

НАТУРАЛЬНЫЕ И ИСКУССТВЕННЫЕ ПОЛИМЕРЫ НЕЛИПИДНОЙ ПРИРОДЫ В ГЕННОМ ПЕРЕНОСЕ

Е.В. Богданенко¹, Р.И. Жданов^{2,3}

¹ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³ Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия

The natural and synthetic polymers of the non-lipid origin in gene delivery

E.V. Bogdanenko¹, R.I. Zhdanov^{2,3}

¹ Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

³ Moscow Pedagogical State University, Moscow, Russia

Для эффективной трансфекции эукариотических клеток комплексам невирусных переносчиков генов и плазмид необходимо преодолеть ряд препятствий, чтобы генная конструкция могла попасть в ядро клетки и функционировать там долго и успешно. Химическая структура вектора имеет ключевое значение для направленного транспорта комплексов в нужный орган. В настоящее время для генного переноса наряду с липидными векторами все шире применяют полимеры нелипидной природы. В обзоре освещаются преимущества и недостатки нескольких классов этих менее используемых векторов в зависимости от их модификации, соотношения с ДНК и способа переноса генов. Делается вывод о том, что значительного прогресса в получении эффективного и безопасного вектора для невирусной генной терапии человека пока не наблюдается, несмотря на создание все новых вариантов переносчиков генов и новых типов плазмид.

Ключевые слова: трансфекция, вектор, направленный генный перенос, полимеры нелипидной природы, генная терапия, хитозан, полиэтиленмин, полиэтиленгликоль, полиуретан.

Введение

Перенос в клетки генетических конструкций с целью исправления дефектов в геноме или лечения приобретенных заболеваний является сутью генной терапии. Невирусные системы доставки таких конструкций являются безопасной альтернативой вирусных, так как не вызывают иммунной реакции на повторные введения и их применение не может привести к инсерционному мутагенезу. Однако для успешной трансфекции эукариотических клеток с помощью невирусных векторов должна быть учтена их способность в комплексе с ДНК защищать ее при транспорте в организме и в цитоплазме клетки от нуклеаз и нежелательного связывания с другими макромолекулами, при котором может происходить утилизация ДНК до того, как станет возможной ее экспрессия. Вектор должен достаточно хорошо связываться с ДНК и в комплексе с ней проникать через мембрану клетки, после чего комплекс должен быть способным в определенных условиях диссоциировать до исходных компонентов. Биодegradация переносчика и малый размер его комплексов с ДНК (до 100 нм в диаметре) необходимы для большей эффективности трансфекции при переносе генов *in vivo*. Решающее значение для трансфекции также имеют химическая структура вектора, его способность «опознавать» клетки, нуждающиеся в терапии, и длительность функционирования плазмиды в ядре. Для доставки плазмидной ДНК в основном используют катионные векторы липидной природы, формируя липoplexes. Наиболее известны из них коммерче-

For effective transfection of the eukaryotic cells with the complexes of non-viral gene carriers and plasmids it is necessary to run a number of obstacles so as a gene construction could enter a cellular nucleus and function there successfully and long. Chemical structure of a vector has the crucial importance for the targeted complex delivery to the desired organ. At present polymers of the non-lipid origin are more and more used for gene delivery along with the lipid vectors. In the review advantages and imperfections of some classes of these less used vectors are elucidated depending on their modifications and ratio to DNA and route of the delivery. We concluded that the significant advance in a task of obtaining the effective and safe vector for the human non-viral gene delivery has not been observed yet in spite of designing more and more novel variants of the gene carriers and the new kinds of the plasmids.

Keywords: transfection, vector, targeted gene delivery, polymers of the non-lipid origin, gene therapy, chitosan, polyethylenimine, polyethylene glycol, polyurethane.

ские препараты DOPE, DOTMA, DOTAP, Липофектин, Липофектамин и др. Реже применяют полимеры нелипидной природы, в частности, полиэтиленгликоль, хитозаны и полиэтиленимины. Целью обзора было осветить преимущества и недостатки нескольких классов этих менее используемых векторов в зависимости от их модификации, соотношения с ДНК и способа переноса генов.

Адресная доставка генов с помощью нелипидных векторов различного происхождения

Полимеры, используемые в качестве векторов, по происхождению условно можно разделить на натуральные (получаемые специальной обработкой природных веществ) и искусственные. Из первых нами рассматриваются аминокислоты и белки и получаемые специальной обработкой природного хитина сложные углеводы хитозаны, из вторых — не имеющие природных предшественников полиэтиленгликоль, полиэтиленимины, полиамины, пропиленимины, полиуретан. Все эти вещества были выбраны для обзора как наиболее часто используемые в работах по генному переносу.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ)

ПЭГ широко используется в генном переносе. Посредством конфокальной лазерной сканирующей микроскопии установлено, что мицеллы, состоящие из ПЭГ и ДНК, имеют плотные оболочки из ПЭГ, не формируют агрегаты в кровяном русле и не взаимодействуют с кровяными пластинками во время цирку-

ляции [1]. Покрытие ПЭГом поверхностей катионных липосом уменьшает их нежелательное взаимодействие с внеклеточной средой, защищая комплексы ДНК/липосомы от преждевременного разрушения. Такое же покрытие ПЭГом снижает уровень апоптоза и генерацию активных форм кислорода в культивируемых макрофагоподобных клетках при их ассоциации с катионными липосомами [2].

ПЭГ-конъюгированные сополимеры имеют низкую цитотоксичность *in vitro* и *in vivo*. ПЭГ увеличивает растворимость в воде комплексов полимер/ДНК, уменьшает взаимодействие этих комплексов с белками плазмы и увеличивает время их циркуляции в организме. Он может использоваться как спейсер между лигандом для направленной доставки гена и катионным полимером. Лиганд на конце цепи ПЭГ не нарушает взаимодействия катионного полимера с плазмидной ДНК, а ПЭГ как спейсер увеличивает доступ лиганда к его рецептору [3], тем самым делая возможным направленный перенос благодаря специфическому взаимодействию с клетками-мишенями. Так, при трансфицировании опухолей *in vivo* системными введениями комплексов из ПЭГилированного липида с фолиевой кислотой на дистальном конце молекулы удалось добиться уменьшения переноса гена в легкие, т.е. «эффекта первого прохода», в 50–100 раз, при этом активность переносимого таким липидом гена в опухоли становится устойчивой [4]. Поверхностно-ПЭГилированные полиплексы, сформированные самосборкой β -циклодекстрина с адамантан-ПЭГ конъюгатами, остаются стабильными в условиях физиологических концентраций солей, в то время как немодифицированные быстро агрегируют и осаждаются. Адамантан-ПЭГилированные конъюгаты при их галактозилировании способны селективно связываться с гепатоцитами посредством асиалогликопротеиновых рецепторов клеток [5]. Модифицированные ПЭГом желатиновые наночастицы имеют благоприятный для переноса *in vitro* размер около 200 нм, хорошо проникают в клетки посредством неспецифического эндоцитоза и последующего везикулярного транспорта в цитозоль [6]. С помощью плазмидной ДНК, инкапсулированной внутри рецептор-специфических ПЭГилированных иммунолипосом, и простой внутривенной инъекции крысам оказалось возможным достигнуть нокдауна 90% экспрессии генов, специфичных для опухолей мозга [7].

