

DOI 10.18699/vjgb-24-28

Невирусные системы внутриклеточной доставки инструментов редактирования генома

И.Х. Шайхутдинов , П.В. Ильясов  , О.В. Грибкова , Л.В. Лимарева 

Самарский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, Россия

 p.v.ilyasov@samsmu.ru

Аннотация. Последние десятилетия отмечены интенсивным развитием технологий и систем редактирования генов, которое вывело генную инженерию на новый уровень. Важным звеном этих технологий является специфичная и эффективная доставка компонентов таких систем в клетки-мишени. Традиционные векторы не всегда подходят для этой цели ввиду ограниченного объема полезной нагрузки, рисков, связанных с канцерогенезом и иммуногенностью, токсичности, необходимости высокой степени очистки и оценки качества полученных вирусных носителей, а также возможности встраивания вируса в геном хозяина, что может приводить к сверхэкспрессии компонентов вируса и проблемам с безопасностью. Это обуславливает актуальность поиска новых средств внутриклеточной доставки белков и нуклеиновых кислот. В данной работе приведен обзор абиотических векторов и систем доставки инструментов для редактирования генома, включая липосомы и твердые липидные наночастицы, мембранные везикулы иной природы, пептиды, проникающие в клетки, мицеллы, дендримеры, углеродные нанотрубки, неорганические, полимерные и другие наночастицы, металл-органические каркасные полимеры. Рассмотрены их преимущества, недостатки и предпочтительные области применения, а также возможность их использования для доставки систем редактирования генов. Особое внимание уделено металл-органическим каркасным полимерам и их потенциалу в качестве средств избирательной внутриклеточной доставки белков и полинуклеотидов. Сделан вывод о том, что дальнейшее развитие таких векторов и технологий на их основе может привести к появлению безопасных и эффективных систем доставки, способных длительно циркулировать в крови и распознавать клетки-мишени, обеспечивая адресное высвобождение полезной нагрузки в неизменном состоянии и тем самым улучшая результаты редактирования генов.


Ключевые слова: металл-органические каркасные полимеры; везикулы; наночастицы; вирусные векторы; редактирование генов.

Для цитирования: Шайхутдинов И.Х., Ильясов П.В., Грибкова О.В., Лимарева Л.В. Невирусные системы внутриклеточной доставки инструментов редактирования генома. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024; 28(2):239-248. DOI 10.18699/vjgb-24-28

Non-viral systems for intracellular delivery of genome editing tools

I.H. Shaikhutdinov , P.V. Ilyasov  , O.V. Gribkova , L.V. Limareva 

Samara State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, Russia

 p.v.ilyasov@samsmu.ru

Abstract. A hallmark of the last decades is an extensive development of genome editing systems and technologies propelling genetic engineering to the next level. Specific and efficient delivery of genome editing tools to target cells is one of the key elements of such technologies. Conventional vectors are not always suitable for this purpose due to a limited cargo volume, risks related to cancer and immune reactions, toxicity, a need for high-purity viral material and quality control, as well as a possibility of integration of the virus into the host genome leading to overexpression of the vector components and safety problems. Therefore, the search for novel approaches to delivering proteins and nucleic acids into cells is a relevant priority. This work reviews abiotic vectors and systems for delivering genome editing tools into target cells, including liposomes and solid lipid particles, other membrane-based vesicles, cell-penetrating peptides, micelles, dendrimers, carbon nanotubes, inorganic, polymer, metal and other nanoparticles. It considers advantages, drawbacks and preferred applications of such systems as well as suitability thereof for the delivery of genome editing systems. A particular emphasis is placed on metal-organic frameworks (MOFs) and their potential in the targeted intracellular delivery of proteins and polynucleotides. It has been concluded that further development of MOF-based vectors and technologies, as well as combining MOFs with other carriers can result in safe and efficient delivery systems, which would be able to circulate in the body for a long time while recognizing target cells and ensuring cell-specific delivery and release of intact cargoes and, thereby, improving the genome editing outcome.

Key words: metal-organic frameworks; vesicles; nanoparticles; viral vectors; gene editing.

For citation: Shaikhutdinov I.H., Ilyasov P.V., Gribkova O.V., Limareva L.V. Non-viral systems for intracellular delivery of genome editing tools. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2): 239-248. DOI 10.18699/vjgb-24-28

Введение

За последние десятилетия были разработаны новые стратегии и инструменты редактирования генов для лечения наследственных и приобретенных заболеваний. К таким инструментам относятся, в частности, специфические синтетические олигонуклеотиды, рекомбинантные нуклеазы с доменами «цинковый палец» (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), системы редактирования генов на базе кластерных коротких палиндромных повторов и ассоциированных с ними ферментов CRISPR/Cas, редакторы оснований в геномной ДНК. Их эффективность напрямую зависит от методов доставки в клетки-мишени и ткани. В настоящее время для этих целей используют различные подходы и векторные системы, которые характеризуются специфическими преимуществами и недостатками.

К основным проблемам доставки, обусловленным природой инструментов редактирования генома, можно отнести большой размер белков систем CRISPR/Cas, TALEN, сильный отрицательный заряд РНК, иммуногенность, низкую эффективность, неспецифические побочные эффекты (Singh D. et al., 2016). Сложность их трансфекции обусловлена также множеством биологических барьеров, затрудняющих проникновение нуклеиновых кислот и белков в клетку и ядро, причем методы и системы доставки, призванные облегчить преодоление таких барьеров, нередко приносят свои сложности и ограничения, снижающие эффективность генетических модификаций клетки-мишени.

Для доставки вышеуказанных инструментов в клетки используют разнообразные физические методы: электропорацию, механопорацию, микроинъекции, гидродинамические инъекции, сонопорацию и т. д. (Moscoso, Steer, 2020). Наиболее часто применяют электропорацию вследствие методической простоты, высокой эффективности трансфекции и редактирования генома *in vivo*, а также микроинъекции из-за возможности введения ДНК напрямую в ядра клеток. В частности, при использовании систем CRISPR/Cas микроинъекция позволяет контролировать количество вводимого комплекса Cas/sgRNA и преодолевать ограничения по их молекулярной массе (Wang H.X. et al., 2017). Главными ограничениями для электропорации являются низкая жизнеспособность клеток после манипуляций, а также необходимость адаптации параметров метода к особенностям конкретных клеток и векторов. В случае микроинъекций к таким ограничениям относятся техническая сложность, трудоемкость и дороговизна процедуры. Кроме того, для этих методов доступны не все ткани организма *in vivo*, и их применяют в основном для редактирования генома мелких животных.

Другой подход к доставке нуклеиновых кислот и белков в клетки включает использование векторов, способных проникать в клетки без применения вспомогательных методов. Традиционно для этих целей используют вирусные векторы, поскольку они обладают оптимизированными в ходе эволюции механизмами внедрения генетического материала в клетки организма-хозяина. Они характеризуются высокой стабильностью, легко проникают через биологические барьеры, способны осуществлять эффективную трансфекцию и индукцию долговременной экс-

прессии генов, а также инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки (Huang et al., 2011). Вместе с тем у вирусных векторов существуют серьезные недостатки, к которым относятся ограниченный объем загрузки материала, риск канцерогенеза, иммуногенность, токсичность, необходимость высокой степени очистки и оценки качества полученных вирусных носителей. Кроме того, многие вирусные векторы интегрируются в геном клетки-мишени, что может привести к избыточной экспрессии компонентов системы редактирования генов и проблемам с безопасностью их применения (Hanlon et al., 2019).

В связи с этим одной из важных задач являются поиск и разработка альтернативных невирусных векторных систем различной природы, способных связывать нуклеиновые кислоты и белки и высвобождать их контролируемым образом. Такие системы доставки должны обладать рядом важных преимуществ, в частности возможностью загрузки компонентов большого размера для доставки, простотой формирования, пониженной токсичностью, минимальным иммунным ответом, настраиваемыми свойствами, необходимыми для практического применения. Почти все синтетические векторы несут положительный заряд, необходимый для электростатического комплексообразования с ДНК (Mintzer, Simanek, 2009). По сравнению с другими системами доставки они способны транспортировать редактирующие комплексы в различных формах, включая ДНК, рибонуклеопротеиды и мРНК (Liu C. et al., 2019; Niggemann et al., 2020). Немаловажен тот факт, что доставка, опосредованная невирусными векторами, носит временный характер, что предпочтительно при некоторых вариантах редактирования генов. Компоненты систем редактирования генов разрушаются вскоре после попадания в клетки, что приводит к снижению нецелевых эффектов (Mout et al., 2017a). Кроме того, многие невирусные векторные системы можно производить с заданными параметрами в промышленных масштабах.

