и трансляцию [5, 6]. Такой подход к лечению использован в препарате “Спинраза” (Nusinersen) для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА). СМА – это аутосомно-рецессивное нейродегенеративное заболевание, вызванное мутациями гена *SMN1*, что приводит к снижению уровня функционального белка выживания мотонейронов SMN (survival of motor neuron) и прогрессирующей мышечной слабости [7]. Ген *SMN2* является паралогом *SMN1*, но из-за замены в 7 экзоне зрелые транскрипты *SMN2* преимущественно лишены этого экзона, что приводит к синтезу нестабильного и функционально неактивного белка [8]. Nusinersen, представляет собой 2'-O-МОЕ/PS-модифицированный антисмыс-

ловой олигонуклеотид, стимулирующий включение экзона 7 в мРНК *SMN2*, что повышает уровень функционального белка SMN [9, 10].

**Интерференция РНК** – это процесс посттранскрипционного подавления экспрессии целевых генов при помощи двухцепочечных РНК, которые могут либо запускать деградацию целевой мРНК или же ингибировать ее трансляцию [11]. Интерференция РНК может быть опосредована микроРНК, кшРНК и миРНК.

**микроРНК** представляют собой эндогенные, высоко консервативные некодирующие РНК, длиной около 22 нуклеотидов. Эти РНК регулируют экспрессию кодирующих генов путем связывания с 3'-нетранслируемыми областями, приводящего к деградации мРНК [12].

**кшРНК** представляют собой продукт расщепления искусственно созданных РНК.

**миРНК** это продукт расщепления нуклеазами экзогенной природной РНК (например, РНК вирусов) на короткие (20–25 нуклеотидов) последо-

вательности. Они взаимодействуют с регуляторными последовательностями транскрипта и приводят к подавлению трансляции. Был разработан препарат Инклизеран (торговая марка Leqvio), который использует механизм РНК-интерференции для подавления экспрессии PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9, пропротеин конвертаза субтилизин/кексин 9-го типа). PCSK9 — это фермент, который играет ключевую роль в регуляции уровня холестерина в крови. Этот фермент разрушает находящиеся на поверхности гепатоцитов рецепторы липопротеинов низкой плотности (LDL-рецепторы), которые удаляют из кровотока липопротеины низкой плотности (ЛПНП). Это, в свою очередь, приводит к увеличению уровня ЛПНП-холестерина в крови, что повышает риск сердечно-сосудистых заболеваний [13]. Использование препарата Инклизеран основано на применении мРНК, которая разрушает мРНК PCSK9 в печени [14].

**Активация РНК** — это процесс повышения экспрессии гена, опосредуемого мРНК, путем взаимодействия этих НК с промоторной областью [15]. Интересно, что активация экспрессии, вызванная мРНК, длится гораздо дольше, чем РНК-интерференция. мРНК были предложены для лечения гепатоцеллюлярной карциномы в качестве агента для повышения экспрессии супрессоров роста опухоли. Сконструированные мРНК, комплементарные промоторной области гена *p21*, были протестированы на линиях раковых клеток и выявили замедление скорости деления клеток и увеличение количества мРНК *p21*. Повышенные уровни белка p21 сильно коррелировали с увеличением экспрессии мРНК *p21* [15].

Еще один класс терапевтических агентов, используемый в генной терапии, это мРНК. Преимущества их применения следующие: мРНК может экспрессировать любой белок и, таким образом, может быть использована для лечения широкого спектра заболеваний; для мРНК в отличие от ДНК не требуется попадание в ядро и интеграция в геном, таким образом, мРНК не влияет на генетическую стабильность. Был разработан препарат Moderna mRNA-3704, содержащий мРНК, кодирующую метилмалонил-КоА мутазу (МСМ), митохондриальный гомодимерный апофермент (ЕС. 5. 4. 99.2), который катализирует превращение метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА. У новорожденных с дефицитом МСМ наблюдается рвота, ацидоз, гипераммониемия, гепатомегалия, гиперглицинемия и гипогликемия. Позже могут возникнуть тромбоцитопения и нейтропения [16]. Другой препарат Moderna mRNA-2416 предназначен для лечения солидных опухолей. В качестве действующего вещества выступает мРНК *OX40L*, активирующая Т-клеточный иммунитет против раковых клеток [17].

**Генозаместительная терапия** — это метод лечения, при котором в клетки организма вводятся функциональные копии генов для замены мутантных или делетированных генов. Этот новый ген позволяет клетке синтезировать функционально активный белок. Например, препарат Золгенсма (Zolgensma, Onasemnogene aberavovoc) разработан компанией “AveXis” для лечения пациентов со СМА и представляет собой вектор на основе адено-ассоциированного вируса, несущий копию гена *SMN1* [18]. В клинических испытаниях было показано значительное увеличение продолжительности жизни пациентов со СМА типа 1, а также улучшение двигательных функций. Однако из-за потенциальной гепатотоксичности и других побочных эффектов требуется строгий контроль лечения [19].

**Суицидная генная терапия** представляет собой стратегию лечения, при которой в клетки-мишени (например, раковые клетки) доставляется ген, кодирующий ферменты, которые преобразуют нетоксичные препараты (предшественники или prodrug) в токсичные для клеток-мишеней вещества. Классическим примером является система Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir (HSV-TK/GCV). HSV-TK/GCV — это терапия, основанная на применении гена тимидинкиназы вируса простого герпеса. Ген HSV-TK кодирует вирусный фермент тимидинкиназу, который активирует препарат Ганцикловир (GCV), превращая его в токсичное вещество, способное уничтожить клетки (например, препарат Тоса 511 (vocimagene amiretrogervec) [20]. Другим подходом в суицидной генной терапии может быть активная адресная доставка гена, кодирующего токсин: препарат REXIN-G — ретровирусный вектор, который доставляет суицидные гены (гены самоубийства клеток) в опухолевые клетки. Используется для лечения сарком и метастатических опухолей. REXIN-G активен только в клетках с высокой пролиферацией, что делает его специфичным для раковых клеток [21].

## СПОСОБЫ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ В ЯДРО

Для направленной доставки НК используют разные подходы: физические, а также вирусные и невирусные векторы (рис. 2).

### Физические методы

Были исследованы различные физические методы доставки генетических конструкций в клетки *in vivo* с использованием микроинъекций, генной пушки, электрических полей (электропорация), гидродинамического давления (перфорация водой), магнитных полей (метод магнитной трансфекции) и ультразвука (ультразвуковая перфорация) [15].

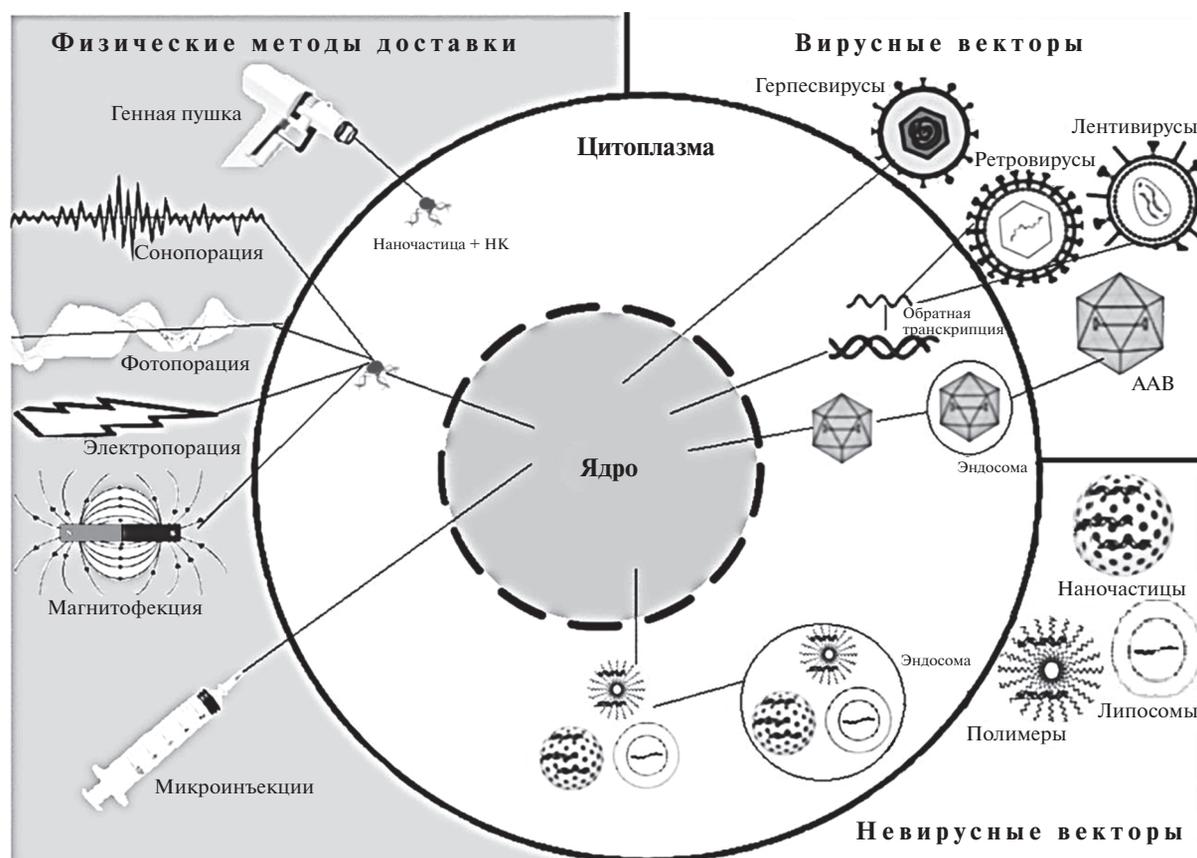


Рис. 2. Способы доставки нуклеиновых кислот.