При всех своих достоинствах ПЭГилирование вредит внутриклеточному переносу нуклеиновых кислот. Поэтому последовательное удаление покрытия из ПЭГ после достижения клеток-мишеней сделало бы перенос генов более эффективным. Спускным механизмом в этом могли бы быть изменения в pH, концентрации ферментов или редокс-потенциала [8].

Хитозаны

Хотя есть сведения, что поликатионный линейный полимер природного происхождения хитозан имеет такое неустраняемое свойство, как индуцирование гиперхолестеринемии, что может сделать его непригодным для использования в генной терапии человека [9], проводится много исследований его способности доставлять гены. Хитозан является нетоксичным полисахаридом, биodeградируемым и биосовместимым [10] и дестабилизатором мембран, что позволяет веществам, связанным с ним,

проникать внутрь клетки облегченным способом. Он может повреждать липидный бислой, и, похоже, что наблюдается прямая зависимость этого процесса от концентрации хитозана [11].

Системы переноса генов в виде наносфер, которые образует хитозан, имеют ряд преимуществ. В наносферы могут быть введены лизосомолитические агенты для уменьшения деградации ДНК в эндосомальных и лизосомальных компартментах; с ними можно конъюгировать лиганды для достижения рецептор-опосредованного эндоцитоза. В наносферы можно одновременно инкапсулировать другие биологически активные агенты или плазмиды; их можно лиофилизировать для хранения без потери ими биологической активности [12].

Наночастицы из хитозана и ДНК могут иметь по разным данным диаметр 50, 100, 141–283 нм с равномерным распределением в них плазмидной ДНК. Комплексы хитозана с siRNA (малой интерференционной РНК, имеющей большой потенциал для применения с целью заставить «замолчать» патологические гены или гены устойчивости к лекарственным препаратам) имеют похожий диаметр — 68–129 нм. Наночастицы хитозан/ДНК *in vitro* оказались в 2 раза менее токсичными, чем липоплексы с коммерческим катионным препаратом Липофектамин и давали уровень экспрессии репортерного гена в 10 раз больший, чем комплексы с ПЭИ. Более высокая степень деацетилирования, большие молекулярная масса хитозана и соотношение N:P дали большую эффективность трансфекции [13–15].

При исследовании механизма трансфекции оказалось, что комплексы плазмиды/хитозан, вероятно, конденсируются в большие агрегаты (5–8 мкм), которые абсорбируются на поверхности клетки. Затем они поглощаются клеткой вследствие эндоцитоза и, возможно, высвобождаются из эндосом вследствие их разрушения, вызванного набуханием лизосомальных комплексов в дополнение к набуханию плазмидно-хитозанового комплекса. Комплексы плазмиды/хитозан способны проникать в ядро и аккумулироваться в нем, что было показано с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа [16–18].

Хитозаны, у которых свыше 2–3 мономеров несут первичную аминогруппу, формируют стабильные коллоидные полиплексы с плазмидной ДНК. Они защищают такую ДНК от деградации в сыворотке. При исследовании фракций высокоочищенного хитозана различной молекулярной массы *in vitro* все они не вызывали гемолиза; их цитотоксичность при повышении дозы при трансфекции клеток не увеличивалась [12, 17, 19, 20].

Однако высокомолекулярный сверхчистый хитозан оказался намного эффективнее для трансфекции, чем низкомолекулярный. При увеличении длины хитозановой цепи и соотношения зарядов, а также уменьшении pH с 6,5 до 3,5 возрастает фракция комплексов, которые образуют неагрегированные глобулярные структуры [21]. Уровень трансфекции комплексами с хитозаном не ниже, чем при использовании комплексов плазмиды/Липофектин, когда молекулярная масса хитозана составляет 40–84 кДа, соотношение азота хитозана к фосфату ДНК равно 5, а трансфекционная среда содержит 10% сыворотки при pH 7,0 [18].

Хитозан легко выделяется с мочой, поэтому нет проблем с его накоплением в организме. С другой

стороны, этот полимер не способен надолго задерживаться в организме, что может быть необходимым для трансфицирования большого количества клеток *in vivo* [22]. Способы введения плазмидно-хитозанового комплекса при этом могут быть разными. Так, посредством *внутримышечной инъекции* удалось перенести сразу две плазмиды — β -галактозидазы и люциферазы — в организм мышей. При этом эффективность включения плазмид в микросферы достигала 90%, а высокий уровень экспрессируемого белка наблюдался в течение 12 недель [23]. При введении мышам BALB/c *внутримышечно* наносфер с геном β -галактозидазы экспрессия оказалась выше и устойчивей, чем после использования Липофектамина, хотя наносферы были очень крупными — 200–750 нм. Вероятно, это говорит о сильной степени защищенности ДНК в таких наносферах [12]. Посредством *гидродинамической внутривенной инъекции* крысам с артритом в подкожную вену задней лапы вводили ген красного флуоресцентного белка (RFP) в комплексе с конъюгатом хитозан/полиэтиленгликоль(ПЭГ)/фолат. Экспрессия гена RFP наблюдалась вблизи места инъекции и была в 5–12 раз выше, чем в других местах. Интересно, что при обычной *инъекции в бедренную вену* экспрессия была выше в печени, чем в других органах [24]. При введении *в хвостовую вену* мышам комплексов с хитозаном с 10–50 мономерами в цепи наблюдался значительный уровень экспрессия люциферазы в легких (2756 ± 710 пг тотального легочного белка) [25]. После *интратрахеального введения* полиплексов с хитозаном были способны распределиться до средних бронхов и давать экспрессию трансгена фактически в каждой эпителиальной клетке [26]. Однако при введениях в легкие высокомолекулярный хитозан имеет такие недостатки, как агрегация, низкая растворимость при нейтральных pH, высокая вязкость в концентрациях, необходимых для переноса *in vivo*, медленная диссоциация и высвобождение плазмидной ДНК. При этом олигомеры хитозана с 10–50 мономерами в цепи и диапазоном полидисперсности от 1,01 до 1,09 в комплексе с плазмидной ДНК давали более высокий уровень (в 120–260 раз выше) экспрессии гена люциферазы *in vivo* после введения в легкие, чем высокомолекулярный хитозан [25].