Внимания заслуживают такие системы доставки инструментов редактирования генома, как липосомы и твердые липидные наночастицы, мембранные везикулы иной природы, пептиды, проникающие в клетки, мицеллы, дендримеры, углеродные нанотрубки, неорганические, полимерные и другие наночастицы, металл-органические каркасные полимеры (МОКП). Преимущества и недостатки ряда из них приведены в таблице, более подробная информация представлена в следующих разделах.

Наночастицы на основе липидов

Перенос генов, опосредованный липосомами, был одной из самых ранних стратегий введения экзогенного генетического материала в клетки-мишени (Mintzer et al., 2009). В настоящее время широко применяют липосомы различного состава, содержащие катионные липиды, полиэтиленгликоль, холестерин, фосфолипиды, диолеилфосфатидную кислоту и др. (Kim et al., 2020; Patel et al., 2020). Они легко проникают в клетки-мишени, а опосредованная ими доставка значительно снижает эффекты по отношению к нецелевым тканям и органам по сравнению с доставкой CRISPR на основе ДНК-векторов (Yeh et al., 2018). Это обуславливает актуальность исследований липидных носителей в качестве систем доставки инстру-

Сводная информация о преимуществах и недостатках невирусных систем доставки средств редактирования генома

Системы доставки	Преимущества	Недостатки
Липосомы и липидные частицы	Простота получения Эффективность адресной доставки Возможность адаптации под конкретные цели Возможность контролируемого высвобождения	Склонность к агрегации Сложности с контролем размера и стабильности
Внеклеточные везикулы	Биосовместимость Эффективность и специфичность доставки Защита связанных компонентов	Относительно низкая стабильность Отсутствие стандартизированных методов получения
Пептиды, проникающие в клетки	Низкая токсичность Эффективность трансфекции Возможность управления структурой носителя	Риск иммунизации Низкая специфичность
Дендримеры	Возможность управления свойствами носителя Защита связанных компонентов Эффективность трансфекции	Токсичность
Полимерные наночастицы	Простота получения Безопасность Возможность управления свойствами носителя	Относительно низкая эффективность доставки
Наночастицы металлов	Биосовместимость Широкий спектр связываемых компонентов Эффективность доставки	Описанные случаи токсичности и иммуногенности
Металл-органические каркасные полимеры	Простота получения Биосовместимость Возможность управления характеристиками пор Защита связанных компонентов Возможность контролируемого высвобождения нагрузки	Относительно низкая эффективность и специфичность адресной доставки Описанные случаи токсичности и иммуногенности

ментов редактирования генов. Например, в работе (Andey et al., 2019) был сконструирован липоплекс, инкапсулировавший малую интерферирующую РНК (миРНК) фактора транскрипции SOX2 для адресной терапии SOX2-обогащенных опухолей легких у бестимусных мышей СВ-17. У 85 % животных после введения липоплекса произошло уменьшение массы и объема опухоли, что ассоциировалось со снижением экспрессии белка SOX2. В обзоре (Lu Z.R. et al., 2021) представлена сводная информация по применению DODAP, а также других ионизируемых, рН-чувствительных и реагирующих на иные изменения окружающей среды липидов для получения наночастиц, включающих молекулы миРНК для онкотерапии и адресного сайленсинга онкогенов. Использование липидных наночастиц для внутриклеточной доставки регуляторных РНК описано в публикациях (Wang C. et al., 2021; Euygeris et al., 2022) и в комплексном обзоре применения липидов и их производных для доставки РНК (Zhang Y. et al., 2021). В этих работах указаны различные подходы и преимущества липидных наночастиц, включая относительную простоту адресной доставки, возможность контролируемого высвобождения, защиту частиц от агрегации и уничтожения иммунной системой в кровотоке за счет использования ПЭГ и других защитных молекул, избегание эндосомного разрушения наночастиц и т. д.

Существуют коммерческие липидные наночастицы для трансфекции, например Lipofectamine 2000, Lipofectamine 3000, RNAiMAX, которые применяют для доставки компонентов CRISPR/Cas9 в виде смеси мРНК Cas9 и гРНК и рибонуклеопротеидов в различные клетки (Yu X.

et al., 2016). Липидные наночастицы позволяют инкапсулировать и доставлять в клетки-мишени одновременно несколько типов РНК (мРНК и миРНК) (Ball et al., 2018). Кроме того, их можно адаптировать для конкретного пути введения, вида клеток и типа инструмента редактирования генома (Liu J. et al., 2019; Lokugamage et al., 2021).

Тем не менее трудности контроля размера, однородности и стабильности липидных наночастиц ограничивают их применение, в частности, при генной терапии *in vivo*. В ряде случаев эти трудности удается преодолеть за счет модификации поверхности наночастиц ПЭГ и другими полимерами либо использования ядер наночастиц иной природы (например, из золота или полистирола), поверх которых формируются липидные слои с включенным содержанием (Yan et al., 2022). Однако в целом это затрудняет получение и применение подобных носителей и в ряде случаев обуславливает целесообразность отказа от таких систем в пользу других биогенных и абиогенных векторов.

Внеклеточные везикулы: экзосомы и микровезикулы

Для доставки инструментов редактирования генома *in vitro* и *in vivo* без повреждения их в физиологических жидкостях и внеклеточном пространстве в ряде работ предлагают использовать носители-везикулы естественного происхождения на основе клеточных мембран: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца.

Экзосомы представляют собой внеклеточные везикулы, генерируемые всеми клетками. Благодаря их небольшому размеру, превосходной биосовместимости, способности

переносить биомолекулы в другие клетки и специфической экспрессии рецепторов клеточной поверхности, их первоначально рассматривали в качестве носителей для доставки лекарственных средств. В дальнейшем эксперименты показали, что экзосомы, несущие миРНК, могут защищать свою полезную нагрузку от ферментативного гидролиза (период полужизни > 48 ч), тогда как свободная миРНК имеет период полужизни менее 6 ч (Yang Z. et al., 2016). Кроме того, включение миРНК в экзосомы значительно улучшало ее поглощение клетками.

Kamerkar S. с коллегами сконструировали экзосомы, несущие миРНК, мишенью которой являлась протоонкогенная ГТФаза KRAS. Применение этих экзосом подавляло развитие опухолей при различных моделях рака поджелудочной железы у мышей и значительно увеличивало общую выживаемость (Kamerkar et al., 2017).

Для снижения потенциальной иммуногенности экзосом с миРНК и белками при введении мышам с болезнью Альцгеймера использовали везикулы, образуемые дендритными клетками мыши (Alvarez-Erviti et al., 2011). При этом характерные для клеток-мишеней белки соединяли с Lamp2b – белком, в большом количестве присутствующим в мембранах экзосом. Подобная модификация везикул приводила к эффективному нокдауну гена, специфичному по отношению к типу клеток, и позволяла минимизировать иммунный ответ.

Более того, в экспериментах выяснено, что модифицированные экзосомы способны доставлять направляющую РНК и белок Cas9 от клетки к клетке в линии NuH7 (Chen R. et al., 2019). Исследователи показали, что межклеточная доставка компонентов системы CRISPR/Cas9 позволяла специфично разрезать ДНК вируса гепатита В и вируса папилломы в клетках, инфицированных этими вирусами.

Несмотря на то что транспорт инструментов редактирования генома *in vivo* с помощью экзосом не демонстрировал явных побочных эффектов, эффективность загрузки и адресной доставки нуклеиновых кислот и белков с их помощью до конца не изучена. Дополнительным ограничением применения экзосом в клинической практике является отсутствие стандартизации методов их выделения и анализа (Doyle, Wang, 2019). Таким образом, необходимо детальное изучение механизмов и последствий доставки полезной нагрузки с помощью везикул данного типа, поскольку результат может сильно зависеть от используемых систем и клеток.