Fig. 2. Methods of delivery of nucleic acids.

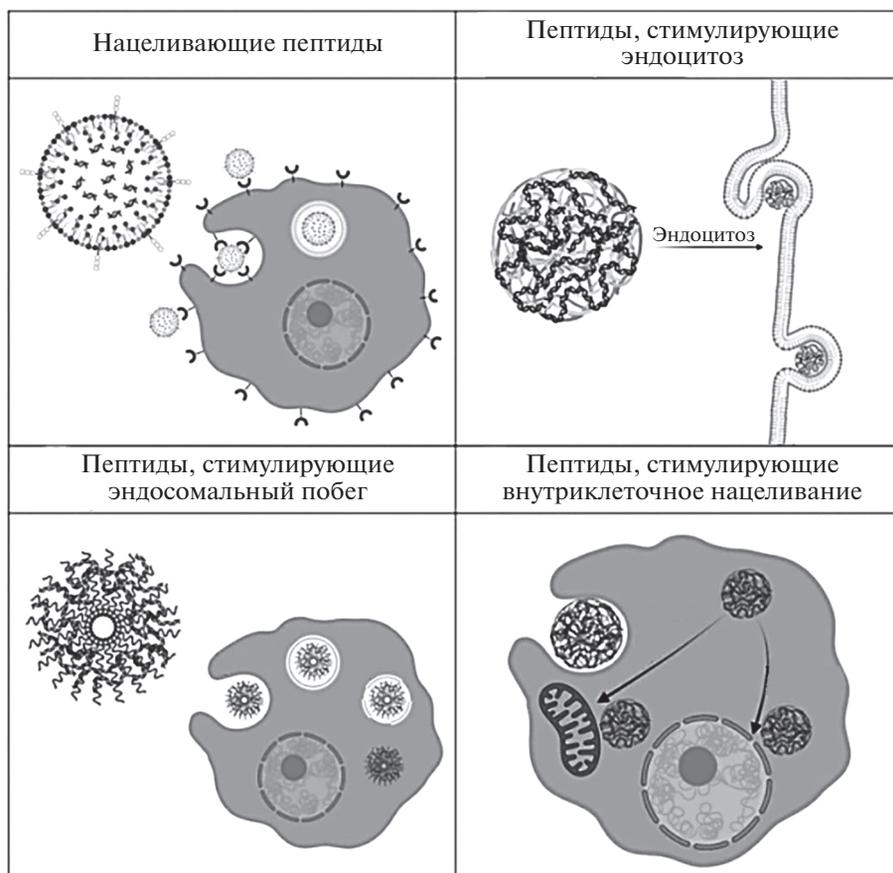
**Микроинъекции** представляют собой технологию точной доставки молекул с помощью микроигл [22]. К преимуществам этого метода можно отнести: точное прогнозирование доставленной дозы, высокую эффективность доставки и низкую цитотоксичность. В то же время он трудоемкий, отнимает много времени, кроме того выживаемость клеток сильно зависит от оператора. Был разработан пассивный метод микроинъекции, который основан на пульсирующем потоке жидкости, благодаря чему сокращается период инъекции примерно до 3 миллисекунд [23]. Микроинъекции часто используют для доставки плазмид в половые клетки, зиготы, эмбрионы, например, для создания трансгенных организмов [24, 25].

**Генные пушки** — это метод доставки в клетки при помощи придания механического ускорения НК, инкапсулированной в частицы тяжелых металлов (золото, вольфрам, титан). Однако получаемые в ходе проведения трансфекции поврежденные серьезно снижают жизнеспособность клеток. [26]. Генные пушки применяют для трансфекции широким спектром генетических конструкций как растительных [27], так и в некоторых случаях животных клеток, в частности ДНК-вакцинами [28].

**Электропорация** — это метод, основанный на повышении проницаемости клеточной мембраны при действии электрического тока [29]. Данный метод является одним из самых распространенных при трансфекции животных клеток из-за своей высокой эффективности [30]. Его используют для доставки мРНК в Т-лимфоциты [31]. Однако клетки, подвергшиеся электропорации, имеют низкую жизнеспособность вследствие повреждений мембраны [29].

**Фотопорация** как и электропорация основана на доставке НК за счет повышения проницаемости мембраны, вызванной воздействием коротких высокоинтенсивных лазерных импульсов [32, 33]. Была показана успешная доставка путем фотопорации миРНК и мРНК, конъюгированных с золотыми наночастицами, в клетки пигментного эпителия сетчатки человека [34].

Другим способом физического переноса генов является магнитная трансфекция, или **магнитофекция**. Этот метод подразумевает направленную доставку генетической конструкции, содержащей магнитные наночастицы, при помощи магнитного поля [35]. Главные преимущества магнитной трансфекции заключаются в ее способно-



**Рис. 3.** Этапы доставки терапевтических агентов к клеточным мишеням [84].

**Fig. 3.** Stages of delivery of therapeutic agents to cellular targets.

сти обеспечивать быструю и эффективную трансфекцию при низких дозах носителя [36].

**Сонопорация** использует высокоинтенсивный ультразвук для создания пор в клеточных мембранах, через которые НК могут проникнуть в клетку. По сравнению с другими физическими методами доставка генов с использованием ультразвука является более безопасной и менее травматичной для клеток [37]. Сонопорация используется и как самостоятельный метод для локальной доставки генов, продукты которых подавляют рост опухоли [37], а также в качестве дополнительного метода переноса НК.: Vilasaliu D. с коллегами использовали сонопорацию для облегчения кохлеарной генной трансфекции, опосредованной ААВ [38].

Таким образом, первыми для переноса генетических конструкций в клетки были физические методы доставки [39], однако их низкая эффективность, невысокая жизнеспособность трансфицированных клеток, ограниченность действия подтолкнули к созданию альтернативных более надежных и безопасных подходов для доставки НК.

### *Невирусные системы доставки генов*

Невирусные векторы должны быть способны имитировать вирусные функции при инфицировании клеток: проникновение в клетку, эндосомальный побег, защита от деградации, и опционально, доставка в клеточное ядро [40]. Невирусные векторы обладают рядом преимуществ в сравнении с вирусными. Первые хорошо охарактеризованы, и их структура может быть тонко настроена [41]. Кроме того, без белковых мотивов невирусные векторы не иммуногены, что позволяет их вводить повторно при хронических заболеваниях, К тому же, эти векторы сравнительно легко производить в больших масштабах [42]. Принцип работы основан на самосборке мелких стабильных надмолекулярных комплексов, часто за счет электростатических взаимодействий между положительно заряженными векторами и отрицательно заряженными НК [43]. Для доставки генетических конструкций используют липидные носители [44, 45]; полимеры: полимолочно-полигликолевую кислоту (ПЛГА) [46], поли-β-аминоэстерол [47, 48], полиэтиленмин (ПЭИ) [49], полиэтиленгликоль (ПЭГ) [38], поли-аргинин [50], хитозан [51],

декстраны [52], наночастицы кремния [53, 54], наночастицы золота [55]. Однако катионные носители имеют повышенную цитотоксичность, если не разработана оптимальная формула вещества [56].

Одними из первых органических носителей были **липосомы**, впервые синтезированные Bangham с коллегами в 1960 годах [57]. Векторы на основе липидов включают в себя нейтральные (незаряженные) липосомы, катионные липосомы и ионизируемые липиды [58]. Для образования катионных липосом используют катионные липиды, которые обеспечивают электростатические взаимодействия с отрицательно заряженными НК и способствуют эффективному взаимодействию их с клеточной мембраной. Одним из первых катионных липидов, использованным в 1987 г. для доставки экзогенной ДНК был N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмоний хлорид (DOTMA) [59]. Хотя несколько катионных липосомальных препаратов прошли клинические испытания [60, 61], их использование ограничено из-за токсичности в месте введения, нежелательных иммунных реакций и риска тромбообразования [62]. В качестве альтернативы были разработаны ионизируемые липиды. В физиологических условиях они остаются нейтральными, но ионизируются в эндосомах из-за снижения pH [63]. Эта способность приобретать заряд в эндосомах обеспечивает эндосомальный побег и выход в цитозоль [64]. В состав таких частиц помимо ионизируемого липида включают фузогенные фосфолипиды, холестерол и полиэтиленгликоль, добавление которых увеличивает трансфекционную активность путем дестабилизации липидного бислоя клеточных мембран, повышения стабильности частиц и увеличения периода полувыведения из кровотока. Ионизируемые липидные носители показали свою эффективность в доставке генов [65], например, гена *CFTR* через слизистые пациенты с фиброзом. Инкапсулирование больших молекул, например, плазмидной ДНК, с помощью данных носителей затруднено [66].