Изучение биораспределения хитозанов проводилось для понимания, способен ли он направленно доставлять терапевтические гены в нужные органы. Фракции высокоочищенных ^{125}I -меченых хитозанов молекулярной массой $<5000 \text{ Da}$ (N1), $5000\text{--}10\,000 \text{ Da}$ (N2) и $>10000 \text{ Da}$ (N3) вводили крысам *внутривенно*. Все они быстро удалялись из крови, накапливаясь в печени тем больше, чем большую они имели молекулярную массу [17]. В данном случае быстрый уход из кровяного русла можно рассматривать как недостаток, а накопление в печени — как преимущество хитозана по сравнению с другими векторами.

Хитозан модифицируют химическими группировками или частицами, защищающими комплексы ДНК от преждевременного разрушения, усиливающими направленность генного переноса и уровень экспрессии переносимого гена. Так, модифицированный аргинином хитозан, конъюгированный с ПЭИ, оказался способным хорошо связываться с ДНК и формировать комплексы размером около 170 нм [27]. Комплексы, полученные при присоединении высоко-

очищенного хитозана низкой молекулярной массы посредством коацервации к лактобионовой кислоте, несущей галактозную группу, продемонстрировали очень высокую избирательность в отношении гепатоцитов [20, 28]. Конъюгат фолиевой кислоты и хитозана с остатком стеариновой кислоты в линии клеток с большей экспрессией рецепторов фолата (SKOV3) давал более высокий уровень экспрессии модельного гена, что связывают с проявлением рецептор-опосредованного эндоцитоза [29]. Хитозан, модифицированный пептидом из 9 остатков аргинина и связанный с ним спейсером из 10 остатков глицина, оказался намного эффективнее в генном переносе, чем немодифицированный, причем не только *in vitro*, но и *in vivo* [30]. Преципитацией хитозана с тиминном и магнитными частицами были получены частицы, которые усиливали экспрессию гена-супрессора опухоли *in vitro* [31].

Этот перечень можно продолжать еще очень долго, но очевидно, что хитозан способен быть альтернативой катионных липидов. Таким образом, хитозан должен исследоваться и дальше как возможный переносчик генов, в том числе для генной терапии печени [26].

Аминокислоты и белки

Некоторые весьма маленькие, относительно нетоксичные пептиды способны проходить через клеточную мембрану. Они называются CPPs (cell-penetrating peptides). CPPs способны переносить с собой множество различных терапевтических веществ, включая плазмидную ДНК. Хотя механизм этого явления до конца не понятен, похоже, что он зависит от типа пептида, его концентрации, переносимого груза и типа клеток, в которые переносится груз [32]. Катионные CPPs представляют собой группу таких аминокислот, как аргинин или лизин, белок ТАТ вируса ВИЧ, пенетратин, P22N, октааргинин. Амфипатические CPPs содержат последовательно гидрофобные и гидрофильные домены, что является решающим для их способности к перемещению. К ним относятся транспортан, MAP, CADY и др. Гидрофобные CPPs имеют низкий суммарный заряд и исходно содержат неполярные аминокислоты, например, MPG-пептиды, фактор роста фибробластов Капоши (K-FGF), C105Y, pVEC [33]. Основываясь на том факте, что у многих клеточных раковых линий наблюдается сверхэкспрессия рецепторов к некоторым ростовым факторам, была создана система для переноса генов, содержащая лиганд из 16 аминокислот, специфически связывающийся с рецептором фактора роста (EGF-R). При обкалывании комплексами с этой системой гепатом, выращенных подкожно на мышах, и при культивировании клеток этой опухоли с такими комплексами наблюдался высокий уровень трансфекции переносимого гена. [34, 35]. Также создан пептидный вектор (cRGD-hK), который имеет 36 аминокислотных остатков CRGDCF(K(H)-KKK)6, содержит адресный опухолевый RGD мотив, связывающийся с ДНК олиголизин и остатки гистидина для облегчения прохода в цитозоль. Спустя 48 ч. после инъекции мышам nude с подкожно привитыми опухолями комплексов cRGD-hK с геном люциферазы активность гена в опухолевых тканях была значительно выше, чем в легких, почках и селезенке [36].

При переносе ДНК часто используются полипептиды, в том числе модифицированные различными лигандами. Например, полилизин при степени поли-

меризации 19–150 и модифицировании биотиновыми группами в комплексе с плазмидной ДНК оказался эффективным при трансфекции клеток линий HEK293T и NIH/3T3 [37]. Поли-L-лизин был маннозилирован и успешно использован для достижения рецептор-опосредованного тканеспецифичного переноса генов в печень при трансфекции *in vivo* посредством внутривенных инъекций [38]. Галактозилированный поли-L-лизин в комплексе с плазмидой *in vivo* транспортировался в ядра гепатоцитов, где она существовала в виде эписомоподобной структуры в течение по меньшей мере недели [39].

Обнаружено длительное циркулирование в крови мышей комплексов из поли-L-лизина и плазмидной ДНК после хвостовой инъекции таких комплексов. Уже через 1 ч. после введения мышам с опухолями эти комплексы обнаруживались в опухолевой ткани [40]. Фланкирование остова из последовательностей аргинина концевыми амино- и карбоксигруппами цистеина давало вектор, эффективный при трансфекции *in vitro*, а обогащение аргинина остатками глицина и гистидина — значительное повышение ее уровня. Эти же пептиды обеспечивали повышенную трансфекцию как в мышинных, так и в человеческих тканях *in vivo* [41]. Пептиды, содержащие различное количество остатков гистидина, успешно трансфицировали клетки различных линий, причем эффективность трансфекции зависела от количества и положения остатков, а также pH [42]. Из окта-D-аргинина и тетра-L-гистидина, сшитых поперечными дисульфидными мостиками, был получен химерный полипептид для доставки терапевтического гена в опухолевые клетки [43].