Другой тип внеклеточных везикул – микровезикулы – тоже привлекает к себе внимание исследователей как потенциальное средство доставки. В отличие от экзосом, которые формируются эндосомным путем, микровезикулы образуются непосредственно из плазматической мембраны. Они крупнее экзосом, что позволяет увеличить полезную нагрузку (Kanada et al., 2015). Потенциал микровезикул, происходящих из эпителиальных клеток, в качестве системы доставки CRISPR/Cas9 и сорафениба оценивали на модели гепатоцеллюлярной карциномы (Samuel et al., 2020), продемонстрировав усиленный хоминг микровезикул по отношению к опухолевым клеткам и синергическое противоопухолевое действие загруженных агентов. В ряде работ описано также применение

микровезикул для доставки миРНК и микроРНК в клетки с целью регуляции внутриклеточных и тканевых процессов, например фиброза, подавления опухолевого роста и т. д. (Vader et al., 2017; Stolzenburg, Harris, 2018).

Пептиды, проникающие в клетки

Эффективная система доставки должна работать в различных тканях, обеспечивать быстрое высвобождение из носителя, быть функциональной при низких дозах, нетоксичной и простой в использовании в клинических условиях. Такими свойствами, в частности, обладают пептиды, проникающие в клетки (ППК). Они способны связываться с различными молекулами, взаимодействовать с мембранными структурами, проникать внутрь клеток и доставлять свою нагрузку в цитоплазму или ядро. Известно большое количество таких пептидов, способных ковалентно или нековалентно связывать целевые молекулы и транслоцироваться в клетки за счет непосредственного перехода через мембрану, эндоцитоза или формирования транспортного канала в мембране. Благодаря ряду преимуществ ППК на данный момент применяются в исследованиях для транспортировки малых РНК/ДНК, плазмид, антител и наночастиц в клетки. Среди их достоинств следует отметить контролируемую низкую токсичность, высокую эффективность трансфекции, гибкость структурной конструкции (Lopez-Vidal et al., 2021).

В работе (Ramakrishna et al., 2014) ППК конъюгировали с модифицированным белком Cas9 и направляющей РНК для индукции генетических нарушений в сайте-мишени в эмбриональных стволовых клетках, фибробластах дермы, клетках HEK293T, HeLa и клетках эмбриональной карциномы человека. Данная система доставки инструментов редактирования генома обеспечила эффективное нарушение экспрессии генов с уменьшением количества мутаций вне мишеней по сравнению с трансфекцией плазмидами.

Lopez-Vidal E.M. с коллегами успешно использовали конъюгат синтезированных коротких пептидов с низким содержанием аргинина и антисмысловых олигонуклеотидов для трансфекции клеток HeLa654, а также ткани сердца трансгенных мышей *in vivo* (Lopez-Vidal et al., 2021).

Показана эффективность ППК как векторов для доставки генов в комплексе с модифицированными вирусами, плазмидной ДНК, малыми интерферирующими РНК, олигонуклеотидами, платформами ДНК-оригами, полноразмерными генами и др. (Taylor, Zahid, 2020). К особенностям, ограничивающим их применение, относятся высокая молекулярная масса, риск иммунизации организма хозяина и недостаточная специфичность доставки.

Дендримеры

Еще одним примером абиогенных векторов являются дендримеры. Среди достоинств их применения отмечают безопасность, отсутствие иммуногенности, высокую эффективность, воспроизводимость, контролируемый размер и возможность широкой модификации структур, способность образовывать стабильные комплексы с различными молекулами и выполнять одновременную доставку нескольких видов молекул (например, лекарственного средства и гена) (Abedi-Gaballu et al., 2018). Они также

могут стимулировать выход полезной нагрузки из эндосом после проникновения в клетку за счет эффекта «протонной губки». К молекулам дендримеров можно присоединять различные функциональные группы и лиганды, например, антитела и сигнальные молекулы, зонды для визуализации, фотосенсибилизаторы и др. (Kim et al., 2020). Одно из уникальных свойств дендримеров – химическая и физическая стабильность, обусловленная их химической структурой (Kalomiraki et al., 2016).

Дендримеры представляют собой сильно разветвленные синтетические макромолекулы с четко определенной структурой и составом. Эти носители создают путем повторной сборки полимерных слоев вокруг центрального ядра. Существует много различных типов дендримеров: пептидные, поли(L-лизиновые), полиамидаминовые (РАМАМ), кремнийорганические, полиэтилениминовые дендримеры и др. В качестве систем доставки терапевтических молекул и генов наиболее широко изучены РАМАМ-дендримеры. Они образуют стабильные комплексы с ДНК, мРНК и микроРНК, называемые «дендриplexами». Эти комплексы демонстрируют высокую эффективность трансфекции и способность защищать нуклеиновые кислоты от разрушения (Fant et al., 2008). Благодаря модификациям возможно создание различных производных РАМАМ-дендримеров с пониженной токсичностью, повышенной клеточной специфичностью и эффективностью доставки генов (Abedi-Gaballu et al., 2018; Liu C. et al., 2019).

В последнее десятилетие обычно используются три стратегии модификации дендримеров: 1) модификация поверхности функциональными группами (Yang J. et al., 2015); 2) формирование гибридного вектора (Biswas et al., 2013); 3) создание самособирающихся супрамолекулярных наночастиц (Yadav et al., 2020).

Примером первой стратегии может служить работа (Nagasaki, Shinkai, 2007), в которой использовали катионный полиазобензолный дендример, модифицированный L-лизином (Lys-G2). Данный дендример в комплексе с плазмидной ДНК после включения его в цитоплазму и последующего УФ-облучения обеспечивал повышенную эффективность трансфекции.

Согласно второй стратегии выполняют сопряжение различных лигандов, полимеров, неорганических наночастиц с поверхностью комплекса дендримеров (Lin et al., 2018), что улучшает свойства дендримера как носителя молекул. Mbatha L.S. с коллегами (Mbatha et al., 2021) при разработке гибридных носителей модифицировали наночастицы золота фолиевой кислотой и полиамидо-аминами 5-го поколения. Оценку их цитотоксичности и трансгенной экспрессии выполняли с использованием репортерного гена люциферазы *in vitro*. Гибридные векторы вызывали повышенную экспрессию гена люциферазы по сравнению с РАМАМ-дендримерами с фолиевой кислотой и несвязанными дендримерами.

Примером третьей стратегии модификации дендримеров является исследование, в котором были созданы супрамолекулярные наночастицы переменного размера (30–450 нм) из трех различных молекулярных строительных блоков: РАМАМ-дендримера с адамантаном, разветвленного полиэтиленimina с конъюгированным цикло-

декстрином и полиэтиленгликоля с адамантаном (Lu S. et al., 2020). Данные наночастицы использовали в качестве вектора для доставки агентов для РНК-интерференции в целях противоопухолевой терапии, что привело к снижению васкуляризации и подавлению роста ксенотрансплантатов опухоли легкого на модели мыши.

В исследовании (Zarebkohan et al., 2015) был разработан РАМАМ-ПЭГ-дендример с покрытием из трипептида «серин-аргинин-лейцин» (SRL) для доставки генов в клетки линии глиомы C6. Результаты показали, что наночастицы такого дендримера обладают хорошей эффективностью при трансфекции клеток опухолей головного мозга.

Таким образом, дендримеры – перспективные средства доставки генетического материала и инструментов редактирования генов. Вместе с тем одним из главных ограничений их применения является токсичность, причем дендримеры 3–5-го поколений менее токсичны, чем дендримеры более высоких поколений (Shcharbin et al., 2013). Кроме того, цитотоксичность дендримеров зависит от количества и характера поверхностных групп, а также от эластичности ветвей дендримеров (Tang et al., 1996), гидрофобности, модификаций поверхности и ядра (Somani et al., 2018). Широкий спектр модификаций перечисленных параметров позволяет найти наиболее подходящую из них для минимизации негативных свойств дендримеров в качестве носителей.