Липидные носители обладают высокой биосовместимостью, способностью преодолевать биологические барьеры, однако для осуществления эффективной адресной доставки НК необходимо внесение в структуру носителя нацеливающих лигандов.

Другим подходом к созданию носителей для векторов является использование **катионных полимеров**. Первый катионный полимер PEI был получен еще в первой половине XX века [67], однако активное применение этих соединений в качестве носителей началось лишь в конце века [56]. Они включают природные полимеры, например, хитозан, и синтетические, в число которых входит поли-L-лизин, полиэтиленмин, поли-β-аминоэфиры, полиамидоамин и другие. Разнообразие доступных полимеров и их химиче-

ских модификаций позволяет синтезировать соединения с различными физико-химическими свойствами, такими как гидрофобность и локализация заряда, что позволяет доставлять комплексы в широкий спектр клеток и тканей [68]. В структуре этих носителей также можно легко объединить модули, позволяющие преодолевать барьеры при транспорте НК, а также осуществлять адресную доставку [69]. Так, функционирование ПЭГ и аминокетонами может способствовать выходу комплексов из эндосом, поскольку эти модификации вызывают эффект протонной губки [70]. Благодаря своим свойствам катионные полимерные носители нашли применение в доставке в клетки-мишени, например, была показана эффективность RGD-PEG-PEI в качестве носителя миРНК в подавлении роста опухолей нервной системы [71].

Катионные полимеры за счет своего положительного заряда активно компактизируют НК, и взаимодействуют с ГАГ клеточной мембраны, благодаря модульности строения можно синтезировать полимеры с тонко настроенными свойствами, но вместе с тем для этих соединений требуется экранирующее покрытие для снижения иммунного ответа и увеличения эффективности трансфекции.

#### *Пептидные носители*

Пептидные носители вызывают особый интерес, так как обладают высокой биосовместимостью и низкой токсичностью, что делает их привлекательными кандидатами для доставки НК. Впервые идея использовать в качестве средств доставки пептиды возникла в 1980 годах благодаря выделению последовательности транс-активатора (ТАТ) ВИЧ [72], после чего начало появляться множество работ, посвященных использованию этих соединений в качестве носителей для доставки НК [73]. В структуре пептидов можно легко объединить модули и для осуществления адресной доставки, и для преодоления клеточных барьеров [74].

Катионные пептидные носители способны электростатически самоорганизовываться с отрицательно заряженной НК для формирования наночастиц [75]. Обеспечить общий положительный заряд пептида можно благодаря включению катионных аминокислот, а именно лизина, орнитина, гистидина и аргинина. Остатки последнего придают способность эффективно проникать в клетки благодаря гуанидиновой группе боковой цепи, которая может образовывать водородные связи с различными функциональными группами на клеточной поверхности [76, 77]. Однако при попадании в сыворотку крови такие комплексы подвергаются активной опсонизации, что приводит к их быстрой деградации и элиминации из кровотока, но эту проблему можно решить путем добавления

экранирующего покрытия [74]. Таким образом, пептиды имеют широкие перспективы применения в адресной доставке терапевтических агентов, в том числе НК [73]. Пептиды могут использоваться как в нативной так и в модифицированной форме; в качестве самостоятельного средства доставки, или с целью преобразования других типов векторов для придания им нужных характеристик: нацеленность на определенные типы клеток путем функционирования антитела, увеличение эффективности проникновения в клетки или в ядра при сшивании с CPP или NLS соответственно [78].

Пептиды являются перспективными средствами доставки НК в силу своей высокой биосовместимости, способности к самоорганизации, модульности строения, возможности включать в свой состав природные аминокислотные последовательности для увеличения эффективности трансфекции на разных ее этапах. К сложностям использования этих соединений можно отнести: возможность возникновения иммунных реакций и нестабильность, но эту проблему можно решить внесением экранирующего покрытия.

#### *Пептиды на разных этапах доставки генетических конструкций к мишеням*

Для запуска работы генетических препаратов им необходимо преодолеть ряд преград к которым относятся: клеточная мембрана, эндосома, ядерная мембрана, нуклеазы (рис. 3). Для этого применяют модификацию терапевтической конструкции CPP – нацеливающими; обеспечивающими эндосомальный побег пептидами. Данные модификации можно вносить как в пептидные носители, так и в различные типы пептид-ассоциированных наночастиц, включая липосомы, полимерные наночастицы и гибридные системы. Такие средства доставки способны защитить терапевтические молекулы от разрушения в организме и обеспечить доставку в нужное место с высокой точностью.

#### *Проникновение через клеточную мембрану*

Первый этап в доставке генетических конструкций – это проникновение через клеточную мембрану. Она имеет отрицательный заряд благодаря наличию на поверхности ГАГ и сиаловых кислот. Это создает электростатическое препятствие к проникновению одноименно заряженных НК. Поэтому для эффективной доставки НК в клетки необходимо использовать положительно заряженный носитель. Предполагается, что прикрепление терапевтического комплекса инициируется ГАГ [80]. ГАГ представляют собой плотный слой из крупных олигосахаридов с отрицательно заряженными повторяющимися дисахаридными звеньями [81]. Они могут действовать как «рецеп-

торы» электростатически связывающие терапевтические комплексы и тем самым способствовать их проникновению. Однако во многих случаях ГАГ не способны индуцировать интернализацию сами по себе, и было высказано предположение, что они стимулируют другие рецепторы, что может привести к процессам передачи сигналов для инициации эндоцитоза [81]. Олигоаргинины являются эффективными интернализаторами из-за их более высокого сродства к мембранным фосфолипидам и ГАГ [82]. Для запуска активного проникновения в клетку используют модификацию носителей специфическими аминокислотными последовательностями: сигнальную олигоаминокислотную последовательность белка TAT, поли(альфа-L-лизин) (PLL), MPG, Pep-1, которые содержат нативные полипептидные последовательности, отвечающие за транслокацию белков внутрь клетки. Катионные пептиды, такие как PLL и производные белка TAT содержат последовательности богатые аргинином, лизином и гистидином. Последняя последовательность (RKKRRQRRR) происходит от белкового фактора транскрипции TAT ВИЧ. Bahadoran A. с коллегами разработали дендример полиамидамин (ПАМАМ), модифицированный сигнальной последовательностью из белка TAT, и показали его повышенную эффективность в доставке плазмидной ДНК [83]. Также данная модификация используется для доставки терапевтических молекул в трудно трансфецируемые клетки, включая нейроны [84]. Используемый для облегчения доставки, амфифильный MPG (с последовательностью GLAFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKRKV) представляет собой пептид с полярными и неполярными структурными доменами и создан на основе вируса обезьяны 40 (PKKKRKV) [85]. Более эффективным в стимуляции эндоцитоза, чем природные пептиды оказался синтетический Pep-1 (KETWWETWWTEWSQPKRKV). Он содержит три различных функциональных домена способствующие проникновению в клетку. Pep-1 был первым одобренным CPP, с торговым названием Char-iot [86].

**К нацеливающим пептидам, обеспечивающим адресную доставку, относятся пептиды:** RGD (Аргинин-глицин-аспарагиновая кислота), NGR (Asn-Gly-Arg), а также последовательности с высокой специфичностью к рецепторам, характерным для определенных типов клеток. Например, IL-13 (VDKLLHLKLFREGQFNRFESIIICRDRTC), который использовался для нацеливания на клетки глиомы у мышей [87]; пептид CDX (FKESWRE-ARGTRIERG) со сродством к никотин-ацетилхолиновому рецептору, присутствующим в мозге [88]; NAPAmide (Ac-Nie-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-NH), аналог  $\alpha$ -меланоцитстимулирующего гормона с высокой специфичностью к злокачественным меланомам [89]; пептид Bld-1 (CSNRDARRC) специфичный к линиям раковых

**Таблица 1.** Примеры высокоспецифичных нацеливающих лигандов  
**Table 1.** Examples of highly specific targeting ligands

Лиганд	Последовательность	Рецептор	Специфичен к	Литература
IL-13	VDKLLLHLKLFREGQF-NRNFESIICRDRTC	IL-13R- $\alpha$ 2	Клетки глиомы (U251)	[99]
CDX	FKESWREARGTRIERG	Никотин-ацетилхолиновые рецепторы (nAChR)	Первичные эндотелиальные клетки капилляров головного мозга (BCEC)	[100]
NAPamide	Ac-Nle-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-NH	$\alpha$ -меланоцит-стимулирующий гормон ( $\alpha$ -MSH)	Клетки меланомы	[101]
Bld-1	CSNRDARRC	Рецептор формилпептида 1	Клетки рака мочевого пузыря (HT-1376, T-24)	[102]
cA6	CKPSSPPEECW	CD44	Клетки рака молочной железы (MDA-MB-231, SK-BR3)	[103]
t-Lyp-1	CGNKRTRGC	Нейропилины (NRP1, NRP2)	Клетки рака молочной железы (MDA-MB 231), Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC)	[104]
TAT derived	GRKKRRQRRRPQ	Рецептор интерферона $\alpha/\beta$	HeLa; клетки рака молочной железы (MCF-7/ADR)	[105]
BMP-2 derived	NSVNSKIPKACCVPTLSAI	Рецептор морфогенетического протеина костной ткани II (BMP-2)	Мононуклеарные клетки периферической крови (BMSC)	[106]

клеток мочевого пузыря [90]; циклический пептид A6 (CKPSSPPEECW), способный воздействовать на линии клеток молочной железы [91] и пептид tLyp-1 (CGNKRTRGC), присутствующий на поверхности подавляющего большинства эндотелиальных клеток [92] и взаимодействующий с рецепторами нейропилина (табл. 1).

