

Катионные липосомы как средства доставки нуклеиновых кислот

А.А. Михеев¹, Е.В. Шмендель², Е.С. Жестовская¹, Г.В. Назаров¹, М.А. Маслов^{2,@}

¹Научный центр «Сигнал», Москва, 107014 Россия

²МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова), Москва, 119571 Россия

@Автор для переписки, e-mail: tamaslov@mail.ru

Цели. Генная терапия основана на введении генетического материала в клетки, ткани или органы с целью лечения наследственных или приобретенных заболеваний. Ключевым фактором успеха генной терапии является развитие систем доставки, способных эффективно переносить генетический материал к месту их терапевтического действия, не вызывая каких-либо связанных с ними побочных эффектов. За последнее десятилетие много усилий было направлено на создание более эффективных и биосовместимых векторов, способных переносить нуклеиновые кислоты в клетки, не вызывая иммунного ответа. Катионные липосомы являются одним из самых универсальных инструментов для доставки нуклеиновых кислот в клетки, однако применение липосом для целей генной терапии ограничено неспецифичностью такой доставки. Это связано с наличием различных биологических барьеров на пути комплекса липосом с нуклеиновыми кислотами; например, с нестабильностью в биологических жидкостях; взаимодействиями с белками сыворотки крови, плазматической и ядерной мембранами; а также с эндосомной деградацией. В этом обзоре обобщены результаты исследований за последние годы по разработкам катионных липосом, эффективных *in vitro* и *in vivo*. Особое внимание уделено отдельным структурным элементам катионных липосом, определяющим эффективность трансфекции и цитотоксичность. Целью данного обзора являлось теоретическое обоснование выбора катионных липосом, наиболее перспективных для доставки нуклеиновых кислот в эукариотические клетки, а также изучение влияния состава катионных липидов на эффективность трансфекции *in vitro*.

Результаты. В результате проведенного анализа литературы можно утверждать, что одними из наиболее перспективных систем доставки нуклеиновых кислот являются катионные липиды на основе холестерина и спермина с добавлением липида-хелпера DOPE. Кроме того, было установлено, что варьирование состава катионных липосом, соотношения катионных липидов и нуклеиновых кислот, а также размера и дзета-потенциала липосом оказывают значительное влияние на эффективность трансфекции.

Выводы. Дальнейшие исследования в данном направлении должны включать в себя оптимизацию условий получения катионных липосом с учетом установленных закономерностей, а также физико-химических свойств. Необходимо исследовать возможности повышения эффективности доставки нуклеиновых кислот путем поиска оптимальных структур катионных липосом, определения соотношения компонентов липоплексов и изучения свойств и эффективности доставки многокомпонентных липосом *in vitro*.

Ключевые слова: липосомы, нуклеиновые кислоты, генная терапия, липиды, доставка.

Для цитирования: Михеев А.А., Шмендель Е.В., Жестовская Е.С., Назаров Г.В., Маслов М.А. Катионные липосомы как средства доставки нуклеиновых кислот. *Тонкие химические технологии*. 2020;15(1):7-27. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-1-7-27>

Cationic liposomes as delivery systems for nucleic acids

Aleksey A. Mikheev¹, Elena V. Shmendel², Elizaveta S. Zhestovskaya¹,
Georgy V. Nazarov¹, Mikhail A. Maslov^{2,@}

¹Scientific Center "Signal," Moscow, 107014 Russia

²MIREA – Russian Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow 119571, Russia

@Corresponding author, e-mail: mamaslov@mail.ru

Objectives. Gene therapy is based on the introduction of genetic material into cells, tissues, or organs for the treatment of hereditary or acquired diseases. A key factor in the success of gene therapy is the development of delivery systems that can efficiently transfer genetic material to the place of their therapeutic action without causing any associated side effects. Over the past 10 years, significant effort has been directed toward creating more efficient and biocompatible vectors capable of transferring nucleic acids (NAs) into cells without inducing an immune response. Cationic liposomes are among the most versatile tools for delivering NAs into cells; however, the use of liposomes for gene therapy is limited by their low specificity. This is due to the presence of various biological barriers to the complex of liposomes with NA, including instability in biological fluids, interaction with serum proteins, plasma and nuclear membranes, and endosomal degradation. This review summarizes the results of research in recent years on the development of cationic liposomes that are effective *in vitro* and *in vivo*. Particular attention is paid to the individual structural elements of cationic liposomes that determine the transfection efficiency and cytotoxicity. The purpose of this review was to provide a theoretical justification of the most promising choice of cationic liposomes for the delivery of NAs into eukaryotic cells and study the effect of the composition of cationic lipids (CLs) on the transfection efficiency *in vitro*.