Полимерные наночастицы

Полимерные наночастицы обладают химическим разнообразием и большим потенциалом за счет гибких структурных модификаций. Они используются для доставки нуклеиновых кислот и других веществ в клетки и ткани организма.

Строительными единицами этих носителей служат различные природные и синтетические полимеры. Природные макромолекулы имеют ряд преимуществ перед синтетическими, которые в основном сводятся к отсутствию токсичности, относительно низкой стоимости и простоте получения. К ним относят целлюлозу, крахмал, желатин, коллаген, хитозан, агар, пектин, инулин, декстрин и др. Эти биополимеры можно модифицировать с целью создания систем доставки для решения конкретных задач (Yadav et al., 2020; Basinska et al., 2021). Например, среди природных полимерных носителей для доставки CRISPR/Cas9 чаще используют хитозан. Его основными достоинствами являются биосовместимость, отсутствие цитотоксичности и биоразлагаемость. Авторы работы (Qiao et al., 2019) инкапсулировали в хитозановые наночастицы красный флуоресцентный белок и комплексы Cas9/рибонуклеопротеид с полиглутаматной пептидной меткой и донорской ДНК. Полимерный носитель позволял одновременно доставлять в клетки как инструмент для редактирования генома, так и матрицу в виде одноцепочечной ДНК и демонстрировал высокую эффективность трансфекции клеток линии HeLa при отсутствии цитотоксичности (Qiao et al., 2019).

Список синтетических полимеров тоже достаточно велик. Среди них в качестве средств доставки наиболее часто используют полимолочную и полигликолевую кислоты, их сополимеры, поликапролактон, полигидроксibuтират

и др. Они характеризуются хорошей биосовместимостью и биоразлагаемостью, что позволило найти им широкое применение в медицине, биотехнологии, сельском хозяйстве и т. д. (Singh A.V., 2011; Zhang S. et al., 2021).

Ведутся разработки по созданию носителей сложного состава, одновременно включающих несколько полимеров, что позволяет компенсировать недостатки одних компонентов за счет достоинств других. Так, в статье (Luo et al., 2018) использовали блок-сополимер полиэтиленгликоля, β -поли(молочной-гликолевой) кислоты и катионных липидов в целях получения специализированных наночастиц для доставки мРНК Cas9 и плазмид CRISPR/Cas9 в макрофаги. Полученные носители вызывали специфическую экспрессию Cas9 в макрофагах, а также в моноцитах *in vitro* и *in vivo*.

Rui Y. с коллегами синтезировали различные полимеры из карбоксилированных разветвленных поли(β -аминоэфиров) за счет ступенчатой сополимеризации. Результаты их исследований показали, что полимер, кэпированный лигандом C5, обеспечивал максимальную эффективность высвобождения полезной нагрузки после поглощения клетками. В дальнейшем из него были созданы наночастицы для инкапсуляции рибонуклеопротеинов системы CRISPR-Cas9. Обнаружено, что доставка инструментов редактирования генома привела к 77 и 47 % нокауту целевого гена в клетках HEK-293T и в клетках глиомы мыши GL261 соответственно (Rui et al., 2019).

Таким образом, полимерные наночастицы в большинстве случаев безопасны, их легко синтезировать и придавать им определенные свойства. Кроме того, они разлагаются в организме и подходят для всех стратегий доставки системы CRISPR-Cas9. Тем не менее эффективность доставки за их счет считается недостаточно высокой (Liu C. et al., 2019).

Наночастицы золота

Существует ряд работ, в которых проблемы на пути доставки *in vitro* и *in vivo* инструментов редактирования генома предлагается решать с использованием наночастиц золота в качестве основы вектора. Показано, что наночастицы золота малого размера (до 3 нм) биосовместимы, не обладают цитотоксичностью и иммуногенностью (Shukla et al., 2005). С наночастицами золота можно связывать различные лиганды, лекарственные средства, инструменты редактирования генома, что расширяет диапазон их применения.

При использовании наночастиц золота для внедрения рибонуклеопротеидов в целях редактирования генов в клетки головного мозга продемонстрировано отсутствие цитотоксичности и неблагоприятного воздействия на работу нейронов (Lee et al., 2018). В работе (Glass et al., 2017) описано успешное применение наночастиц золота с компонентами CRISPR для устранения мутации ДНК, вызывающей мышечную дистрофию Дюшенна у мышей, при минимальных неспецифических эффектах. А в исследовании (Jia et al., 2017) наночастицы золота, ковалентно конъюгированные с нуклеиновыми кислотами (миРНК), обеспечили успешную доставку полезной нагрузки в макрофаги, что привело к уменьшению воспаления и вос-

становлению сердечной функции у экспериментальных животных с кардиомиопатией.

В работе (Mout et al., 2017b) наночастицы золота, покрытые аргинином, конъюгировали с синтезированными конструктами на основе рибонуклеотидов и белка Cas9, меченного олигоглутаматным маркером. Эти комплексы инкубировали с культурами HeLa, HEK-293T и Raw 264.7. Разработанная система доставки белка Cas9 и рибонуклеотидов продемонстрировала высокую эффективность переноса полезной нагрузки в цитоплазму и ядро (около 90 %), а эффективность редактирования генома составила от 23 до 30 %. В исследовании (Tao et al., 2021) показана возможность использования наночастиц золота с модифицированной поверхностью для мониторинга биологических эффектов в режиме реального времени при редактировании генов.

К ограничениям применения наночастиц золота можно отнести недостаток знаний о взаимосвязи иммуногенности и токсичности с физико-химическими свойствами данного носителя (размером, формой, зарядом и модификациями поверхности) (Dykman, Khlebtsov, 2017). Для снижения токсичности таких носителей и повышения эффективности доставки используют наночастицы сложного состава, включающие полиэтиленмин, полиэтиленгликоль и другие компоненты, способствующие снижению иммуногенности частиц и препятствующие их связыванию с неспецифическими рецепторами (Li Y. et al., 2017).

Металл-органические каркасные полимеры

В последнее время активно ведутся разработки по применению металл-органических каркасных полимеров (МОКП) в качестве невирусных средств доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени. МОКП представляют собой новый класс пористых материалов. Кристаллическая решетка данных полимеров построена за счет координационных связей между центральными ионами щелочно-земельных или переходных металлов (Ca, Mg, Zn, Ti, Zr, Mn, Pd, Cu, Cr, Cd и др.) и органическими лигандами с хелатирующими функциональными группами (Cheetham et al., 1999; Valtchev et al., 2009; Farha et al., 2012; Paz et al., 2012; Furukawa et al., 2013; Yu Y. et al., 2013; Li H. et al., 2018; Corella-Ochoa et al., 2019). В процессе синтеза МОКП образуются пористые высокоупорядоченные кристаллические структуры со строго определенными параметрами пор, способные к адсорбции (Wang Z., Cohen, 2009). Технология синтеза МОКП позволяет также управлять степенью пористости и размером пор в соответствии с параметрами полезной нагрузки.

Кроме того, МОКП определенного состава (например, на основе ионов цинка, кальция, магния, титана, циркония, железа и биосовместимых органических лигандов – поликарбоксилатов, имидазолов, аминов, фосфонатов и др.) характеризуются биоразлагаемостью и низкой токсичностью (Horsajada et al., 2012; Lyu et al., 2021). Поэтому МОКП нашли широкое применение в экспериментальной медицине как носители лекарственных препаратов с контролируемым высвобождением (Su et al., 2015; Ranjbar et al., 2018; Chen G. et al., 2019; Osorio-Toribio et al., 2020). Особенно часто в таких целях используют наноразмер-

ный цеолитный каркасный полимер имидазола и солей цинка (ZIF). Он характеризуется низкой токсичностью, возможностью настройки параметров пор в широких пределах, pH-буферными свойствами и способностью избегать выведения из клеток в составе эндосом (Alsaïari et al., 2018). Также металл-органические каркасные полимеры широко используются для инкапсулирования биологических активных соединений, например инсулина (Chen Y. et al., 2018), гепарина (Vinogradov et al., 2018), гемоглобина (Peng et al., 2019). Помимо этого, группе исследователей удалось успешно инкапсулировать живые клетки в МОКП, обеспечивавший их консервацию и защиту от физических воздействий (Liang et al., 2016).