**Пептид RGD** специфически связывается с интегринами  $\alpha v \beta 3$  и  $\alpha v \beta 5$ , которые сверхэкспрессируются на клетках эндотелия и опухолевых клетках [93]. RGD был впервые идентифицирован как последовательность в фибронектине, белке внеклеточного матрикса (ВКМ) [94]. Позднее было обнаружено, что больше белков ВКМ, включая витронектин, фибриноген, коллаген, ламинин и остеопонтин содержат эту последовательность, благодаря которой взаимодействуют с поверхностными клеточными рецепторами суперсемейства интегринов. RGD сам по себе может считаться терапевтическим, поскольку он блокирует функцию интегринов [95]. Кроме того, учитывая сродство пептида RGD к опухолям, он может использоваться для адресной доставки химиотерапевтических агентов, как показано на примере его использования в доставке доксорубина и паклитаксела [96], а также генетических конструкций, например, была показана эффективность RGD-PEG-PEI в качестве носителя мРНК в подавлении роста опухолей НС

[71]. Интернализирующий пептид RGD (**iRGD**) — это модифицированный пептид RGD, способный не только связываться с интегринными, но и проникать в клетки за счёт взаимодействия с нейропилином-1 [97].

Другим универсальным нацеливающим пептидом является **NGR** (Asn-Gly-Arg), который способен воздействовать на неоваскуляризацию опухоли, содержащей на своей поверхности рецептор CD13. Этот пептид также имеет линейную и циклическую формы [98].

#### *Пептиды, обеспечивающие эндосомальный побег*

Основным путем поглощения большинства векторов считается эндоцитоз, который можно разделить на клатрин-опосредованный, кавеоллин-опосредованный, а также макропиноцитоз:

1. **Клатрин-опосредованный эндоцитоз.** Клеточные рецепторы специфично связываются с лигандом на поверхности клетки, что инициирует сборку клатринового «опушения» вокруг участка мембраны. Клатрин — это белок, который формирует корзиноподобные структуры на мембране клетки, приводя к образованию везикул. После этого клатриновое покрытие удаляется, и везикула с захваченным содержимым перемещается внутрь клетки [107].

**2. Кавеолин-опосредованный эндоцитоз.** Кавеолы — это небольшие инвагинации плазматической мембраны, обогащенные липидными рафтами и специфическим белком кавеолином. Связывание молекул с рецепторами на мембране инициирует формирование кавеолинового “опушения” и образование кавеосом. Этот механизм поглощения характерен для определенных типов клеток, таких как эндотелиальные. Он способствует поглощению специфических сигнальных молекул и патогенов (например, некоторых вирусов) [108].

**3. Макропиноцитоз.** Это неспецифический механизм захвата больших объемов внеклеточной жидкости и растворенных веществ. Он характеризуется формированием крупных мембранных везикул — макропиносом. Актиновый цитоскелет клетки стимулируется факторами роста или другими сигналами, что приводит к образованию крупных инвагинаций мембраны. Эти инвагинации захватывают внеклеточную жидкость вместе с растворенными в ней молекулами, включая питательные вещества и антигены. Этот процесс не требует наличия рецепторов и характерен для поглощения антигенов дендритными клетками и макрофагами [109].

**Созревание эндосом** — это многоступенчатый процесс, в ходе которого ранние эндосомы преобразуются в поздние и затем в эндолизосомы. По мере созревания эндосомы её внутренний pH постепенно снижается: с 6.0–6.5 у ранней, до 5.0–6.0 у поздней и 4.5–5.0 у эндолизосомы. Это происходит благодаря работе протонной АТФазы, которая закачивает ионы водорода ( $H^+$ ) внутрь эндосомы. Снижение pH — один из ключевых факторов, влияющих на активацию ферментов и переработку содержимого эндосомы. В процессе созревания ранняя эндосома теряет определенные белки, такие как Rab5, и приобретает другие — например, Rab7, характерный для поздних эндосом. Эта смена регулирует функциональные свойства эндосомы, включая ее взаимодействие с транспортными путями и другими органеллами, такими как лизосомы. На поздних стадиях созревания эндосомы сливаются с лизосомами, которые содержат разнообразные гидролитические ферменты. В результате образуется эндолизосома — промежуточный органоид, в котором происходит интенсивное расщепление захваченных веществ. Основная функция — полная деградация захваченных материалов с помощью кислых гидролаз. К белкам-маркерам эндолизосомы относятся Lamp 1 (Lysosome-associated membrane protein 1) и различные гидролитические ферменты, такие как катепсины и липазы [110].

Вектор, оказавшись внутри эндосомы, после созревания последней подвергается деградации. Было продемонстрировано, что эффективность комплексов значительно снижается из-за их не-

способности активно выходить из эндосомы перед ее слиянием с лизосомами [111]. Эндосом-разрушающие пептиды позволяют избежать этой “эндосомальной ловушки” и высвободить содержимое в цитоплазму до слияния эндосомы с лизосомой. Как правило используются pH-чувствительные пептиды, разрушающие мембраны в кислой среде. При наличии в эндосоме молекул, способных захватывать протоны (полиэтиленимин, гистидин) создается эффект “протонной губки”, например, имидазольная группа гистидина, имеющая константу диссоциации  $pK_a$  равную 6.0, может становиться протонированной в подкисленных эндосомах [112]. Молекулы поглощают протоны и благодаря этому заряд изменяется, что ведет к усиленному захвату анионов (например,  $Cl^-$ ) [113]. Это приводит к увеличению осмотического давления внутри эндосомы и ее разрыву, что позволяет поглощенному веществу выйти в цитоплазму. Это называется “эндосомальный побег”. Также эндосомное высвобождение может быть достигнуто с помощью фузогенных пептидов, которые способствуют высвобождению комплексов посредством разрушения эндосомальной мембраны при кислом pH путем порообразования [114]. После успешного выхода из эндосом вектор оказывается в цитоплазме.

#### *Транспорт генов в ядро*

Хотя при некоторых стратегиях генной терапии необходима доставка в цитозоль клетки (например, для мРНК и микроРНК), но в ряде случаев необходимо попадание терапевтической НК в ядро [71]. Пассивная диффузия через ядерный поровый комплекс возможна только для небольших молекул. В остальных случаях требуется активный транспорт с использованием пептидов, содержащих сигнал ядерной локализации (NLS) [115]. Такие пептиды содержат сигнальные последовательности, состоящие из участка положительно заряженных аминокислот, таких как аргинин и лизин, которые взаимодействуют с импортином  $\beta$  для транспорта через ядерную мембрану. К таким последовательностям относятся уже упомянутая выше последовательность, полученная из белка трансактиватора транскрипции TAT вируса иммунодефицита человека (CYGRKKRRQRRR) [116]; пептид большого антигена T вируса SV40 (PKKKRKV); интегрин-связывающий домен (RGD) [117].

#### *Применение пептидов в доставке генетических конструкций*

Пептидные носители активно исследуются в качестве носителей при лечении широкого круга заболеваний благодаря способности селективно доставлять терапевтические агенты к пораженным клеткам, улучшая эффективность лечения и

**Таблица 2.** Использование пептидов в доставке терапевтических НК  
**Table 2.** The use of peptides in the delivery of therapeutic NA

Заболевание	Терапевтический агент	Используемый пептид	Литература
Рак груди	siRNA, направленная на подавление гена <i>Bcl-2</i>	Пептид ТАТ	[118]
Болезнь Альцгеймера	мРНК	Пептиды для доставки мРНК	[119]
Нейродегенеративные заболевания	siRNA	Пептид ТАТ	[120]
Нейродегенеративные заболевания	siRNA	Пептид RVG	[121]
Глиобластома	РНК/ДНК	Пептид Angiopep-2	[122]

снижая побочные эффекты. Некоторые примеры приведены в табл. 2.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

НК — это новая группа терапевтических агентов, уже показавшая свою эффективность в лечении целого ряда заболеваний, однако НК не способны самостоятельно преодолевать биологические барьеры, и оставаться стабильными в физиологических условиях. Для этих соединений критически важно наличие адекватной системы доставки, поэтому целый ряд исследований посвящен различным способам осуществления этого процесса. Были изучены физические методы доставки НК, доставка с использованием липидных, полимерных, вирусных, пептидных носителей.