Results. As a result of the analysis of the related literature, it can be argued that one of the most promising delivery systems of NAs is CL based on cholesterol and spermine with the addition of a helper lipid DOPE. In addition, it was found that varying the composition of cationic liposomes, the ratio of CL to NA, or the size and zeta potential of liposomes has a significant effect on the transfection efficiency.

Conclusions. Further studies in this direction should include optimization of the conditions for obtaining cationic liposomes, taking into account the physicochemical properties and established laws. It is necessary to identify mechanisms that increase the efficiency of NA delivery *in vitro* by searching for optimal structures of cationic liposomes, determining the ratio of lipoplex components, and studying the delivery efficiency and properties of multicomponent liposomes.

Keywords: liposomes, nucleic acids, gene therapy, lipids, delivery.

For citation: Mikheev A. A., Shmendel E. V., Zhestovskaya E. S., Nazarov G. V., Maslov M. A. Cationic liposomes as delivery systems for nucleic acids. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2020;15(1):7-27 (in Russ.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-1-7-27>

ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия – один из перспективных методов лечения широкого спектра заболеваний, основанный на введении терапевтических нуклеиновых кислот (НК) в организм и приводящий либо к экспрессии генетической конструкции, либо к частичному или полному подавлению функции поврежденного гена [1]. В отличие от низкомолекулярных лекарственных соединений, терапевтическое действие которых основано на связывании с белками-мишенями, НК могут регулировать клеточную экспрессию специ-

фических генов, контролируя уровень экспрессии функциональных белков.

К терапевтическим НК относятся малые интерферирующие РНК (small interfering RNA, siRNA), антисмысловые, антигенные и иммуностимулирующие олигонуклеотиды (ОДН), плазмидные ДНК (пДНК), а также рибозимы. Одним из первых типов НК, рассматриваемых в качестве объекта генной терапии, были пДНК [2].

Низкая эффективность доставки НК в клетки-мишени и создание условий для их длительного функционирования являются основными проблема-

ми генной терапии [1–3]. Терапевтический эффект молекул НК в гораздо большей степени, нежели низкомолекулярных соединений, определяется их физико-химическими свойствами. Так, например, НК отрицательно заряжены, разрушаются под действием сывороточных нуклеаз, а также быстро выводятся из организма через почки [4–6]. Эукариотические клетки не имеют возможности прямого захвата НК; в связи с этим возникает множество ограничений по использованию НК в качестве лекарственных средств, а именно низкая стабильность, короткий период полувыведения из организма и низкая эффективность доставки. Учитывая эти факторы, следует уделить особое внимание разработке эффективных систем доставки НК в эукариотические клетки, позволяющих решить перечисленные проблемы.

В подавляющем большинстве исследований для системной доставки НК в клетки используются вирусные векторы (ретровирусы, лентивирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые характеризуются высокой эффективностью трансфекции (ЭТ) клеток и обеспечивают высокий уровень экспрессии генов [7–9]. Однако эти векторы имеют ряд недостатков: канцерогенность [10], иммуногенность [11], тропизм к широкому спектру клеток [12], а также трудозатратное получение [13]. Кроме того, некоторые вирусные системы быстро выводятся из организма [14].

Использование для доставки НК невирусных векторов, таких как липосомы, полимеры, дендримеры, позволяет решать некоторые из перечисленных проблем. Так, они обладают низкой иммуногенностью и, как правило, не вызывают иммунного ответа [15]. Отсутствие ограничений в размере переносимых терапевтических НК, простота синтеза и возможность модификации структуры делают невирусные векторы перспективными системами доставки НК [16, 17]. Самый большой недостаток невирусных векторов – низкая ЭТ. Одним из возможных вариантов решения данной проблемы является использование в качестве невирусных векторов липосом с их разнообразной морфологией, составом, способностью включать в себя многие терапевтические биомолекулы.

Особое внимание в качестве невирусных систем доставки привлекают липосомы на основе катионных липидов (КЛ). Регулируя величину поверхностного заряда липосом путем изменения липидного состава, можно контролировать степень взаимодействия липосом с отрицательно заряженными НК. Липосомы, состоящие из КЛ, являются биodeградируемыми благодаря эндогенным ферментам, способным разрушать липидные компоненты липосом после введения в организм. Кроме того, поверхность катионных липосом можно модифицировать введением полиэтиленгликольных остатков или адресных

лигандов [18, 19], а включение в липидный бислой липофильных химиотерапевтических препаратов может обеспечить совместную доставку лекарственного средства и терапевтических НК [20, 21].