Инкапсуляция инструментов редактирования генома в порах таких материалов обеспечивает их защиту от разрушения в физиологических условиях до достижения мишени (Peng et al., 2018). Известны два механизма данного процесса. Первый – инкапсуляция путем абсорбции материала, непосредственно в поры. Так, в работе (Teplensky et al., 2019) описан механизм инкапсуляции молекулы РНК в поры циркониевого МОКП – NU-1000. Вторым механизмом – биоминерализация, в этом случае происходит построение металл-органического каркаса вокруг инкапсулируемого материала (Li Y. et al., 2019).

В работе (Alsaïari et al., 2018) описана инкапсуляция CRISPR/Cas9 в полимер ZIF-8. Масса инкапсулированных компонентов достигала 1.2 % от общей массы полимера, при этом эффективность загрузки пор составляла 17 %, что авторы считали хорошим показателем на фоне ранее зарегистрированных значений для систем доставки на основе МОКП. Полимер не обладал цитотоксическим действием в концентрации до 200 мг/мл, был стабилен при физиологических условиях, но быстро разрушался при pH ≈ 5–6, что создает потенциал для контролируемого высвобождения инкапсулированных веществ *in vivo*. Полученный комплекс обладал также усиленной способностью к высвобождению из эндосом (что позволяло ему избегать выведения из клеток-мишеней) по сравнению с катионными липосомами и вызывал двукратное снижение экспрессии гена-мишени при инкубировании в течение 2 суток и трехкратное – при инкубировании в течение 4 суток, что вдвое превышало эффективность нокдауна гена-мишени при использовании липофектамина для доставки системы CRISPR/Cas9 в клетки.

Для повышения безопасности и эффективности редактирования генома важно обеспечить адресную доставку необходимых инструментов к клеткам-мишеням. Alyami M.Z. с коллегами (Alyami et al., 2020) предложили покрытие на основе мембраны клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 для ZIF-8 с инкапсулированным CRISPR/Cas9. Инкубирование модифицированного таким образом МОКП с клетками MCF-7, HeLa, HDFn и aTC показало, что максимальная эффективность поглощения носителя имела место для клеток MCF-7, тогда как клетки других линий поглощали агент в незначительной степени. Кроме того, трансфекция клеток MCF-7 таким композитом приводила к трехкратному подавлению экспрессии EGFP по сравнению с использованием ZIF, покрытого мембраной клеток HeLa (Alyami et al., 2020).

В настоящее время активно обсуждаются конкретные химические процессы, которые можно применять для контролируемой доставки Cas9/gRNA в клетки с помощью МОКП в присутствии эндогенных или внешних сигналов (Yang X. et al., 2019; Lyu et al., 2021). Так, системы носителей, используемые для проникновения в клетки путем эндоцитоза, попадают в органеллы с кислым содержанием, например эндосомы или лизосомы. С учетом pH внутри клетки, для эффективной инкапсуляции и доставки различных гидрофильных соединений созданы pH-чувствительные гибридные носители, состоящие из диоксида кремния и ZIF (SMOF) (Wang Y. et al., 2020). Наночастицы SMOF с инкапсулированными рибонуклеопротеидами позволили осуществлять эффективное редактирование генома *in vivo* в ткани пигментного эпителия сетчатки мышей посредством субретинальной инъекции.

Патологически измененные клетки и ткани нередко характеризуются уникальной микросредой со специфическим pH и уровнями других активных веществ, например, ферментов и АТФ, что можно использовать для избирательной доставки с применением МОКП. В работе (Yang X. et al., 2019) авторы, опираясь на тот факт, что при некоторых патологических явлениях в клетках активируется продукция АТФ, создали АТФ-чувствительный цеолитный каркасный полимер на основе имидазола и ионов цинка (ZIF-90). Данный материал эффективно инкапсулировал CRISPR/Cas9 и обеспечивал доставку большого количества белковой нагрузки в цитозоль, независимо от размера и молекулярной массы частиц. В присутствии АТФ комплексы ZIF-90/белок разрушались с высвобождением белка вследствие конкурентной координации между АТФ и Zn²⁺ ZIF-90. После трансфекции отмечено подавление экспрессии гена-мишени в клетках HeLa с эффективностью до 35 % (Yang X. et al., 2019).

Результаты исследования (Chen T.T. et al., 2018) тоже продемонстрировали, что наночастицы ZIF-8 способны быстро высвобождать инкапсулированные белковые соединения в кислой среде, но не при pH 7.4, что может быть предпочтительно при некоторых патологических состояниях.

Несмотря на определенные успехи и перспективность разработки МОКП в качестве носителей инструментов редактирования генома, в этой области остаются вопросы, требующие решения. В частности, необходимы исследования: 1) для повышения специфичности и эффективности адресного воздействия наночастиц МОКП; 2) для увеличения стабильности комплексов МОКП с биомолекулами в кровотоке при внутривенном введении; 3) для поиска путей снижения иммуногенности и токсичности; 4) для оценки долгосрочной безопасности носителей; 5) для разработки крупномасштабного производства носителей с заданными параметрами (Lyu et al., 2021; Zheng et al., 2021).

Заключение

В настоящее время существуют разнообразные методы и системы доставки инструментов редактирования генома. Они обладают как уникальными достоинствами, так и недостатками. При этом надо признать невозможность разработки единственного универсального типа носителя

для доставки таких агентов. Очевидно, что выбор и применение тех или иных вирусных и невирусных векторов должны определяться в первую очередь спецификой решаемых задач. В частности, для комплексной загрузки нескольких веществ и компонентов, которая особенно актуальна при реализации методов редактирования генов, предпочтительно использовать синтетические носители. Поэтому все чаще высказываются предложения о комбинировании различных невирусных систем доставки. Например, в ряде случаев целесообразна доставка генов и терапевтических агентов с помощью проникающих в клетки пептидов в комплексе с наночастицами, мицеллами, липосомами, полимерами. В этом контексте большим потенциалом обладают носители на основе МОКП, обеспечивающие возможность реализации широкого спектра характеристик. Дальнейшее развитие таких векторов и технологий на их основе может привести к появлению безопасных и эффективных систем доставки, способных длительно циркулировать в крови и распознавать клетку-мишень, обеспечивая адресное высвобождение полезной нагрузки в неизменном состоянии.