Физические методы доставки НК отличаются высокой эффективностью, неиммуногенностью и универсальностью, однако сопровождаются повреждениями клеток, что снижает их жизнеспособность. Наименее травматичным для клеток является метод микроинъекций, который характеризуется высокой точностью переноса НК в клетку, однако он очень трудоемок и существенно зависит от навыков оператора.

Биоорганические невирусные системы с использованием липидных, полимерных, пептидных носителей обладают высокой биосовместимостью, не повреждают клетки, однако могут вызывать иммунные реакции, требуют индивидуального дизайна для разных типов задач и трудоемких методов проведения трансфекции. Как правило, доставляют НК в клетки менее эффективно, чем при использовании физических методов и вирусных векторов.

Каждая система доставки нуклеиновых кислот имеет свои недостатки, которые зависят от множества факторов, таких как стабильность, биосовместимость, токсичность и эффективность процесса. Выбор системы зависит от конкретной задачи, типа нуклеиновой кислоты и целевых клеток. Продолжаются исследования с целью устранения вышеперечисленных недостатков и создания более безопасных и эффективных систем доставки.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Juliano R.L. The Delivery of Therapeutic Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 2016, 44(14), 6518–6548. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw236>
2. Yin H., Kanasty R.L., Eltoukhy A.A., Vegas A.J., Dorkin J.R., Anderson D.G. Non-Viral Vectors for Gene-Based Therapy. *Nat. Rev. Genet.*, 2014, 15(8), 541–555. <https://doi.org/10.1038/nrg3763>
3. Sharma R., Anguela X.M., Doyon Y., Wechsler T., DeKelder R.C., Sproul S., Paschon D.E., Miller J.C., Davidson R.J., Shivak D., Zhou S., Rieders J., Gregory P.D., Holmes M.C., Rebar E.J., High K.A. In Vivo Genome Editing of the Albumin Locus as a Platform for Protein Replacement Therapy. *Blood*, 2015, 126(15), 1777–1784. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-615492>
4. Anguela X.M., High K.A. Entering the modern era of gene therapy. *Annual review of medicine*, 2019, 70(1), 273–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>
5. Sasso J.M., Ambrose B.J.B., Tenchov R., Datta R.S., Basel M.T., DeLong R.K., Zhou Q.A. The Progress and Promise of RNA Medicine—An Arsenal of Targeted Treatments. *J. Med. Chem.*, 2022, 65(10), 6975–7015. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00024>
6. Huang S., Hao X.Y., Li Y., Junyong W., Xiang D., Luo S. Nonviral Delivery Systems for Antisense Oligonucleotide Therapeutics. *Biomater. Res.*, 2022, 26, 49. <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00292-4>
7. Lefebvre S., Bürglen L., Reboullet S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Benichou B., Cruaud C., Millasseau P., Zeviani M. Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene. *Cell*, 1995, 80(1), 155–165. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3)
8. Wu X., Wang S.H., Sun J., Krainer A.R., Hua Y., Prior T.W. A-44G Transition in SMN2 Intron 6 Protects Patients with Spinal Muscular Atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, 2017, 26(14), 2768–2780. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx166>
9. Shorrock H.K., Gillingwater T.H., Groen E.J.N. Overview of Current Drugs and Molecules in Development for Spinal Muscular Atrophy Therapy. *Drugs*, 2018, 78(3), 293–305. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0868-8>
10. Sheng L., Rigo F., Bennett C.F., Krainer A.R., Hua Y. Comparison of the Efficacy of MOE and PMO Modifications of Systemic Antisense Oligonucleotides in a Severe SMA Mouse Model. *Nucleic Acids Res.*, 2020, 48(6), 2853–2865. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa126>

11. *Setten R.L., Rossi J.J., Han S.P.* The Current State and Future Directions of RNAi-Based Therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2019, 18(6), 421–446. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>
12. *Lehto T., Ezzat K., Wood M.J.A., El Andaloussi S.* Peptides for Nucleic Acid Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2016, 106(A), 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.008>
13. *Abifadel M., Varret M., Rabès J.P., Allard D., Ouguerram K., Devillers M., Cruaud C., Benjannet S., Wickham L., Erlich D., Derré A., Villéger L., Farnier M., Beutcler I., Bruckert E., Chambaz J., Chanu B., Lecerf J.M., Luc G., Moulin P., Weissenbach J., Prat A., Krempf M., Junien C., Seidah N.G., Boileau C.* Mutations in PCSK9 Cause Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. *Nat. Genet.*, 2003, 34(2), 154–156. <https://doi.org/10.1038/ng1161>
14. *Ray K.K.; Troquay R.P.T., Visseren F.L.J., Leiter L.A., Scott Wright R., Vikarunnessa S., Talloczy Z., Zang X., Maheux P., Lesogor A., Landmesser U.* Long-Term Efficacy and Safety of Inclisiran in Patients with High Cardiovascular Risk and Elevated LDL Cholesterol (ORION-3): Results from the 4-Year Open-Label Extension of the ORION-1 Trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 2023, 11(2), 109–119. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00353-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00353-9)
15. *Li L.C., Okino S.T., Zhao H., Pookot D., Place R.F., Urakami S., Enokida H., Dahiya R.* Small dsRNAs Induce Transcriptional Activation in Human Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103(46), 17337–17342. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607015103>
16. *Keyfi F., Talebi S., Varasteh A.R.* Methylmalonic Acidemia Diagnosis by Laboratory Methods. *Rep. Biochem. Mol. Biol.*, 2016, 5(1), 1–14.
17. *Jimeno A., Gupta S., Sullivan R., Do K.T., Akerley W.L., Wang D., Teoh D., Schalper K., Zacharek S.J., Sun J., Laino A.S., Frederick J., Zhou H., Randolph W., Pascarella S., Johansen L., Cohen P.S., MEEHAN R.S., Bauer T.M.* Abstract CT032: A Phase 1/2, Open-Label, Multicenter, Dose Escalation and Efficacy Study of mRNA-2416, a Lipid Nanoparticle Encapsulated mRNA Encoding Human OX40L, for Intratumoral Injection Alone or in Combination with Durvalumab for Patients with Advanced Malignancies. *Cancer Res.*, 2020, 80(16), 32. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2020-CT032>
18. *Dolgin E.* News Feature: Gene Therapy Successes Point to Better Therapies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019, 116(48), 23866–23870. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918306116>
19. *Mendell J.R., Al-Zaidy S.A., Lehman K.J., McColly M., Lowes L.P., Alfano L.N., Reash N.F., Iammarino M.A., Church K.R., Kleyn A., Meriggioli M.N., Shell R.* Five-Year Extension Results of the Phase 1 START Trial of Onasemnogene Aeparovovec in Spinal Muscular Atrophy. *JAMA Neurol.*, 2021, 78(7), 834–841. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.1272>
20. *Huang T.T., Parab S., Burnett R., Diago O., Ostertag D., Hofman F.M., Espinoza F.L., Martin B., Ibañez C.E., Kasahara N., Gruber H.E., Pertschuk D., Jolly D.J., Robbins J.M.* Intravenous Administration of Retroviral Replicating Vector, Toca 511, Demonstrates Therapeutic Efficacy in Orthotopic Immune-Competent Mouse Glioma Model. *Hum. Gene Ther.*, 2015, 26(2), 82–93. <https://doi.org/10.1089/hum.2014.100>
21. *Gordon E.M., Hall F.L.* Rixin-G, a Targeted Genetic Medicine for Cancer. *Expert Opin Biol. Ther.*, 2010, 10(5), 819–832. <https://doi.org/10.1517/14712598.2010.481666>
22. *Azarmanesh M., Dejam M., Azizian P., Yesiloz G., Mohamad A., Sanati-Nezhad A.* Passive Microinjection within High-Throughput Microfluidics for Controlled Actuation of Droplets and Cells. *Sci. Rep.*, 2019, 9, 6723. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43056-2>
23. *Abate A., Hung T., Mary P., Agresti, J., Weitz D.* High-Throughput Injection with Microfluidics Using Picoinjectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107, 19163–19166. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006888107>
24. *Geurts A.M., Cost G.J., Freyvert Y., Zeitler B., Miller J.C., Choi V.M., Jenkins S.S., Wood A., Cui X., Meng X., Vincent A., Lam S., Michalkiewicz M., Schilling R., Foeckler J., Kalloway S., Weiler H., Ménoret S., Anegón I., Davis G.D., Zhang L., Rebar E.J., Gregory P.D., Urnov F.D., Jacob H.J., Buelow R.* Knockout Rats via Embryo Microinjection of Zinc-Finger Nucleases. *Science*, 2009, 325(5939), 433. <https://doi.org/10.1126/science.1172447>
25. *Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H.* Genetic Transformation of Mouse Embryos by Microinjection of Purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77(12), 7380–7384. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7380>
26. *Johnston S.A., Tang D.C.* Gene Gun Transfection of Animal Cells and Genetic Immunization. *Methods Cell. Biol.*, 1994, 43(A), 353–365. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)60612-3](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)60612-3)
27. *Kao C.Y., Huang S.H., Lin C.M.* A Low-Pressure Gene Gun for Genetic Transformation of Maize (*Zea Mays* L.). *Plant Biotechnol. Rep.*, 2008, 2, 267–270. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0067-2>
28. *Goudy K.S., Wang B., Tisch R.* Gene Gun-Mediated DNA Vaccination Enhances Antigen-Specific Immunotherapy at a Late Preclinical Stage of Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *Clin. Immunol.*, 2008, 129(1), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.06.001>
29. *Guo H., Hao R., Wei Y., Sun D., Sun S., Zhang Z.* Optimization of Electroporation Conditions of Mammalian Cells with Different Biological Features. *J. Membr. Biol.*, 2012, 245(12), 789–795. <https://doi.org/10.1007/s00232-012-9480-0>
30. *Tevaeerai H.T., Gazdhar A., Giraud M.N., Flück M.* In Vivo Electroporation-Mediated Gene Delivery to the Beating Heart. *Methods Mol. Biol.*, 2014, 1121, 223–229. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9632-8\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9632-8_19)
31. *Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H.* Gene Transfer into Mouse Lyoma Cells by Electroporation in High Electric Fields. *EMBO J.*, 1982, 1(7), 841–845. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>
32. *Herrero M.J., Sendra L., Miguel A., Aliño S.* Physical Methods of Gene Delivery. In: Brunetti-Pierri, N. (eds) Safety and Efficacy of Gene-Based Therapeutics for Inherited Disorders. *Springer, Cham.*, 2017, 113–135. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-53457-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53457-2_6)
33. *Batabyal S., Kim Y.T., Mohanty S.* Ultrafast Laser-Assisted Spatially Targeted Optoporation into Cortical Axons and Retinal Cells in the Eye. *J. Biomed. Opt.*, 2017, 22(6), 60504. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.6.060504>