Образование липоплексов (комплексов отрицательно заряженных НК и положительно заряженных липидов/липосом) происходит в результате электростатических взаимодействий. Размер образующихся липоплексов в основном зависит от типа используемых КЛ и количественного соотношения положительно заряженных атомов азота КЛ и отрицательно заряженных фосфатных групп НК (соотношение N/P). Условия получения липоплексов (концентрация НК, pH и состав буферного раствора) также позволяют регулировать их размер. Как правило, липоплексы формируются с небольшим избытком положительного заряда, чтобы в дальнейшем они смогли вступить во взаимодействие с отрицательно заряженными компонентами мембраны клетки.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ БАРЬЕРЫ

Большинство липоплексов в условиях *in vivo* подвергаются структурным изменениям и могут разрушаться под действием эндогенных факторов, которые обусловлены наличием ряда внеклеточных (взаимодействие с компонентами крови, эндотелиальные барьеры, клеточная мембрана) и внутриклеточных (клеточный захват, высвобождение из эндосом, внутриклеточный перенос, доставка в ядро) барьеров [22, 23].

Взаимодействие липоплексов с компонентами крови играет существенную роль в их биологическом распределении [24–26] и может спровоцировать быстрое выведение липоплексов из кровотока за счет захвата тканевыми макрофагами ретикулоэндотелиальной системы организма [27]. Известно, что с поверхностью липоплексов связываются белки сыворотки крови, такие как альбумины, липопротеины высокой и низкой плотности и т.п. Кроме того, на скорость клиренса липоплексов влияет баланс адсорбированных опсоинов, которые по-разному распознаются рецепторами на поверхности макрофагов [28–30]. Положительный заряд липоплексов активизирует систему комплемента и тем самым ускоряет процесс их выведения [31]. В целом, более крупные липоплексы быстрее выводятся из организма, чем частицы меньшего размера [32].

Было показано, что поглощение комплексов катионных липосом с siRNA может привести к активации врожденного иммунитета [33–35] путем воздействия на РНК-чувствительные Toll-подобные рецепторы, индуцируя воспалительные цитокины; при этом возникает ответная реакция в виде продукции интерферона [35]. Иммунный ответ также может быть вызван самими катионными липосомами даже без присутствия siRNA [36].

Липоплексы, которым удалось избежать клиренса, достигают ткани-мишени, но на их пути возникает эндотелиальный барьер – плотная сеть внутриклеточного матрикса, затрудняющая диффузию комплексов липосом с НК к клеткам-мишеням [37].

Общепризнано, что проникновение липоплексов через клеточную мембрану обусловлено электростатическим взаимодействием между КЛ липоплексов и отрицательно заряженной поверхностью клетки [38]. Эндоцитоз является наиболее распространенным путем проникновения липоплексов и включает в себя множество механизмов поглощения, таких как клатрин- и кавеолин-опосредованный эндоцитоз; макропиноцитоз; а также пути, которые являются как клатрин-, так и кавеолин-независимыми. Дополнительный механизм поглощения – фагоцитоз – доступен лишь специальным клеткам, таким как макрофаги и дендритные клетки [38]. «Выбор» механизма поглощения обусловлен размером поглощаемых липоплексов, типом трансфицируемых клеток и составом катионных липосом.

После проникновения внутрь клетки важным этапом транспортного пути липоплексов является их выход из эндосом. Существует несколько механизмов высвобождения НК. Липосомы на основе монокатионных липидов преимущественно высвобождают свое содержимое в цитозоль с помощью механизма липидного смешивания. Сущность данного механизма заключается в слиянии мембран липоплекса и эндосом; при этом КЛ стимулируют перемещение отрицательно заряженных фосфолипидов мембраны к внутренней поверхности эндосом. В результате происходит дестабилизация эндосомальной мембраны и высвобождение НК в цитоплазму [39]. Следует отметить, что наличие в составе липосом специальных липидов-хелперов (см. раздел «Липиды-хелперы») способствует слиянию липоплексов с эндосомальной мембраной и ее дестабилизации.

Второй механизм высвобождения НК из липоплексов называется «эффектом протонной губки». Он характерен для КЛ, содержащих большое количество вторичных или третичных аминогрупп, которые имеют значения pK_a между физиологическим и лизосомальным pH (обычно 5.5–6.0). При закислении среды внутри эндосом аминогруппы КЛ протонируются, что способствует дополнительному притоку несвязанных хлорид-анионов. Чтобы компенсировать увеличенное поглощение ионов, в эндосомы поступают дополнительные молекулы воды, вызывая ее осмотическое набухание и разрыв [39].