Список литературы / References

- Abedi-Gaballu F., Dehghan G., Ghaffari M., Yekta R., Abbaspour-Ravvasjani S., Baradaran B., Dolatabadi J.E.N., Hamblin M.R. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy. *Appl. Mater. Today*. 2018;12:177-190. DOI 10.1016/j.apmt.2018.05.002
- Alsaiaari S.K., Patil S., Alyami M., Alamoudi K.O., Aleisa F.A., Merzaban J.S., Li M., Khashab N.M. Endosomal escape and delivery of CRISPR/Cas9 genome editing machinery enabled by nanoscale zeolitic imidazolate framework. *J. Am. Chem. Soc.* 2018;140(1):143-146. DOI 10.1021/jacs.7b11754
- Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H., Betts C., Lakhali S., Wood M.J. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* 2011;29(4):341-345. DOI 10.1038/nbt.1807
- Alyami M.Z., Alsaiaari S.K., Li Y., Qutub S.S., Aleisa F.A., Sougra R., Merzaban J.S., Khashab N.M. Cell-type-specific CRISPR/Cas9 delivery by biomimetic metal organic frameworks. *J. Am. Chem. Soc.* 2020;142(4):1715-1720. DOI 10.1021/jacs.9b11638
- Andey T., Bora-Singhal N., Chellappan S.P., Singh M. Cationic lipoplexes for treatment of cancer stem cell-derived murine lung tumors. *Nanomedicine*. 2019;18:31-43. DOI 10.1016/j.nano.2019.02.007
- Ball R.L., Hajj K.A., Vizelman J., Bajaj P., Whitehead K.A. Lipid nanoparticle formulations for enhanced co-delivery of siRNA and mRNA. *Nano Lett.* 2018;18(6):3814-3822. DOI 10.1021/acs.nanolett.8b01101
- Basinska T., Gadzinowski M., Mickiewicz D., Slomkowski S. Functionalized particles designed for targeted delivery. *Polymers (Basel)*. 2021;13(12):2022. DOI 10.3390/polym13122022
- Biswas S., Deshpande P.P., Navarro G., Dodwadkar N.S., Torchilin V.P. Lipid modified triblock PAMAM-based nanocarriers for siRNA drug co-delivery. *Biomaterials*. 2013;34(4):1289-1301. DOI 10.1016/j.biomaterials.2012.10.024
- Cheetham A.K., Ferey G., Loiseau T. Open-framework inorganic materials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1999;38(22):3268-3292. DOI 10.1002/(SICI)1521-3773(19991115)38:22<3268::AID-ANIE3268>3.0.CO;2-U
- Chen G., Luo J., Cai M., Qin L., Wang Y., Gao L., Huang P., Yu Y., Ding Y., Dong X., Yin X., Ni J. Investigation of metal-organic framework-5 (MOF-5) as an antitumor drug oridonin sustained release carrier. *Molecules*. 2019;24(18):3369. DOI 10.3390/molecules24183369
- Chen R., Huang H., Liu H., Xi J., Ning J., Zeng W., Shen C., Zhang T., Yu G., Xu Q., Chen X., Wang J., Lu F. Friend or foe? Evidence indicates endogenous exosomes can deliver functional gRNA and Cas9 protein. *Small*. 2019;15(38):e1902686. DOI 10.1002/sml.201902686
- Chen T.T., Yi J.T., Zhao Y.Y., Chu X. Biomineralized metal-organic framework nanoparticles enable intracellular delivery and endolysosomal release of native active proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2018;140(31):9912-9920. DOI 10.1021/jacs.8b04457
- Chen Y., Li P., Modica J.A., Drou R.J., Farha O.K. Acid-resistant mesoporous metal-organic framework toward oral insulin delivery: protein encapsulation, protection, and release. *J. Am. Chem. Soc.* 2018;140(17):5678-5681. DOI 10.1021/jacs.8b02089
- Corella-Ochoa M.N., Tapia J.B., Rubin H.N., Lillo V., Gonzalez-Cobos J., Nunez-Rico J.L., Balestra S.R.G., Almora-Barrios N., Lledos M., Guell-Bara A., Cabezas-Gimenez J., Escudero-Adan E.C., Vidal-Ferran A., Calero S., Reynolds M., Marti-Gastaldo C., Galan-Mascaros J.R. Homochiral metal-organic frameworks for enantioselective separations in liquid chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* 2019;141(36):14306-14316. DOI 10.1021/jacs.9b06500
- Doyle L.M., Wang M.Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*. 2019;8(7):727. DOI 10.3390/cells8070727
- Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Immunological properties of gold nanoparticles. *Chem. Sci.* 2017;8(3):1719-1735. DOI 10.1039/c6sc03631g
- Eygeris Y., Gupta M., Kim J., Sahay G. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery. *Acc. Chem. Res.* 2022;55(1):2-12. DOI 10.1021/acs.accounts.1c00544
- Fant K., Esbjörner E.K., Lincoln P., Nordén B. DNA condensation by PAMAM dendrimers: self-assembly characteristics and effect on transcription. *Biochemistry*. 2008;47(6):1732-1740. DOI 10.1021/bi7017199
- Farha O.K., Eryazici I., Jeong N.C., Hauser B.G., Wilmer C.E., Sarjeant A.A., Snurr R.Q., Nguyen S.T., Yazaydin A.O., Hupp J.T. Metal-organic framework materials with ultrahigh surface areas: is the sky the limit? *J. Am. Chem. Soc.* 2012;134(36):15016-15021. DOI 10.1021/ja3055639
- Furukawa H., Cordova K.E., O'Keeffe M., Yaghi O.M. The chemistry and applications of metal-organic frameworks. *Science*. 2013;341(6149):1230444. DOI 10.1126/science.1230444
- Glass Z., Li Y., Xu Q. Nanoparticles for CRISPR-Cas9 delivery. *Nat. Biomed. Eng.* 2017;1(11):854-855. DOI 10.1038/s41551-017-0158-x
- Hanlon K.S., Kleinstiver B.P., Garcia S.P., Zaborowski M.P., Volak A., Spirig S.E., Muller A., Sousa A.A., Tsai S.Q., Bengtsson N.E., Loo C., Ingelsson M., Chamberlain J.S., Corey D.P., Aryee M.J., Joung J.K., Breakefield X.O., Maguire C.A., Gyorgy B. High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat. Commun.* 2019;10(1):4439. DOI 10.1038/s41467-019-12449-2
- Horcajada P., Gref R., Baati T., Allan P.K., Maurin G., Couvreur P., Ferey G., Morris R.E., Serre C. Metal-organic frameworks in biomedicine. *Chem. Rev.* 2012;112(2):1232-1268. DOI 10.1021/cr200256v
- Huang Y., Liu X., Dong L., Liu Z., He X., Liu W. Development of viral vectors for gene therapy for chronic pain. *Pain Res. Treat.* 2011;2011:968218. DOI 10.1155/2011/968218
- Jia C., Chen H., Wei M., Chen X., Zhang Y., Cao L., Yuan P., Wang F., Yang G., Ma J. Gold nanoparticle-based miR155 antagonist macrophage delivery restores the cardiac function in ovariectomized diabetic mouse model. *Int. J. Nanomedicine*. 2017;12:4963-4979. DOI 10.2147/IJN.S138400
- Kalimiraki M., Thermos K., Chaniotakis N.A. Dendrimers as tunable vectors of drug delivery systems and biomedical and ocular applications. *Int. J. Nanomedicine*. 2016;11:1-12. DOI 10.2147/IJN.S93069
- Kamerkar S., LeBleu V.S., Sugimoto H., Yang S., Ruivo C.F., Melo S.A., Lee J.J., Kalluri R. Exosomes facilitate therapeutic targeting of on-

- cogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*. 2017;546(7659):498-503. DOI 10.1038/nature22341
- Kanada M., Bachmann M.H., Hardy J.W., Frimannson D.O., Bronsart L., Wang A., Sylvester M.D., Schmidt T.L., Kaspar R.L., Butte M.J., Matin A.C., Contag C.H. Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(12):E1433-1442. DOI 10.1073/pnas.1418401112
- Kim D., Le Q.V., Wu Y., Park J., Oh Y.K. Nanovesicle-mediated delivery systems for CRISPR/Cas genome editing. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1233. DOI 10.3390/pharmaceutics12121233
- Lee B., Lee K., Panda S., Gonzales-Rojas R., Chong A., Bugay V., Park H.M., Brenner R., Murthy N., Lee H.Y. Nanoparticle delivery of CRISPR into the brain rescues a mouse model of fragile X syndrome from exaggerated repetitive behaviours. *Nat. Biomed. Eng.* 2018;2(7):497-507. DOI 10.1038/s41551-018-0252-8
- Li H., Wang K., Sun Y., Lollar C.T., Li J., Zhou H.-C. Recent advances in gas storage and separation using metal-organic frameworks. *Materials Today*. 2018;21(2):108-121. DOI 10.1016/j.mattod.2017.07.006
- Li Y., Chen Y., Li J., Zhang Z., Huang C., Lian G., Yang K., Chen S., Lin Y., Wang L., Huang K., Zeng L. Co-delivery of microRNA-21 antisense oligonucleotides and gemcitabine using nanomedicine for pancreatic cancer therapy. *Cancer Sci*. 2017;108(7):1493-1503. DOI 10.1111/cas.13267
- Li Y., Zhang K., Liu P., Chen M., Zhong Y., Ye Q., Wei M.Q., Zhao H., Tang Z. Encapsulation of plasmid DNA by nanoscale metal-organic frameworks for efficient gene transportation and expression. *Adv. Mater*. 2019;31(29):e1901570. DOI 10.1002/adma.201901570
- Liang K., Richardson J.J., Cui J., Caruso F., Doonan C.J., Falcaro P. Metal-organic framework coatings as cytoprotective exoskeletons for living cells. *Adv. Mater*. 2016;28(36):7910-7914. DOI 10.1002/adma.201602335
- Lin L., Fan Y., Gao F., Jin L., Li D., Sun W., Li F., Qin P., Shi Q., Shi X., Du L. UTMd-promoted co-delivery of gemcitabine and miR-21 inhibitor by dendrimer-entrapped gold nanoparticles for pancreatic cancer therapy. *Theranostics*. 2018;8(7):1923-1939. DOI 10.7150/thno.22834
- Liu C., Wan T., Wang H., Zhang S., Ping Y., Cheng Y. A boronic acid-rich dendrimer with robust and unprecedented efficiency for cytosolic protein delivery and CRISPR-Cas9 gene editing. *Sci. Adv.* 2019; 5(6):eaaw8922. DOI 10.1126/sciadv.aaw8922
- Liu J., Chang J., Jiang Y., Meng X., Sun T., Mao L., Xu Q., Wang M. Fast and efficient CRISPR/Cas9 genome editing *in vivo* enabled by bio-reducible lipid and messenger RNA nanoparticles. *Adv. Mater*. 2019;31(33):e1902575. DOI 10.1002/adma.201902575
- Lokugamage M.P., Vanover D., Beyersdorf J., Hatit M.Z.C., Rotolo L., Echeverri E.S., Peck H.E., Ni H., Yoon J.K., Kim Y., Santangelo P.J., Dahlman J.E. Optimization of lipid nanoparticles for the delivery of nebulized therapeutic mRNA to the lungs. *Nat. Biomed. Eng.* 2021; 5(9):1059-1068. DOI 10.1038/s41551-021-00786-x
- Lopez-Vidal E.M., Schisse C.K., Mohapatr S., Bellovoda K., Wu C.L., Woo J.A., Malmberg A.B., Loas A., Gomez-Bombarelli R., Pentelute B.L. Deep learning enables discovery of a short nuclear targeting peptide for efficient delivery of antisense oligomers. *JACS Au*. 2021;1(11):2009-2020. DOI 10.1021/jacsau.1c00327
- Lu S., Bao X., Hai W., Shi S., Chen Y., Yu Q., Zhang M., Xu Y., Peng J. Multi-functional self-assembled nanoparticles for pVEGF-shRNA loading and anti-tumor targeted therapy. *Int. J. Pharm.* 2020;575:118898. DOI 10.1016/j.ijpharm.2019.118898
- Lu Z.R., Laney V.E.A., Hall R., Ayat N. Environment-responsive lipid/siRNA nanoparticles for cancer therapy. *Adv. Healthc. Mater*. 2021; 10(5):e2001294. DOI 10.1002/adhm.202001294
- Luo Y.L., Xu C.F., Li H.J., Cao Z.T., Liu J., Wang J.L., Du X.J., Yang X.Z., Gu Z., Wang J. Macrophage-specific *in vivo* gene editing using cationic lipid-assisted polymeric nanoparticles. *ACS Nano*. 2018;12(2):994-1005. DOI 10.1021/acsnano.7b07874
- Lyu Y., Yang C., Lyu X., Pu K. Active delivery of CRISPR system using targetable or controllable nanocarriers. *Small*. 2021;17(24): e2005222. DOI 10.1002/sml.202005222
- Mbatha L.S., Maiyo F., Daniels A., Singh M. Dendrimer-coated gold nanoparticles for efficient folate-targeted mRNA delivery *in vitro*. *Pharmaceutics*. 2021;13(6):900. DOI 10.3390/pharmaceutics13060900
- Mintzer M.A., Simanek E.E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* 2009;109(2):259-302. DOI 10.1021/cr800409e
- Moscoco C.G., Steer C.J. The evolution of gene therapy in the treatment of metabolic liver diseases. *Genes (Basel)*. 2020;11(8):915. DOI 10.3390/genes11080915
- Mout R., Ray M., Lee Y.W., Scaletti F., Rotello V.M. *In vivo* delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic gene editing: progress and challenges. *Bioconjug. Chem.* 2017a;28(4):880-884. DOI 10.1021/acs.bioconjchem.7b00057
- Mout R., Ray M., Yesilbag Tonga G., Lee Y.W., Tay T., Sasaki K., Rotello V.M. Direct cytosolic delivery of CRISPR/Cas9-ribonucleoprotein for efficient gene editing. *ACS Nano*. 2017b;11(3):2452-2458. DOI 10.1021/acsnano.6b07600
- Nagasaki T., Shinkai S. The concept of molecular machinery is useful for design of stimuli-responsive gene delivery systems in the mammalian cell. *J. Incl. Phenom. Macrocy. Chem.* 2007;58(3-4):205-219. DOI 10.1007/s10847-007-9303-6
- Niggemann P., Gyorgy B., Chen Z.Y. Genome and base editing for genetic hearing loss. *Hear. Res.* 2020;394:107958. DOI 10.1016/j.heares.2020.107958
- Osorio-Toribio G., Velasquez-Hernandez M.J., Mileo P.G.M., Zarate J.A., Aguila-Rosas J., Leyva-Gomez G., Sanchez-Sanchez R., Magana J.J., Perez-Diaz M.A., Lazaro I.A., Forgan R.S., Maurin G., Lima E., Ibarra I.A. Controlled transdermal release of antioxidant ferulate by a porous Sc(III) MOF. *iScience*. 2020;23(6):101156. DOI 10.1016/j.isci.2020.101156
- Patel S., Ashwanikumar N., Robinson E., Xia Y., Mihai C., Griffith J.P., Hou S., Esposito A.A., Ketova T., Welsher K., Joyal J.L., Almarsson Ö., Sahay G. Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA. *Nat. Commun.* 2020;11(1):983. DOI 10.1038/s41467-020-14527-2
- Paz F.A., Klinowski J., Vilela S.M., Tomé J.P., Cavaleiro J.A., Rocha J. Ligand design for functional metal-organic frameworks. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41(3):1088-1110. DOI 10.1039/C1CS15055C
- Peng S., Bie B., Sun Y., Liu M., Cong H., Zhou W., Xia Y., Tang H., Deng H., Zhou X. Metal-organic frameworks for precise inclusion of single-stranded DNA and transfection in immune cells. *Nat. Commun.* 2018;9(1):1293. DOI 10.1038/s41467-018-03650-w
- Peng S., Liu J., Qin Y., Wang H., Cao B., Lu L., Yu X. Metal-organic framework encapsulating hemoglobin as a high-stable and long-circulating oxygen carriers to treat hemorrhagic shock. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019;11(39):35604-35612. DOI 10.1021/acsmi.9b15037
- Qiao J., Sun W., Lin S., Jin R., Ma L., Liu Y. Cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins for genome editing using chitosan-coated red fluorescent protein. *Chem. Commun. (Camb)*. 2019; 55(32):4707-4710. DOI 10.1039/c9cc00010k
- Ramakrishna S., Kwaku Dad A.B., Beloor J., Gopalappa R., Lee S.K., Kim H. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* 2014;24(6): 1020-1027. DOI 10.1101/gr.171264.113
- Ranjbar M., Pardakhty A., Amanatfard A., Asadipour A. Efficient drug delivery of beta-estradiol encapsulated in Zn-metal-organic framework nanostructures by microwave-assisted coprecipitation method. *Drug Des. Devel. Ther.* 2018;12:2635-2643. DOI 10.2147/DDDT.S173324
- Rui Y., Wilson D.R., Choi J., Varanasi M., Sanders K., Karlsson J., Lim M., Green J.J. Carboxylated branched poly(beta-amino ester) nanoparticles enable robust cytosolic protein delivery and CRISPR-