Сульфгидрильные пептиды с поперечными связями (sulfhydryl cross-linking peptides), связанные с N-гликаном или ПЭГом, в комплексе с ^{125}I -ДНК вводились внутривенно мышам. Наибольшее накопление метки в печени, т.е. направленный перенос, наблюдалось при использовании смеси из 10 mol % трехантенного гликопептида, 5 mol % ПЭГ/пептид и 85 mol % основного пептида [44]. Комплексы из транспортного TP10 и плазмиды оказались эффективными и нетоксичными *in vitro* и *in vivo*, а при внутримышечном и внутрикожном введениях — неиммуногенными [45].

Рекомбинантный протеин шелка, содержащий поли-L-лизин и tumor-homing пептиды (THPs), усиливал эффективность переноса плазмидной ДНК в раковые клетки молочной железы [46]. Рекомбинантный гистонотипный белок HPhA из *Pyrococcus horikoshii* продемонстрировал исключительную стабильность и способность к упаковыванию ДНК. Его цитотоксичность оказалась ниже, а трансфекция ряда линий клеток комплексами HPhA/ДНК эффективнее и воспроизводимее, чем у систем с катионными липосомами [47]. С помощью гистонотипного модифицированного белка пшеницы H4TL был осуществлен перенос гена апоптоина в клетки карциномы яичника человека линии HO8910, что привело к уменьшению их роста и потере их митохондриями мембранного потенциала [48].

Производные белка p53 опознают на поверхности раковых клеток специфический белок HDM-2, не экспрессирующийся на неделящихся клетках. С помощью трех плазмид, экспрессирующих терапевтические антисмысловые РНК, была продемонстрирована эффективность этих новых переносчиков [49].

Таким образом, пептидные системы переноса могут быть привлекательной альтернативой другим типам векторов, хотя их относительная неустойчивость к протеолизу может быть главной проблемой в реализации их потенциального применения в биомедицине.

Полиэтиленимины

Полиэтиленимин (ПЭИ) является поликатионом. Исследования показали, что ПЭИ не обладает сколько-нибудь заметной цитотоксичностью, генотоксичностью или мутагенностью [50, 51]. Во многих работах сравнивают эффективность трансфекции при использовании хитозанов и ПЭИ. Полиплексы с ПЭИ дают более быстрое начало экспрессии, чем полиплексы с хитозаном, что объясняется более быстрым выходом полиплексов с ПЭИ из эндосом. При введении в хвостовую вену мышам комплексов с ПЭИ экспрессия люциферазы в легких оказалась выше уровня экспрессии при использовании олигомеров хитозана с 10–50 мономерами в цепи [19, 25]. При этом кополимер ПЭИ и хитозана оказался в десятки раз трансфекционно активнее *in vitro*, чем чистые ПЭИ и хитозан. Его цитотоксичность была близка к этому показателю у хитозана и намного ниже, чем у ПЭИ [52].

Для трансфекции эффективнее модифицировать ПЭИ различными классами веществ, например, стеариновой кислотой, формируя мицеллы, гидрофобное ядро которых может служить для загрузки гидрофобных лекарств [53]. В комплексе с ПЭИ и полилизинотом компактизованная ДНК может транспортироваться не только в цитоплазму, но и в ядро неделящейся клетки [53]. В ПЭИлированных ПЭИ короткие боковые цепи ПЭГ стабилизируют комплексы полимер/ДНК [54]. Комплексы ПЭИ/ДНК, защищенные ковалентно связанным с ними ПЭГом и содержащие фактор роста эпидермиса (EGF) в качестве лиганда, оказались эффективными при трансфицировании клеток человеческой гепатокарциномы (HCC) [55]. Линейные и разветвленные полиэтиленимины (IPEI и bPEI) в комплексе с бета-циклодекстрином, введенные в хвостовую вену вместе с плазмидой, позволили ей аккумулироваться и экспрессироваться в печени [56]. Покрытие частиц ДНК сначала ПЭИ, а потом полиуретаном приводило к значительному повышению эффективности трансфекции по сравнению с использованием чистого ПЭИ [57]. Разветвленные полиэтиленимины, модифицированные ретроинверсопептидом D-SP5, хорошо конденсировались с ДНК терапевтического гена, *in vitro* защищали ее от деградации и доставляли в клетки желудочной аденокарциномы. После этого часть раковых клеток погибала вследствие апоптоза [58].

Полиэтиленимином можно модифицировать другие вещества. Так, из углеродных нанотрубочек были получены наноленты с пришитым к ним ПЭИ. Такой вектор способен защитить ДНК от различных неблагоприятных воздействий лучше, чем чистый ПЭИ, и быть лучше него благодаря большей площади поверхности нанолент и высокой плотности зарядов ПЭИ одновременно [59]. Модификация посредством ацетонида триамцинолона ПЭИ 1800 и холестерина была проведена с [(2-лактоиламидо)этиламино]муравьиной (лактобионовой) кислотой [(2-lactoylamido)ethylamino]formic acid). Диаметр полученных из этого конъюгата липосом составлял около 100 нм. При использовании *in vivo* они дали

лучшую экспрессию трансгена в печени у мышей, чем другие векторы [60]. Для генного переноса *in vivo* использовали поли-L-глутаминовую кислоту с пришитыми к ней гистонами и ПЭИ низкой молекулярной массы (800 Da). Удалось получить экспрессию гена GFP у дрозофилы [61]. При ковалентном связывании ПЭИ и катионного пептида мелиттина образовывались конъюгаты, конденсировавшие ДНК в маленькие дискретные частицы (<100 нм в диаметре). По сравнению с комплексами из ПЭИ такие комплексы оказались намного более трансфекционно способными [62]. Соединяемое с различными количествами линейного ПЭИ хлоргидриновое производное хитозана показало лучшую эффективность трансфекции репортерного гена, чем чистые хитозан, ПЭИ и Липофектамин *in vitro* [63].