34. *Hasanzadeh Kafshgari M., Agiotis L., Largilliere I., Patskovsky S., Meunier M.* Antibody-functionalized gold nanostar-mediated on-resonance picosecond laser optoporation for targeted delivery of RNA therapeutics. *Small*, 2021, 17(19) e2007577. <https://doi.org/10.1002/smll.202007577>
35. *Plank C., Zelfhati O., Mykhaylyk O.* Magnetically Enhanced Nucleic Acid Delivery. Ten Years of Magneto-fectio-n-Progress and Prospects. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, 63(14–15), 1300–1331. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.08.002>
36. *Li W., Ma N., Ong L.L., Kaminski A., Skrabal C., Ugurlucan M., Lorenz P., Gatzel H.H., Lützwow K., Lendlein A., Pützer B.M., Li R.K., Steinhoff G.* Enhanced Thoracic Gene Delivery by Magnetic Nanobead-Mediated Vector. *J. Gene Med.*, 2008, 10(8), 897–909. <https://doi.org/10.1002/jgm.1208>
37. *Zhang Z., Chen Z., Fan L., Landry T., Brown J., Yu Z., Yin S., Wang J.* Ultrasound-Microbubble Cavitation Facilitates Adeno-Associated Virus Mediated Cochlear Gene Transfection across the Round-Window Membrane. *Bioeng. Transl. Med.*, 2021, 6(1), e10189. <https://doi.org/10.1002/btm2.10189>
38. *Vllasaliu D., Fowler R., Stolnik S.* PEGylated Nanomedicines: Recent Progress and Remaining Concerns. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2014, 11(1), 139–154. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.866651>
39. *Chou T.W., Biswas S., Lu S.* Gene Delivery Using Physical Methods: An Overview. *Methods Mol. Biol.*, 2004, 245, 147–166. <https://doi.org/10.1385/1-59259-649-5:147>
40. *Aris A., Villaverde A.* Modular protein engineering for non-viral gene therapy. *Trends Biotechnol.*, 2004, 22(7) 371–377.
41. *Belmadi N., Midoux P., Loyer P., Passirani C., Pichon C., Le Gall T., Jaffres P.A., Lehn P., Montier T.* Synthetic Vectors for Gene Delivery: An Overview of Their Evolution Depending on Routes of Administration. *Bio-technol. J.*, 2015, 10(9), 1370–1389. <https://doi.org/10.1002/biot.201400841>
42. *Bondi M.L., Craparo E.F.* Solid Lipid Nanoparticles for Applications in Gene Therapy: A Review of the State of the Art. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2010, 7(1), 7–18. <https://doi.org/10.1517/17425240903362410>
43. *Duan D., Mendell J.R.* Muscle Gene Therapy. 2nd ed. Switzerland: Springer Nature, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-03095-7>
44. *Ishida T., Harashima H., Kiwada H.* Interactions of Liposomes with Cells in Vitro and in Vivo: Opsonins and Receptors. *Curr. Drug Metab.*, 2001, 2(4), 397–409. <https://doi.org/10.2174/1389200013338306>
45. *Berger S., Krhač Levačić A., Hörterer E., Wilk U., Benli-Hoppe T., Wang Y., Öztürk Ö., Luo J., Wagner E.* Optimizing pDNA Lipo-Polyplexes: A Balancing Act between Stability and Cargo Release. *Biomacromolecules*, 2021, 22(3), 1282–1296. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01779>
46. *Jo A., Ringel-Scaia V.M., McDaniel D.K., Thomas C.A., Zhang R., Riffle J.S., Allen I.C., Davis R.M.* Fabrication and Characterization of PLGA Nanoparticles Encapsulating Large CRISPR-Cas9 Plasmid. *J. Nanobiotechnology*, 2020, 18(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0564-1>
47. *Zhao J., Weng G., Li J., Zhu J., Zhao J.* Polyester-Based Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Ma-ter. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, 2018, 92, 983–994. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.027>
48. *Keeney M., Ong S.G., Padilla A., Yao Z., Goodman S., Wu J.C., Yang F.* Development of Poly ( $\beta$ -Amino Ester)-Based Biodegradable Nanoparticles for Nonviral Delivery of Minicircle DNA. *ACS Nano.*, 2013, 7(8), 7241–7250. <https://doi.org/10.1021/nn402657d>
49. *Pandey A.P., Sawant K.K.* Polyethylenimine: A Versatile, Multifunctional Non-Viral Vector for Nucleic Acid Delivery. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, 2016, 68, 904–918. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.066>
50. *Kim S.W., Kim N.Y., Choi Y.B., Park S.H., Yang J.M., Shin S.* RNA Interference in Vitro and in Vivo Using an Arginine Peptide/siRNA Complex System. *J. Control. Release*, 2010, 143(3), 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.009>
51. *Fernández E., Santos-Carballal B., de Santi C., Ramsey J.M., MacLoughlin R., Cryan S.A., Greene C.M.* Bio-polymer-Based Nanoparticles for Cystic Fibrosis Lung Gene Therapy Studies. *Materials (Basel)*, 2018, 11(1), 122. <https://doi.org/10.3390/ma11010122>
52. *Haley R.M., Gottardi R., Langer R., Mitchell M.J.* Cyclodextrins in Drug Delivery: Applications in Gene and Combination Therapy. *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2020, 10(3), 661–677. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00724-5>
53. *Zhou X., Feng W., Qiu K., Chen L., Wang W., Nie W., Mo X., He C.* BMP-2 Derived Peptide and Dexamethasone Incorporated Mesoporous Silica Nanoparticles for Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, 7(29), 15777–15789. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b02636>
54. *Liu Y., Chen Q., Xu M., Guan G., Hu W., Liang Y., Zhao X., Qiao M., Chen D., Liu H.* Single Peptide Ligand-Functionalized Uniform Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles Achieving Dual-Targeting Drug Delivery to Tumor Cells and Angiogenic Blood Vessel Cells. *Int. J. Nanomedicine*, 2015, 10, 1855–1867. <https://doi.org/10.2147/IJN.S75098>
55. *Abashkin V., Pędziwiatr-Werbicka E., Gómez R., de la Mata F.J., Dźmiatruk V., Shcharbin D., Bryszewska M.* Prospects of Cationic Carbosilane Dendronized Gold Nanoparticles as Non-Viral Vectors for Delivery of Anticancer siRNAs siBCL-xL and siMCL-1. *Pharmaceutics*, 2021, 13(10), 1549. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101549>
56. *Ly H., Zhang S., Wang B., Cui S., Yan J.* Toxicity of Cationic Lipids and Cationic Polymers in Gene Delivery. *J. Control Release*, 2006, 114(1), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.014>
57. *Baghdan E., Pinnapireddy S.R., Strehlow B., Engelhardt K.H., Schäfer J., Bakowsky U.* Lipid Coated Chitosan-DNA Nanoparticles for Enhanced Gene Delivery. *Int. J. Pharm.*, 2018, 535(1–2), 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.045>
58. *Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M.* Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84(21), 7413–7417. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413>
59. *Allen T.M., Cullis P.R.* Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Adv.*