После высвобождения из эндосом и попадания в цитоплазму НК должна быть доставлена в целевой компартмент клетки для достижения желаемого биологического действия. Для НК, активность которых проявляется в цитоплазме, таких как олигодезоксирибонуклеотиды и siRNA, этот барьер неактуален,

а для пДНК целевым компартментом является ядро. Подвижность больших молекул, таких как пДНК, в цитоплазме чрезвычайно низка, что делает их восприимчивыми к деградации под действием цитоплазматических нуклеаз [40].

Определяющим фактором для скорости передвижения пДНК через цитоплазму является размер и структура молекулы пДНК; кольцевая пДНК движется быстрее, чем линейная [41]. Влияние плотности упаковки пДНК на эффективность доставки изучено недостаточно, однако уплотнение структуры может приводить к повышению подвижности и устойчивости пДНК к цитоплазматическим нуклеазам.

Наконец, для экспрессии пДНК требуется преодоление последнего внутриклеточного барьера – ядерной мембраны. При делении клеток пДНК могут проникать в ядро во время нарушения целостности ядерной мембраны; однако в неделящихся клетках пДНК проходят сквозь мембрану через комплекс ядерных пор, который способен переносить молекулы размером до 9 нм и массой менее 40 кДа путем свободной диффузии [42]. Введение в состав липоплексов пептидной последовательности «сигнала ядерной локализации» способствует более эффективному переносу пДНК через ядерную мембрану [39].

Таким образом, при проведении трансфекции клеток липоплексами необходимо учитывать не только их характеристики, но и существование внеклеточных и внутриклеточных барьеров.

КАТИОННЫЕ ЛИПИДЫ

Среди невирусных векторов использование катионных липосом в качестве системы доставки НК привлекло большое внимание разработчиков новых лекарственных препаратов из-за их явных преимуществ, таких как простота приготовления, воспроизводимость и биоразлагаемость, а также коммерческая доступность [43]. Основные структурные компоненты липосом – КЛ – представляют собой амфифильные молекулы, которые могут быть легко получены в ходе химического синтеза и использованы для изучения взаимосвязи структура–трансфицирующая активность.

Среди КЛ для конструирования катионных липосом наиболее широко применяются:

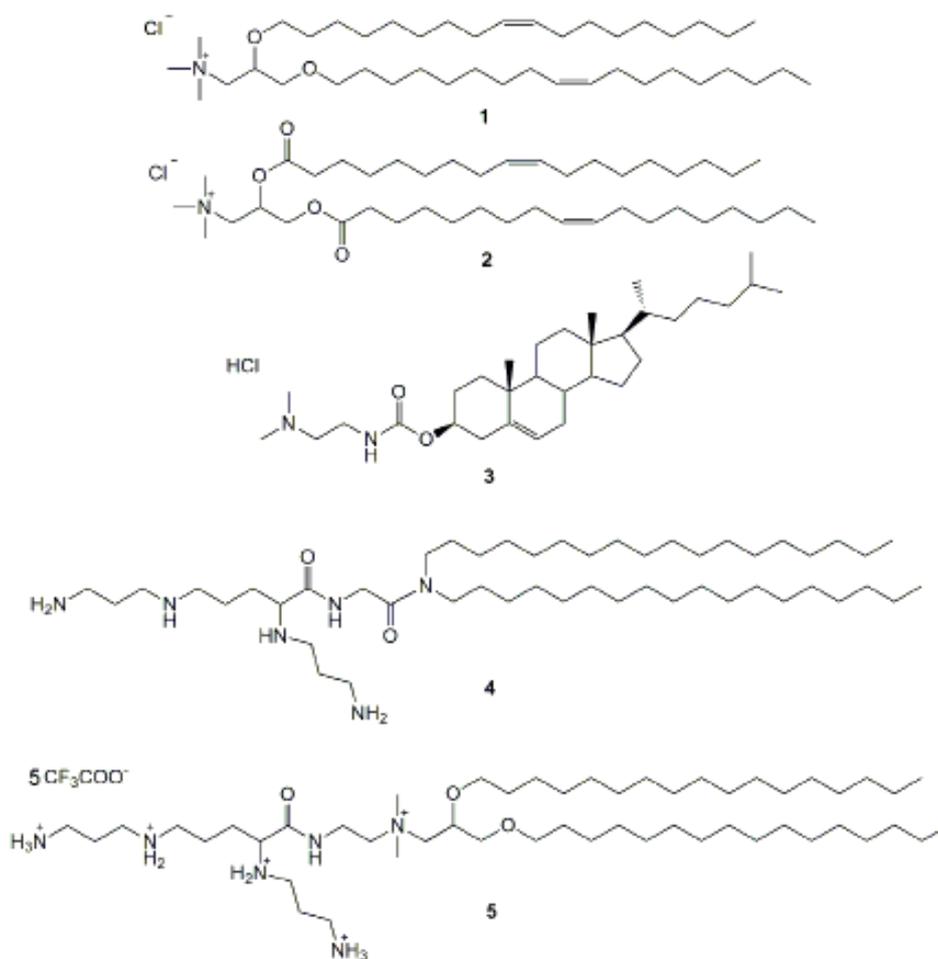
N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-*N,N,N*-триметиламмоний хлорид (**1**, DOTMA) [17];