Полиэтиленимин успешно применялся в опытах по переносу генов для лечения опухолей. Снижалось количество и размеры метастазов в легких мышей с привитой остеосаркомой (OS) после интраназального введения им комплекса из ПЭИ и гена интерлейкина-12 [64]. При внутривенном введении мышам с ксенографтами НСС комплексов с ПЭИ экспрессия гена люциферазы наблюдалась в основном в опухоли, а не в печени животных (разница в 2 порядка) [55]. Такое же введение мышам с опухолями комплексов siRNA с ПЭИ привело к специфическому ингибированию как ангиогенеза, так и роста опухоли. ПЭИ с меньшей длиной цепи оказался менее цитотоксичным [65]. Для переноса siRNA в клетки рака простаты использовались гибридные переносчики из полиэтиленимина и твердых жирных кислот [66], в клетки рака молочной железы MCF-7 — самособирающиеся наночастицы из ПЭГилированного ПЭИ с Arg-Gly-Asp (RGD) пептидным лигандом, присоединенным к дистальному кольцу полиэтиленгликоля [67]. Клетки линии 4T1 и ксенографты, экспрессировавшие люциферазу, показали значительное снижение уровня ее экспрессии при их культивировании в среде с комплексами из siRNA и наночастиц, имевших оболочку из алкилированного ПЭИ с молекулярной массой 2000 kDa и сердцевину из оксида железа, (Alkyl-PEI2k-IO) [68]. Модификации ПЭИ могут быть перспективными в качестве переносчиков генов для лечения цереброваскулярных [51] и легочных заболеваний [69].

ПЭИ усиливает перенос и устойчивость плазмидной ДНК в органах *in vivo*, однако для безопасности требуется соблюдать временные интервалы в его использовании, например, у мышей — не чаще раза в неделю [70]. При интраназальном введении комплексов с лактозилированным ПЭИ мышам они диссоциировали на исходные компоненты, но плазмиды в основном локализовывались в лизосомах, а лак-ПЭИ — в ядре. Этот результат показывает необходимость создания плазмиды, способной самостоятельно преодолевать ядерный барьер для дальнейшего продвижения в экспериментах *in vivo* [71].

Полиамины, полипропиленимины

Полиамидаминовые дендримеры (РАМАМ) менее токсичны, чем полиэтиленимид и полилизин, и способны формировать комплексы с плазмидами от 100–300 до 600 нм в диаметре в зависимости от строения [72]. Гибридный дендример, содержащий ветви из РАМАМ на поверхности и жесткую сердцевину из полифениленвинилена, формировал дендриплексы, способные в комплексе с ДНК прони-

кать в более чем 90% нервных клеток в культуре, не выказывая какой-либо токсичности [73]. РАМАМ, конъюгированные с ПЭГ, лактозой и циклодекстрином, имеют высокую трансфекционную активность в отношении клеток НерG2, экспрессирующих асиалогликопротеиновый рецептор, т.е. являются селективными переносчиками генов в гепатоциты [74]. Сверхразветвленные полиамидаамины (HPAAs), содержащие различные количества ОI-циклодекстрина (OI-CD), также давали хорошую эффективность трансфекции *in vitro* [75].

Создан вектор на основе дендримеров полипропиленимины (ППИ), который вводился в комплексе с геном фактора альфа некроза опухоли (TNFalpha) внутривенно мышам и оказался эффективным при экспериментальном лечении эпидермоидной карциномы A431, карциномы шейки матки C33a и карциномы прямой кишки LS174T [76]. Модифицированные разветвленными олигоэтилениминами ППИ демонстрировали повышенную стабильность образованных из них коллоидных частиц, образовывали компактные полиплексы с ДНК (100–200 нм) и не вызывали агрегации эритроцитов. При внутривенном введении комплексов с этими веществами мышам с опухолями трансген обнаруживался в основном в подкожных опухолях [77].

ППИ-дендримеры, оказавшиеся эффективными при переносе *in vivo* репортерного гена у мышей, формировали частицы размером от 33 до 286 нм в зависимости от концентрации ДНК [78]. Они оказались способными образовывать стабильные коллоидные частицы и при внутривенном введении доставлять репортерный ген в печень, а не в легкие [79].

Полиуретан

Полиуретан для переноса генов модифицируют, присоединяя всевозможные группы и лиганды. Так, катионный полимер N,N-диэтилэтилендиамин-полиуретан (DEDA-PU), содержащий третичные амины в основной и боковых цепях, и сложный полиуретановый эфир на основе лизина PMMD (lysine-based poly(urethane-co-ester)) образовывали комплексы с ДНК около 100 нм в диаметре и *in vitro* оказались весьма эффективными, мало цитотоксичными и биodeградирующими [80, 81], так же, как 2-диэтилэтиламиноэтиламин-полиуретан, содержащий сегменты ПЭГ и третичные аминогруппы [82]. Полиуретан, содержащий катионную аммониевую группу, вследствие низкой токсичности для нормальных клеток и высокой трансфекционной активности на уровне коммерческого препарата для трансфекции Polyfect на раковых клетках рассматривается как перспективный препарат для направленной генной терапии рака [83].

Линейный полиуретан, получивший дисульфидные связи и протонированные третичные аминогруппы в результате реакции поликонденсации (PUBAP), был конъюгирован с фолат-ПЭГом и дексихолевой кислотой. После внутривенного введения комплексов PUBAP с плазмидой, кодирующей TNF-зависимый апопто-индуцирующий лиганд (TNF-related apoptosis-inducing ligand) у голых (nude) мышей Balb/c значительно ингибировался рост ксенографтов SKOV-3 [84].

Мишенью микроРНК, высококонсервативных малых молекул, могут быть онкогены. Перенос микроРНК miR145 посредством ПЭИ с короткими ветвями из полиуретана (PU-PEI) *in vivo* уменьшал

у мышей с ксенографтами легочной аденокарциномы и глиобластомы рост опухолей и метастазирование, увеличивал чувствительность к химио- и радиотерапии и продолжительность жизни животных. Такой же перенос *in vitro* miR145 в клетки глиобластомы эффективно подавлял в них экспрессию генов резистентности к лекарственным препаратам и антиапоптотических генов [85, 86].