- Drug Deliv. Rev.*, 2013, 65(1), 36–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
60. Schwendener R.A. Liposomes as Vaccine Delivery Systems: A Review of the Recent Advances. *Ther Adv Vaccines*, 2014, 2(6), 159–182.  
<https://doi.org/10.1177/2051013614541440>
  61. Christensen D., Korsholm K.S., Andersen P., Agger E.M. Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert review of vaccines*, 2011, 10(4), 513–521.  
<https://doi.org/10.1586/erv.11.17>
  62. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomed.*, 2012, 7, 5577–5591.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>
  63. Love K.T., Mahon K.P., Levins C.G., Whitehead K.A., Querbes W., Dorkin J.R., Qin J., Cantley W., Qin L.L., Racie T., Frank-Kamenetsky M., Yip K.N., Alvarez R., Sah D.W.Y., de Fougerolles A., Fitzgerald K., Kotliansky V., Akinc A., Langer R., Anderson D.G. Lipid-like Materials for Low-Dose, in Vivo Gene Silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107(5), 1864–1869.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0910603106>
  64. Mukalel A.J., Riley R.S., Zhang R., Mitchell M.J. Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery: Applications in Cancer Immunotherapy. *Cancer Lett.*, 2019, 458, 102–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.04.040>
  65. Li C., Yang T., Weng Y., Zhang M., Zhao D., Guo S., Hu B., Shao W., Wang X., Hussain A., Liang X.J., Huang Y. Ionizable Lipid-Assisted Efficient Hepatic Delivery of Gene Editing Elements for Oncotherapy. *Bioact. Mater.*, 2022, 9, 590–601.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.051>
  66. Alton E.W., Stern M., Farley R., Jaffe A., Chadwick S.L., Phillips J., Davies J., Smith S.N., Browning J., Davies M.G., Hodson M.E., Durham S.R., Li D., Jeffery P.K., Scallan M., Balfour R., Eastman S.J., Cheng S.H., Smith A.E., Meeker D., Geddes D.M. Cationic Lipid-Mediated CFTR Gene Transfer to the Lungs and Nose of Patients with Cystic Fibrosis: A Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Lancet*, 1999, 353(9157), 947–954.  
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)06532-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)06532-5)
  67. Boussif O., Lezoualc'h, F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92(16), 7297–7301.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>
  68. Pack D.W., Hoffman A.S., Pun S., Stayton P.S. Design and Development of Polymers for Gene Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, 4(7), 581–593.  
<https://doi.org/10.1038/nrd1775>
  69. Jiao Y., Xia Z.L., Ze L.J., Jing H., Xin B., Fu S. Research Progress of Nucleic Acid Delivery Vectors for Gene Therapy. *Biomed. Microdevices*, 2020, 22(1), 16.  
<https://doi.org/10.1007/s10544-020-0469-7>
  70. Lin J.T., Liu Z.K., Zhu Q.L., Rong X.H., Liang C.L., Wang J., Ma D., Sun J., Wang G.H. Redox-Responsive Nanocarriers for Drug and Gene Co-Delivery Based on Chitosan Derivatives Modified Mesoporous Silica Nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces.*, 2017, 155, 41–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.002>
  71. Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H., Betts C., Lakkhal S., Wood M.J.A. Delivery of siRNA to the Mouse Brain by Systemic Injection of Targeted Exosomes. *Nat. Biotechnol.*, 2011, 29(4), 341–345.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.1807>
  72. Frankel A.D., Bredt D.S., Pabo C.O. Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus Forms a Metal-Linked Dimer. *Science*, 1988, 240(4848), 70–73.  
<https://doi.org/10.1126/science.2832944>
  73. Wang H., Feng Z., Huang J. Supramolecular Assemblies of Peptides or Nucleopeptides for Gene Delivery. *Theranostics*, 2019, 9.  
<https://doi.org/10.7150/thno.31854>
  74. McErlean E.M., McCrudden C.M., McCarthy H.O. Delivery of Nucleic Acids for Cancer Gene Therapy: Overcoming Extra- and Intra-Cellular Barriers. *Ther. Deliv.*, 2016, 7(9), 619–637.  
<https://doi.org/10.4155/tde-2016-0049>
  75. Boisguerin P., Konate K., Josse E., Vives E., Deshayes S. Peptidebased nanoparticles for therapeutic nucleic acid delivery. *Biomedicines*, 2021, 9(5) 583.  
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9050583>
  76. Nakase I., Takeuchi T., Tanaka G., Futaki S. Methodological and Cellular Aspects That Govern the Internalization Mechanisms of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, 60(4–5), 598–607.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.006>
  77. Chang M., Huang Y.W., Aronstam R.S., Lee H.J. Cellular Delivery of Noncovalently-Associated Macromolecules by Cell-Penetrating Peptides. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2014, 15(3), 267–275.  
<https://doi.org/10.2174/1389201015666140617095415>
  78. Cerrato C.P., Künnapuu K., Langel Ü. Cell-Penetrating Peptides with Intracellular Organelle Targeting. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2017, 14(2), 245–255.  
<https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1213237>
  79. Tarvirdipour S., Skowicki M., Schoenenberger C.A., Palivan C.G. Peptide-Assisted Nucleic Acid Delivery Systems on the Rise. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(16), 9092.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22169092>
  80. Vercauteren D., Rejman J., Martens T.F., Demeester J., De Smedt S.C., Braeckmans K. On the Cellular Processing of Non-Viral Nanomedicines for Nucleic Acid Delivery: Mechanisms and Methods. *J. Control. Release*, 2012, 161(2), 566–581.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.05.020>
  81. Favretto M.E., Wallbrecher R., Schmidt S., Van de Putte R., Brock R. Glycosaminoglycans in the Cellular Uptake of Drug Delivery Vectors - Bystanders or Active Players. *J. Control Release*, 2014, 180, 81–90.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.02.011>
  82. Loughran S., McCrudden C., McCarthy H. Designer Peptide Delivery Systems for Gene Therapy. *Eur. J. Nanomed.*, 2015, 7(2), 85–96.  
<https://doi.org/10.1515/ejnm-2014-0037>
  83. Bahadoran A., Moeini H., Bejo M.H., Hussein M.Z., Omar A.R. Development of Tat-Conjugated Dendrimer for Transdermal DNA Vaccine Delivery. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2016, 19(3), 325–338.  
<https://doi.org/10.18433/J3G31Q>
  84. Peng J., Rao Y., Yang X., Jia J., Wu Y., Lu J., Tao Y., Tu W. Targeting Neuronal Nitric Oxide Synthase by a Cell Penetrating Peptide Tat-LK15/siRNA Bioconjugate. *Neurosci. Lett.*, 2017, 650, 153–160.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.04.045>
  85. Milletti F. Cell-Penetrating Peptides: Classes, Origin, and Current Landscape. *Drug Discov. Today.*, 2012, 17(15–16), 850–860.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002>