- Cas9 gene editing. *Sci. Adv.* 2019;5(12):eaay3255. DOI 10.1126/sciadv.aay3255
- Samuel M.S., Suman S., Venkateshkannan, Selvarajan E., Mathmani T., Pugazhendhi A. Immobilization of Cu₃(btc)₂ on graphene oxide-chitosan hybrid composite for the adsorption and photocatalytic degradation of methylene blue. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2020;204:111809. DOI 10.1016/j.jphotobiol.2020.111809
- Shcharbin D., Shakhbazov A., Bryszewska M. Poly(amidoamine) dendrimer complexes as a platform for gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2013;10(12):1687-1698. DOI 10.1517/17425247.2013.853661
- Shukla R., Bansal V., Chaudhary M., Basu A., Bhonde R.R., Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir.* 2005;21(23):10644-10654. DOI 10.1021/la0513712
- Singh A.V. Biopolymers in drug delivery: a review. *Pharmacology-online.* 2011;1:666-674
- Singh D., Sternberg S.H., Fei J., Doudna J.A., Ha T. Real-time observation of DNA recognition and rejection by the RNA-guided endonuclease Cas9. *Nat. Commun.* 2016;7:12778. DOI 10.1038/ncomms12778
- Somani S., Laskar P., Altawajry N., Kewcharoenpong P., Irving C., Robb G., Pickard B.S., Dufès C. PEGylation of polypropylenimine dendrimers: effects on cytotoxicity, DNA condensation, gene delivery and expression in cancer cells. *Sci. Rep.* 2018;8(1):9410. DOI 10.1038/s41598-018-27400-6
- Stolzenburg L.R., Harris A. Microvesicle-mediated delivery of miR-1343: impact on markers of fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2018;371(2):325-338. DOI 10.1007/s00441-017-2697-6
- Su H., Sun F., Jia J., He H., Wang A., Zhu G. A highly porous medical metal-organic framework constructed from bioactive curcumin. *Chem. Commun.* 2015;51(26):5774-5777. DOI 10.1039/c4cc10159f
- Tang M.X., Redemann C.T., Szoka F.C., Jr. *In vitro* gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 1996;7(6):703-714. DOI 10.1021/bc9600630
- Tao Y., Yi K., Hu H., Shao D., Li M. Coassembly of nucleus-targeting gold nanoclusters with CRISPR/Cas9 for simultaneous bioimaging and therapeutic genome editing. *J. Mater. Chem. B.* 2021;9(1):94-100. DOI 10.1039/d0tb01925a
- Taylor R.E., Zahid M. Cell penetrating peptides, novel vectors for gene therapy. *Pharmaceutics.* 2020;12(3):225. DOI 10.3390/pharmaceutics12030225
- Teplensky M.H., Fantham M., Poudel C., Hockings C., Lu M., Guna A., Aragones-Anglada M., Moghadam P.Z., Li P., Farha O.K., Fernández S.B.Q., Richards F.M., Jodrell D.I., Kaminski Schierle G., Kaminski C.F., Fairen-Jimenez D. A highly porous metal-organic framework system to deliver payloads for gene knockdown. *Chem.* 2019;5(11):2926-2941. DOI 10.1016/j.chempr.2019.08.015
- Vader P., Mager I., Lee Y., Nordin J.Z., Andaloussi S.E., Wood M.J. Preparation and isolation of siRNA-loaded extracellular vesicles. *Methods Mol. Biol.* 2017;1545:197-204. DOI 10.1007/978-1-4939-6728-5_14
- Valtchev V., Mintova S., Tsapatsis M. (Eds.). *Ordered Porous Solids. Recent Advances and Prospects.* Oxford, Amsterdam: Elsevier, 2009. DOI 10.1016/B978-0-444-53189-6.X0001-7
- Vinogradov V.V., Drozdov A.S., Mingabudinova L.R., Shabanova E.M., Kolchina N.O., Anastasova E.I., Markova A.A., Shtil A.A., Milichko V.A., Starova G.L., Precker R.L.M., Vinogradov A.V., Hey-Hawkins E., Pidko E.A. Composites based on heparin and MIL-101(Fe): the drug releasing depot for anticoagulant therapy and advanced medical nanofabrication. *J. Mater. Chem. B.* 2018;6(16):2450-2459. DOI 10.1039/c8tb00072g
- Wang C., Zhang Y., Dong Y. Lipid nanoparticle-mRNA formulations for therapeutic applications. *Acc. Chem. Res.* 2021;54(23):4283-4293. DOI 10.1021/acs.accounts.1c00550
- Wang H.X., Li M., Lee C.M., Chakraborty S., Kim H.W., Bao G., Leong K.W. CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: challenges and opportunities for nonviral delivery. *Chem. Rev.* 2017;117(15):9874-9906. DOI 10.1021/acs.chemrev.6b00799
- Wang Y., Shahi P.K., Xie R., Zhang H., Abdeen A.A., Yodsanit N., Ma Z., Saha K., Pattnaik B.R., Gong S. A pH-responsive silica-metal-organic framework hybrid nanoparticle for the delivery of hydrophilic drugs, nucleic acids, and CRISPR-Cas9 genome-editing machineries. *J. Control. Release.* 2020;324:194-203. DOI 10.1016/j.jconrel.2020.04.052
- Wang Z., Cohen S.M. Postsynthetic modification of metal-organic frameworks. *Chem. Soc. Rev.* 2009;38(5):1315-1329. DOI 10.1039/b802258p
- Yadav S., Sharma A.K., Kumar P. Nanoscale self-assembly for therapeutic delivery. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;8:127. DOI 10.3389/fbioe.2020.00127
- Yan Y., Liu X.Y., Lu A., Wang X.Y., Jiang L.X., Wang J.C. Non-viral vectors for RNA delivery. *J. Control. Release.* 2022;342:241-279. DOI 10.1016/j.jconrel.2022.01.008
- Yang J., Zhang Q., Chang H., Cheng Y. Surface-engineered dendrimers in gene delivery. *Chem. Rev.* 2015;115(11):5274-5300. DOI 10.1021/cr500542t
- Yang X., Tang Q., Jiang Y., Zhang M., Wang M., Mao L. Nanoscale ATP-responsive zeolitic imidazole Framework-90 as a general platform for cytosolic protein delivery and genome editing. *J. Am. Chem. Soc.* 2019;141(9):3782-3786. DOI 10.1021/jacs.8b11996
- Yang Z., Xie J., Zhu J., Kang C., Chiang C., Wang X., Wang X., Kuang T., Chen F., Chen Z., Zhang A., Yu B., Lee R.J., Teng L., Lee L.J. Functional exosome-mimic for delivery of siRNA to cancer: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J. Control. Release.* 2016;243:160-171. DOI 10.1016/j.jconrel.2016.10.008
- Yeh W.H., Chiang H., Rees H.A., Edge A.S.B., Liu D.R. *In vivo* base editing of post-mitotic sensory cells. *Nat. Commun.* 2018;9(1):2184. DOI 10.1038/s41467-018-04580-3
- Yu X., Liang X., Xie H., Kumar S., Ravinder N., Potter J., de Mollerat du Jeu X., Chesnut J.D. Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnol. Lett.* 2016;38(6):919-929. DOI 10.1007/s10529-016-2064-9
- Yu Y., Ren Y., Shen W., Deng H., Gao Z. Applications of metal-organic frameworks as stationary phases in chromatography. *Trends Anal. Chem.* 2013;50:33-41. DOI 10.1016/j.trac.2013.04.014
- Zarebkohan A., Najafi F., Moghimi H.R., Hemmati M., Deevband M.R., Kazemi B. Synthesis and characterization of a PAMAM dendrimer nanocarrier functionalized by SRL peptide for targeted gene delivery to the brain. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2015;78:19-30. DOI 10.1016/j.ejps.2015.06.024
- Zhang S., Shen J., Li D., Cheng Y. Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics.* 2021;11(2):614-648. DOI 10.7150/thno.47007
- Zhang Y., Sun C., Wang C., Jankovic K.E., Dong Y. Lipids and lipid derivatives for RNA delivery. *Chem. Rev.* 2021;121(20):12181-12277. DOI 10.1021/acs.chemrev.1c00244
- Zheng Q., Li W., Mao L., Wang M. Nanoscale metal-organic frameworks for the intracellular delivery of CRISPR/Cas9 genome editing machinery. *Biomater. Sci.* 2021;9(21):7024-7033. DOI 10.1039/d1bm00790d

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.09.2022. После доработки 21.07.2023. Принята к публикации 12.09.2023.