Заключение

Кроме описанных в обзоре, в мире используется еще целый ряд нелипидных невирусных переносчиков генов, например, циклодекстрины, желатин, декстран-спермин, олигоэтиленмин, полиэтиленимид и т.д. Однако успех идеи «лечения причины», например, лечения моногенных заболеваний, остается минимальным. Изменение в генетической конституции, которое является причиной клеточного дефекта, одновременно приводит к включению ряда компенсаторных механизмов. Простое добавление «здорового» гена автоматически не создает нормальную ситуацию, поскольку компенсаторные реакции не обязательно удастся повернуть вспять. Кроме того, недостаточно изучены механизмы входа комплексов с ДНК в клетку, их последующего высвобождения из эндосом и проникновения комплексов в ядро. Возможно, плазмидная ДНК неспособна эффективно преодолевать ядерную мембрану [71].

В последнее время обсуждается возможность переноса такими векторами в целях генной терапии

системы коротких палиндромных повторов — CRISPR/Cas9, использующей сиквенс-специфические нуклеазы, происходящие из иммунной системы бактерий. Эти нуклеазы индуцируют разрывы двойной спирали ДНК в определенных местах, что позволяет получать генетически модифицированных животных, включая мышей. Однако обычно для такого переноса ДНК необходимы микроинъекции в эмбрион, хотя в последнее время начали использовать электропорацию и вирусные векторы. При этом электропорация более применима *in vitro*, а вирусные векторы, используемые *in vivo*, имеют ограничения по размеру переносимой ДНК, могут вызвать инсерционный мутагенез и иммунный ответ [87].

При трансфекции *in vivo* посредством невирусных векторов и CRISPR/Cas9 встраивание терапевтического гена будет необратимым и может происходить в разных тканях, включая ткани половых желез, поэтому наиболее приемлемым представляется изъятие клеток нужной ткани, трансфицирование их *in vitro* и подсадка назад, в организм хозяина. Таким способом хотя бы частично может быть решена проблема лечения моногенных наследственных заболеваний.

Однако следует констатировать, что, несмотря на создание все новых вариантов переносчиков генов и новых типов плазмид, значительного прогресса в получении эффективного и безопасного вектора для невирусной генной терапии человека пока не наблюдается, и направленная доставка генов для лечения недоступных опухолей невирусными векторами — это дело будущего.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Nomoto T., Matsumoto Y., Miyata K. et al. In situ quantitative monitoring of polyplexes and polyplex micelles in the blood circulation using intravital real-time confocal laser scanning microscopy. *J. Control. Release* 2011; 151(2): 104-9.
2. Takano S., Aramaki Y., Tsuchiya S. Physicochemical properties of liposomes affecting apoptosis induced by cationic liposomes in macrophages. *Pharm. Res.* 2003; 20(7): 962-68.
3. Lee M., Kim S.W. Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery. *Pharm. Res.* 2005; 22(1): 1-10.
4. Hofland H.E., Masson C., Iginla S. et al. Folate-targeted gene transfer *in vivo*. *Mol. Ther.* 2002; 5(6): 739-44.
5. Pun S.H., Davis M.E. Development of a nonviral gene delivery vehicle for systemic application. *Bioconjug. Chem.* 2002; 13(3): 630-9.
6. Kaul G., Amiji M. Cellular interactions and *in vitro* DNA transfection studies with poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 2005; 94(1): 184-98.
7. Pardridge W.M. Intravenous, non-viral RNAi gene therapy of brain cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2004; 4(7): 1103-13.
8. Meyer M., Wagner E. pH-responsive shielding of non-viral gene vectors. *Expert Opin. Drug. Deliv.* 2006; 3(5): 563-71.
9. Lehoux J.G., Grondin F. Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology* 1993; 132: 1078-84.
10. Mansouri S., Lavigne P., Corsi K. et al. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004; 57(1): 1-8.
11. Yang F., Cui X., Yang X. Interaction of low-molecular-weight chitosan with mimic membrane studied by electrochemical methods and surface plasmon resonance. *Biophys. Chem.* 2002; 99(1): 99-106.
12. Leong K.W., Mao H.Q., Truong-Le V.L. et al. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J. Control. Release* 1998; 53(1-3): 183-93.
13. Corsi K., Chellat F., Yahia L. et al. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials* 2003; 24(7): 1255-64.
14. Erbacher P., Zou S., Bettinger T. et al. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm. Res.* 1998; 15(9): 1332-9.
15. Jean M., Alameh M., De Jesus D. et al. Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of *in vitro* cell lines relevant to type 2 diabetes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012; 45(1-2): 138-49.
16. Кривцов Г.Г., Жданов Р.И. Адресная доставка функциональных генов в генотерапии с помощью углеводсодержащих векторов. *Вопросы медицинской химии* 2000; 46(3): 246-55.
17. Richardson S.C., Kolbe H.V., Duncan R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility,

- body distribution and ability to complex and protect DNA. *Int. J. Pharm.* 1999; 178(2): 231-43.
18. Ishii T., Okahata Y., Sato T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001; 1514(1): 51-64.
19. Koping-Hoggard M., Tubulekas I., Guan H. et al. Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine *in vitro* and after lung administration *in vivo*. *Gene Ther.* 2001; 8(14): 1108-21.
20. Lee M., Nah J.W., Kwon Y. et al. Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharm. Res.* 2001; 18(4): 427-31.
21. Koping-Hoggard M., Mel'nikova Y.S., Varum K.M. et al. Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system *in vitro* and *in vivo*. *J. Gene Med.* 2003; 5(2): 130-41.
22. Onishi H., Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* 1999; 20(2): 175-82.
23. Ozbaz-Turan S., Aral C., Kabasakal L. et al. Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non-viral gene delivery vehicle. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2003; 6(1): 27-32.
24. Shi Q., Wang H., Tran C. et al. Hydrodynamic delivery of chitosan-folate-DNA nanoparticles in rats with adjuvant-induced arthritis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011: 148763.
25. Koping-Hoggard M., Varum K.M., Issa M. et al. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Ther.* 2004; 11(19): 1441-52.
26. Koping-Hoggard M., Tubulekas I., Guan H. et al. Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine *in vitro* and after lung administration *in vivo*. *Gene Ther.* 2001; 8(14): 1108-21.
27. Zhang X., Duan Y., Wang D. et al. Preparation of arginine modified PEI-conjugated chitosan copolymer for DNA delivery. *Carbohydr. Polym.* 2015; 122: 53-9.
28. Gao S., Chen J., Xu X. et al. Galactosylated low molecular weight chitosan as DNA carrier for hepatocyte-targeting. *Int. J. Pharm.* 2003; 255(1-2): 57-68.
29. Du Y., Cai L., Li J. et al. Receptor-mediated gene delivery by folic acid-modified stearic acid-grafted chitosan micelles. *Int. J. Nanomedicine* 2011; 6: 1559-68.
30. Jeong E.J., Choi M., Lee J. et al. The spacer arm length in cell-penetrating peptides influences chitosan/siRNA nanoparticle delivery for pulmonary inflammation treatment. *Nanoscale* 2015; 7(47): 20095-104.
31. Lee M.H., Thomas J.L., Chen J.Z. et al. Activation of tumor suppressor p53 gene expression by magnetic thymine-imprinted chitosan nanoparticles. *Chem. Commun. (Camb.)* 2016; 52(10): 2137-40.