86. *Henriques S.T., Quintas A., Bagatolli L.A., Homblé F., Castanho M.A.R.B.* Energy-Independent Translocation of Cell-Penetrating Peptides Occurs without Formation of Pores. A Biophysical Study with Pep-1. *Mol. Membr. Biol.*, 2007, 24(4), 282–293. <https://doi.org/10.1080/09687860601142936>
87. *Liu X., Madhankumar A.B., Miller P.A., Duck K.A., Hafenstein S., Rizk E., Slagle-Webb B., Sheehan J.M., Connor J.R., Yang Q.X.* MRI Contrast Agent for Targeting Glioma: Interleukin-13 Labeled Liposome Encapsulating Gadolinium-DTPA. *Neuro Oncol.*, 2016, 18(5), 691–699. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov263>
88. *Zhan C., Li B., Hu L., Wei X., Feng L., Fu W., Lu W.* Micelle-Based Brain-Targeted Drug Delivery Enabled by a Nicotine Acetylcholine Receptor Ligand. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2011, 50(24), 5482–5485. <https://doi.org/10.1002/anie.201100875>
89. *Szabó I., Biri-Kovacs B., Vári B., Randelovic I., Vári-Mező D., Juhász É., Halmos G., Bősze S., Tóvári J., Mezo G.* Targeting the Melanocortin 1 Receptor in Melanoma: Biological Activity of  $\alpha$ -MSH Peptide Conjugates. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 25(2), 1095. <https://doi.org/10.20944/preprints202311.1667.v1>
90. *Jung H.K., Kim S., Park R.W., Park J.Y., Kim I.S., Lee B.* Bladder Tumor-Targeted Delivery of pro-Apoptotic Peptide for Cancer Therapy. *J. Control. Release*, 2016, 235, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.008>
91. *Lee J., Oh E.T., Choi M.H., Kim H.G., Park H.J., Kim C.* Dual-Functional Cyclic Peptide Switch on Mesoporous Nanocontainers for Selective CD44 Targeting and on-off Gatekeeping Triggered by Conformational Transformation. *New J. Chem.*, 2018, 42(15), 12938–12944. <https://doi.org/10.1039/C8NJ02179A>
92. *Laakkonen P., Porkka K., Hoffman J.A., Ruoslahti E.* A Tumor-Homing Peptide with a Targeting Specificity Related to Lymphatic Vessels. *Nat. Med.*, 2002, 8(7), 751–755. <https://doi.org/10.1038/nm720>
93. *Ruoslahti E.* Fibronectin and Its Integrin Receptors in Cancer. *Adv. Cancer Res.*, 1999, 76, 1–20. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60772-1](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60772-1)
94. *Ruoslahti E., Pierschbacher M.D.* New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins. *Science*, 1987, 238(4826), 491–497. <https://doi.org/10.1126/science.2821619>
95. *Li J., Ding M., Fu Q., Tan H., Xie X., Zhong Y.* A Novel Strategy to Graft RGD Peptide on Biomaterials Surfaces for Endothelialization of Small-Diameter Vascular Grafts and Tissue Engineering Blood Vessel. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2008, 19(7), 2595–2603. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3354-5>
96. *Murphy E.A., Majeti B.K., Mukthavaram R., Acevedo L.M., Barnes L.A., Cheresh D.A.* Targeted Nanogels: A Versatile Platform for Drug Delivery to Tumors. *Mol. Cancer Ther.*, 2011, 10(6), 972–982. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0729>
97. *Sugahara K.N., Teesalu T., Karmali P.P., Kotamraju V.R., Agemy L., Greenwald D.R., Ruoslahti E.* Coadministration of a Tumor-Penetrating Peptide Enhances the Efficacy of Cancer Drugs. *Science*, 2010, 328(5981), 1031–1035. <https://doi.org/10.1126/science.1183057>
98. *Corti A., Curnis F.* Tumor Vasculature Targeting through NGR Peptide-Based Drug Delivery Systems. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2011, 12(8), 1128–1134. <https://doi.org/10.2174/138920111796117373>
99. *Shi J., Hou S., Huang J., Wang S., Huan W., Huang C., Chen J.* Retracted Article: An MSN-PEG-IP drug delivery system and IL13R $\alpha$ 2 as targeted therapy for glioma. *Nanoscale*, 2017, 9(26), 8970–8981. <https://doi.org/10.1039/C6NR08786H>
100. *Wei X., Zhan C., Shen Q., Fu W., Xie C., Gao J., Lu W.* A d-Peptide Ligand of Nicotine Acetylcholine Receptors for Brain-Targeted Drug Delivery. *Angewandte Chemie*, 2015, 127(10), 3066–3070. <https://doi.org/10.1002/ange.201411226>
101. *Villaverde G., Gómez-Graña S., Guisasaola E., García I., Hanske C., Liz-Marzán L.M., Vallet-Regí M.* Targeted Chemo-Photothermal Therapy: A Nanomedicine Approximation to Selective Melanoma Treatment. *Particle & Particle Systems Characterization*, 2018, 35(7), 1800148. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201800148>
102. *Wei Y., Gao L., Wang L., Shi L., Wei E., Zhou B., Ge B.* Polydopamine and peptide decorated doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles as a targeted drug delivery system for bladder cancer therapy. *Drug Delivery*, 2017, 24(1), 681–691. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1309475>
103. *Lee J., Oh E.T., Choi M.H., Kim H.G., Park H.J., Kim C.* Dual-functional cyclic peptide switch on mesoporous nanocontainers for selective CD44 targeting and on-off gatekeeping triggered by conformational transformation. *New Journal of Chemistry*, 2018, 42(15), 12938–12944. <https://doi.org/10.1039/C8NJ02179A>
104. *Liu Y., Chen Q., Xu M., Guan G., Hu W., Liang Y., Liu H.* Single peptide ligand-functionalized uniform hollow mesoporous silica nanoparticles achieving dual-targeting drug delivery to tumor cells and angiogenic blood vessel cells. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10, 1855–1867. <https://doi.org/10.2147/IJN.S75098>
105. *Wang H., Feng Z., Xu B.* Supramolecular Assemblies of Peptides or Nucleopeptides for Gene Delivery. *Theranostics*, 2019, 9(11), 3213–3222. <https://doi.org/10.7150/thno.31854>
106. *Zhou X., Feng W., Qiu K., Chen L., Wang W., Nie W., He C.* BMP-2 derived peptide and dexamethasone incorporated mesoporous silica nanoparticles for enhanced osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells. *ACS applied materials & interfaces*, 2015, 7(29), 15777–15789. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b02636>
107. *Kaksonen M., Roux A.* Mechanisms of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018, 19(5), 313–326. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>
108. *Matveev S., Li X., Everson W., Smart E.J.* The Role of Caveolae and Caveolin in Vesicle-Dependent and Vesicle-Independent Trafficking. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 49(3), 237–250. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00138-7](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00138-7)
109. *Kay R.R.* Macropinocytosis: Biology and Mechanisms. *Cells Dev.*, 2021, 168, 203713. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2021.203713>
110. *Huotari J., Helenius A.* Endosome Maturation. *EMBO J.*, 2011, 30(17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
111. *Smith L.C., Duguid J., Wadhwa M.S., Logan M.J., Tung C.H., Edwards V., Sparrow J.T.* Synthetic peptide-

- based DNA complexes for nonviral gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 1998, 30(1-3), 115–131.  
[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00111-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00111-7)
112. Midoux P., Kichler A., Boutin V., Maurizot J.C., Monsigny M. Membrane Permeabilization and Efficient Gene Transfer by a Peptide Containing Several Histidines. *Bioconjug. Chem.*, 1998, 9(2), 260–267.  
<https://doi.org/10.1021/bc9701611>
  113. Cho Y.W., Kim J.-D., Park K. Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2010, 55(6), 721–734.  
<https://doi.org/10.1211/002235703765951311>
  114. Shai Y. Mechanism of the Binding, Insertion and Destabilization of Phospholipid Bilayer Membranes by Alpha-Helical Antimicrobial and Cell Non-Selective Membrane-Lytic Peptides. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999, 1462(1–2), 55–70.  
[https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00200-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00200-x)
  115. Geraldo M.T., Takeda A.A.S., Braz A.S.K., Lemke N. Bending-twisting motions and Main interactions in Nucleoplasmin nuclear import. *PLoS one*, 2016, 11(6), e0157162.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157162>
  116. Lyu L., Huang L.Q., Huang T., Xiang W., Yuan J.D., Zhang C.H. Cell-penetrating peptide conjugates of gambogic acid enhance the antitumor effect on human bladder cancer EJ cells through ROS-mediated apoptosis. *Drug Des Devel Ther.*, 2018, 12, 743–756.  
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S161821>
  117. Petitclerc E., Boutaud A., Prestayko A., Xu J., Sado Y., Ninomiya Y., Brooks P.C. New functions for non-col-  
 lagenous domains of human collagen type IV: Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(11), 8051–8061.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.8051>
  118. Zhou X., Chen L., Nie W., Wang W., Qin M., Mo X., He C. Dual-responsive mesoporous silica nanoparticles mediated codelivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA for targeted treatment of breast cancer. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2016, 120(39), 22375–22387.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b06759>
  119. Hovakimyan A., Chilingaryan G., King O., Capocchi J.K., Chadarevian J.P., Davtyan H., Ghochikyan A. mRNA vaccine for Alzheimer's disease: Pilot study. *Vaccines*, 2024, 12(6), 659.  
<https://doi.org/10.3390/vaccines12060659>
  120. Malhotra M., Tomaro-Duchesneau C., Prakash S. Synthesis of TAT peptide-tagged PEGylated chitosan nanoparticles for siRNA delivery targeting neurodegenerative diseases. *Biomaterials*, 2013, 34(4), 1270–1280.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.013>
  121. Wang Q., Cheng S., Qin F., Fu A., Fu C. Application progress of RVG peptides to facilitate the delivery of therapeutic agents into the central nervous system. *RSC advances*, 2021, 11(15), 8505–8515.  
<https://doi.org/10.1039/D1RA00550B>
  122. Sun X., Chen Y., Zhao H., Qiao G., Liu M., Zhang C., Cui D., Ma L. Dual-modified cationic liposomes loaded with paclitaxel and survivin siRNA for targeted imaging and therapy of cancer stem cells in brain glioma. *Drug Deliv.*, 2018, 25, 1718–1727.  
<https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1494225>

## Non-Viral Methods of Delivery of Genetic Constructs

A. V. Ilina<sup>a, b, #</sup>, N. V. Krylova<sup>a</sup>, Haya Al-Hilal<sup>a</sup>, R. G. Sakhabeev<sup>b</sup>, and D. O. Vinokhodov<sup>b</sup>

<sup>a</sup>St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

<sup>b</sup>St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, 190013 Russia

<sup>#</sup>e-mail: i.arina.ilina@mail.ru

**Abstract**—Gene therapy (GT) is a new direction in medicine that uses nucleic acids (NC) as a therapeutic agent. GT can be used in the treatment of both hereditary diseases (spinal muscular atrophy, Duchenne myodystrophy) and diseases of mixed etiology (cancer, cardiovascular diseases, neurodegenerative) and acquired (for example, infectious) diseases. The main strategies of GT include gene replacement therapy, effects on gene expression, and suicidal gene therapy. There are a number of difficulties in the delivery of therapeutic NK, since free NK molecules are not stable and cannot independently penetrate into target cells. The development of safe and effective delivery methods is one of the key tasks of GT. Virus-based delivery systems are the most common due to their high efficiency, but they have a number of undesirable effects, which limits their use. The purpose of this article is to review alternative ways of delivering genetic constructs: using natural and artificial polymers, liposomes, peptides.

**Keywords:** gene therapy, targeted delivery systems, peptide carriers, splicing modifiers, gene replacement therapy, suicide therapy