32. Ramsey J.D., Flynn N.H. Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacol. Ther.* 2015; 154: 78-86.
33. Layek B., Lipp L., Singh J. Cell penetrating peptide conjugated chitosan for enhanced delivery of nucleic acid. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(12): 28912-30.
34. Liu X., Tian P., Yu Y. et al. Enhanced antitumor effect of EGF R-targeted p21WAF-1 and GM-CSF gene transfer in the established murine hepatoma by peritumoral injection. *Cancer Gene Ther.* 2002; 9(1): 100-8.
35. Liu X., Tian P.K., Ju D.W. et al. Systemic genetic transfer of p21WAF-1 and GM-CSF utilizing of a novel oligopeptide-based EGF receptor targeting polyplex. *Cancer Gene Ther.* 2003; 10(7): 529-39.
36. Aoki Y., Hosaka S., Kawa S. et al. Potential tumor-targeting peptide vector of histidylated oligolysine conjugated to a tumor-homing RGD motif. *Cancer Gene Ther.* 2001; 8(10): 783-87.
37. Segura T., Shea L.D. Surface-tethered DNA complexes for enhanced gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 2002; 13(3): 621-29.
38. Nishikawa M., Nakano T., Okabe T. et al. Residualizing indium-111-radiolabel for plasmid DNA and its application to tissue distribution study. *Bioconjug. Chem.* 2003; 14(5): 955-61.
39. Dizhe E.B., Akifiev B.N., Missul B.V. et al. Receptor-mediated transfer of DNA-galactosylated poly-L-lysine complexes into mammalian cells in vitro and in vivo. *Biochemistry (Mosc.)* 2001; 66(1): 55-61.
40. Kawano T., Okuda T., Aoyagi H. et al. Long circulation of intravenously administered plasmid DNA delivered with dendritic poly(L-lysine) in the blood flow. *J. Control. Release* 2004; 99(2): 329-37.
41. Siprashvili Z., Scholl F.A., Oliver S.F. et al. Gene transfer via reversible plasmid condensation with cysteine-flanked, internally spaced arginine-rich peptides. *Hum. Gene Ther.* 2003; 14(13): 1225-33.
42. Kichler A., Leborgne C., Marz J. et al. Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *PNAS USA* 2003; 100(4): 1564-68.
43. Wang X., Tai Z., Tian J. et al. Reducible chimeric polypeptide consisting of octa-D-arginine and tetra-L-histidine peptides as an efficient gene delivery vector. *Int. J. Nanomedicine* 2015; 10: 4669-90.
44. Kwok K.Y., Park Y., Yang Y. et al. In vivo gene transfer using sulfhydryl cross-linked PEG-peptide/glycopeptide DNA co-condensates. *J. Pharm. Sci.* 2003; 92(6): 1174-85.
45. Lehto T., Simonson O.E., Mäger I. et al. A peptide-based pector for efficient gene transfer in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* 2011; 19(8): 1457-67.
46. Numata K., Reagan M., Goldstein R.H. et al. Spider silk-based gene carriers for tumor cell-specific delivery. *Bioconjug. Chem.* 2011; 22(8): 1605-10.
47. Weng L., Liu D., Li Y. et al. An archaeal histone-like protein as an efficient DNA carrier in gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1702(2): 209-16.
48. Wang C., Zhang Y. Apoptin gene transfer via modified wheat histone H4 facilitates apoptosis of human ovarian cancer cells. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2011; 26(1): 121-6.
49. Mokhtarzadeh A., Parhiz H., Hashemi M. P53-Derived peptides conjugation to PEI: an approach to producing versatile and highly efficient targeted gene delivery carriers into cancer cells. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2016; 8: 1-15.
50. Beyerle A., Long A.S., White P.A. et al. Poly(ethylene imine) nanocarriers do not induce mutations nor oxidative DNA damage in vitro in MutaMouse FE1 cells. *Mol. Pharm.* 2011; 8(3): 976-81.
51. Chen X., Deng Y. Progress of nanometer vector polyethylenimine applied in gene therapy. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2011; 28(1): 195-8.
52. Chen H., Cui S., Zhao Y. et al. Grafting chitosan with polyethylenimine in an ionic liquid for efficient gene delivery. *PLoS One* 2015; 10(4): e0121817.
53. Huang H.Y., Kuo W.T. et al. Co-delivery of anti-vascular endothelial growth factor siRNA and doxorubicin by multifunctional polymeric micelle for tumor growth suppression. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2011; 97(3): 330-8.
54. Sung S.J., Min S.H., Cho K.Y. et al. Effect of polyethylene glycol on gene delivery of polyethylenimine. *Biol. Pharm. Bull.* 2003; 26(4): 492-500.
55. Wolschek M.F., Thallinger C., Kurska M. et al. Specific systemic nonviral gene delivery to human hepatocellular carcinoma xenografts in SCID mice. *Hepatology* 2002; 36(5): 1106-14.
56. Pun S.H., Belloq N., Liu A. et al. Cyclodextrin-modified polyethylenimine polymers for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 2004; 15(4): 831-40.
57. Cherng J.Y., Hung W.C., Kao H.C. Blending of polyethylenimine with a cationic polyurethane greatly enhances both DNA delivery efficacy and reduces the overall cytotoxicity. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2011; 12(5): 839-46.
58. Li X., Xie Z., Xie C. et al. D-SP5 Peptide-modified highly branched polyethylenimine for gene therapy of gastric adenocarcinoma. *Bioconjug. Chem.* 2015; 26(8): 1494-503.
59. Dong H., Ding L., Yan F. et al. The use of polyethylenimine-grafted graphene nanoribbon for cellular delivery of locked nucleic acid modified molecular beacon for recognition of microRNA. *Biomaterials* 2011; 32(15): 3875-82.
60. Ma K., Shen H., Shen S. et al. Development of a successive targeting liposome with multi-ligand for efficient targeting gene delivery. *J. Gene Med.* 2011; 13(5): 290-301.
61. Deng J., Wen Y., Wang C. et al. Efficient intracellular gene delivery using the formulation composed of poly (L-glutamic acid) grafted polyethylenimine and histone. *Pharm. Res.* 2011; 28(4): 812-26.
62. Ogris M., Carlisle R.C., Bettinger T. et al. Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(50): 47550-5.
63. Tripathi S.K., Goyal R., Kumar P. et al. Linear polyethylenimine-graft-chitosan copolymers as efficient DNA/siRNA delivery vectors in vitro and in vivo. *Nanomedicine* 2012; 8(3): 337-45.
64. Jia S.F., Worth L.L., Densmore C.L. et al. Eradication of osteosarcoma lung metastases following intranasal interleukin-12 gene therapy using a nonviral polyethylenimine vector. *Cancer Gene Ther.* 2002; 9(3): 260-6.
65. Abbasi S., Paul A., Prakash S. Investigation of siRNA-Loaded Polyethylenimine-Coated Human Serum Albumin Nanoparticle Complexes for the Treatment of Breast Cancer. *Cell Biochem. Biophys.* 2011; 61(2): 277-87.
66. Xue H.Y., Wong H.L. Solid Lipid-PEI hybrid nanocarrier: an integrated approach to provide extended, targeted, and safer siRNA therapy of prostate cancer in an all-in-one manner. *ACS Nano* 2011; 5(9): 7034-47.
67. Lu H., Zhang Y., Roberts D.D. et al. Enhanced gene expression in breast cancer cells in vitro and tumors in vivo. *Mol. Ther.* 2002; 6(6): 783-92.
68. Liu G., Xie J., Zhang F. et al. N-Alkyl-PEI-Functionalized Iron Oxide Nanoclusters for Efficient siRNA Delivery. *Small* 2011; 7(19): 2742-9.
69. Rudolph C., Schillinger U., Plank C. et al. Nonviral gene delivery to the lung with copolymer-protected and transferrin-modified polyethylenimine. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1573(1): 75-83.
70. Oh Y.K., Kim J.P., Yoon H. et al. Prolonged organ retention and safety of plasmid DNA administered in polyethylenimine complexes. *Gene Ther.* 2001; 8(20): 1587-92.
71. Grosse S., Thévenot G., Aron Y. et al. In vivo gene delivery in the mouse lung with lactosylated polyethylenimine, questioning the relevance of in vitro experiments. *J. Control Release* 2008; 132(2): 105-12.
72. Zhang X.Q., Wang X.L., Huang S.W. et al. In vitro gene delivery using polyamidoamine dendrimers with a trimesyl core. *Biomacromolecules* 2005; 6(1): 341-50.
73. Rodrigo A.C., Rivilla I., Monteagudo S. et al. Efficient, non-toxic hybrid PPV-PAMAM dendrimer as a gene carrier for neuronal cells. *Biomacromolecules* 2011; 12(4): 1205-13.
74. Hayashi Y., Higashi T., Motoyama K. et al. Design and evaluation of polyamidoamine dendrimer conjugate with PEG, α -cyclodextrin and lactose as a novel hepatocyte-selective gene carrier in vitro and in vivo. *J. Drug Target.* 2013; 21(5): 487-96.
75. Chen Y., Zhou L., Pang Y. et al. Photoluminescent hyperbranched poly(amido amine) containing OI-cyclodextrin as a nonviral gene delivery vector. *Bioconjug. Chem.* 2011; 22(6): 1162-70.
76. Dufes C., Keith W.N., Bilsland A. et al. Synthetic anticancer gene medicine exploits intrinsic antitumor activity of cationic vector to cure established tumors. *Cancer Res.* 2005; 65(18): 8079-84.
77. Russ V., Günther M., Halama A. et al. Oligoethylenimine-grafted polypropylene dendrimers as degradable and biocompatible synthetic vectors for gene delivery. *J. Control Release* 2008; 132(2): 131-40.
78. Chisholm E.J., Vassaux G., Martin-Duque P. et al. Cancer-specific transgene expression mediated by systemic injection of nanoparticles. *Cancer Res.* 2009; 69(6): 2655-62.
79. Schatzlein A.G., Zinselmeyer B.H., Elouzi A. et al. Preferential liver gene expression with polypropylene dendrimers. *J. Control Release* 2005; 101(1-3): 247-58.
80. Yang T.F., Chin W.K., Cherng J.Y. et al. Synthesis of novel biodegradable cationic polymer: N,N-diethylethylenediamine polyurethane as a gene carrier. *Biomacromolecules* 2004; 5(5): 1926-32.
81. Jian Z.Y., Chang J.K., Shau M.D. Synthesis and characterizations of new lysine-based biodegradable cationic poly(urethane-co-ester) and study on self-assembled nanoparticles with DNA. *Bioconjug. Chem.* 2009; 20(4): 774-9.
82. Shau M.D., Tseng S.J., Yang T.F. et al. Effect of molecular weight on the transfection efficiency of novel polyurethane as a biodegradable gene vector. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2006; 77(4): 736-46.
83. Yousefpour Marzbali M., Yari Khosroushahi A., Movassaghpour A. Polyurethane dispersion containing quaternary ammonium groups: An efficient nanosize gene delivery carrier for A549 cancer cell line transfection. *Chem. Biol. Interact.* 2016; 244: 27-36.
84. Cheng J., Tang X., Zhao J. et al. Multifunctional cationic polyurethanes designed for non-viral cancer gene therapy. *Acta Biomater.* 2016; 30: 155-67.
85. Chiou G.Y., Cherng J.Y., Hsu H.S. et al. Cationic polyurethanes-short branch PEI-mediated delivery of Mir145 inhibited epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cancer stem-like properties and in lung adenocarcinoma. *J. Control. Release* 2012; 159(2): 240-50.
86. Yang Y.P., Chien Y., Chiou G.Y. et al. Inhibition of cancer stem cell-like properties and reduced chemoradioresistance of glioblastoma using microRNA145 with cationic polyurethane-short branch PEI. *Biomaterials* 2012; 33(5): 1462-76.
87. Maeder M.L., Gersbach C.A. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol. Ther.* 2016; 24(3): 430-46.

Поступила: 01.03.2016