N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-*N,N,N*-триметиламмоний хлорид (**2**, DOTAP) [17];

3β-[*N*-(*N',N'*-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерин гидрохлорид (**3**, DC-Chol) [8];

диокадециламидоглицилспермин (**4**, DOGS) [3];

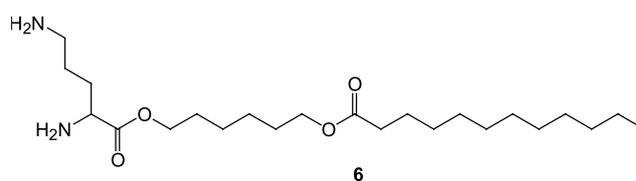
2,3-диолеилокси-*N*-[2-(сперминкарбоксамидо)этил]-*N,N*-диметил-1-пропиламмоний пентафтор-ацетат (**5**, DOSPA) [3].



Катионные липиды состоят из четырех основных структурных единиц: гидрофильная катионная группа (ГКГ); спейсерная группа (СГ); линкерная группа (ЛГ); гидрофобный домен (ГД). Катионная природа липида определяется структурой его гидрофильной группы, которую формируют первичные, вторичные, третичные амины, четвертичные аммонийные группы, аминокислоты или короткие пептиды, а также гетероциклические основания [43]. Экспериментально доказано, что КЛ на основе четвертичных аммониевых солей более токсичны по сравнению с аналогами, содержащими третичные аминогруппы [44]. Для связывания и доставки НК возможно использование КЛ, содержащих заряженные атомы фосфора или мышьяка, что приводит к увеличению ЭТ и снижению токсичности [45].

Гидрофобный домен КЛ чаще всего формируется длинноцепочечными углеводородными заместителями (от 12 до 20 атомов углерода) или холестерином. Было установлено, что КЛ с одной углеводородной цепью проявляют большую токсичность и обладают более низкой ЭТ по сравнению с КЛ с двумя цепями [46]. Однако было показано, что соединение **6**, содержащее один остаток додекановой кислоты в качестве ГД, оказалось не только более эффективным, но и менее токсичным, чем DOTAP (**2**) [47]. Учитывая

различную зависимость ЭТ от токсичности КЛ, а также строения их гидрофобного домена, последний должен подбираться отдельно.



Линкерная группа (сложноэфирная, эфирная, карбамоильная, дисульфидная) соединяет ГД и ГКГ, определяет стабильность и способность КЛ к биодegradации, что также влияет на ЭТ. DOTMA (**1**) с простой эфирной связью проявляет высокую ЭТ, но при этом слишком стабилен, чтобы подвергаться биодegradации в организме, что объясняет его высокую токсичность. Липиды со сложноэфирными линкерами, например, соединение **2**, легче подвергаются биодegradации при попадании в системный кровоток [48]. При использовании карбамоильной связи в качестве ЛГ (липид **3**) снижение значения рН будет действовать как «спусковой крючок» для разделения гидрофобной и гидрофильной частей КЛ и, таким образом, способствовать высвобождению НК после проникновения в клетку и попадания в эндосому [49, 50]. Соединения, содержащиеся в качестве

линкерной группы чувствительные к действию восстановителей дисульфидные связи, стабильны в кровотоке, но разрушаются после проникновения в цитозоль под действием глутатиона и/или редуктаз, что может быть использовано для улучшения ЭТ [51]. Однако наличие дисульфидной связи в качестве ЛГ в соединении **7** приводило к полной потере экспрессии гена люциферазы в клетках HepG2 и HeLa [52].

Спейсерная группа (глицерин, аминокислоты, олигометиленовые группы, полиэтиленгликоли и т.д.) служит для разнесения в пространстве ГД и ГКГ. Длина СГ оказывает влияние на токсичность и ЭТ. Так, для КЛ **8** на основе холестерина увеличение длины СГ до 3 атомов в углеродной цепи приводит к снижению цитотоксичности КЛ *in vitro* и *in vivo* [53].

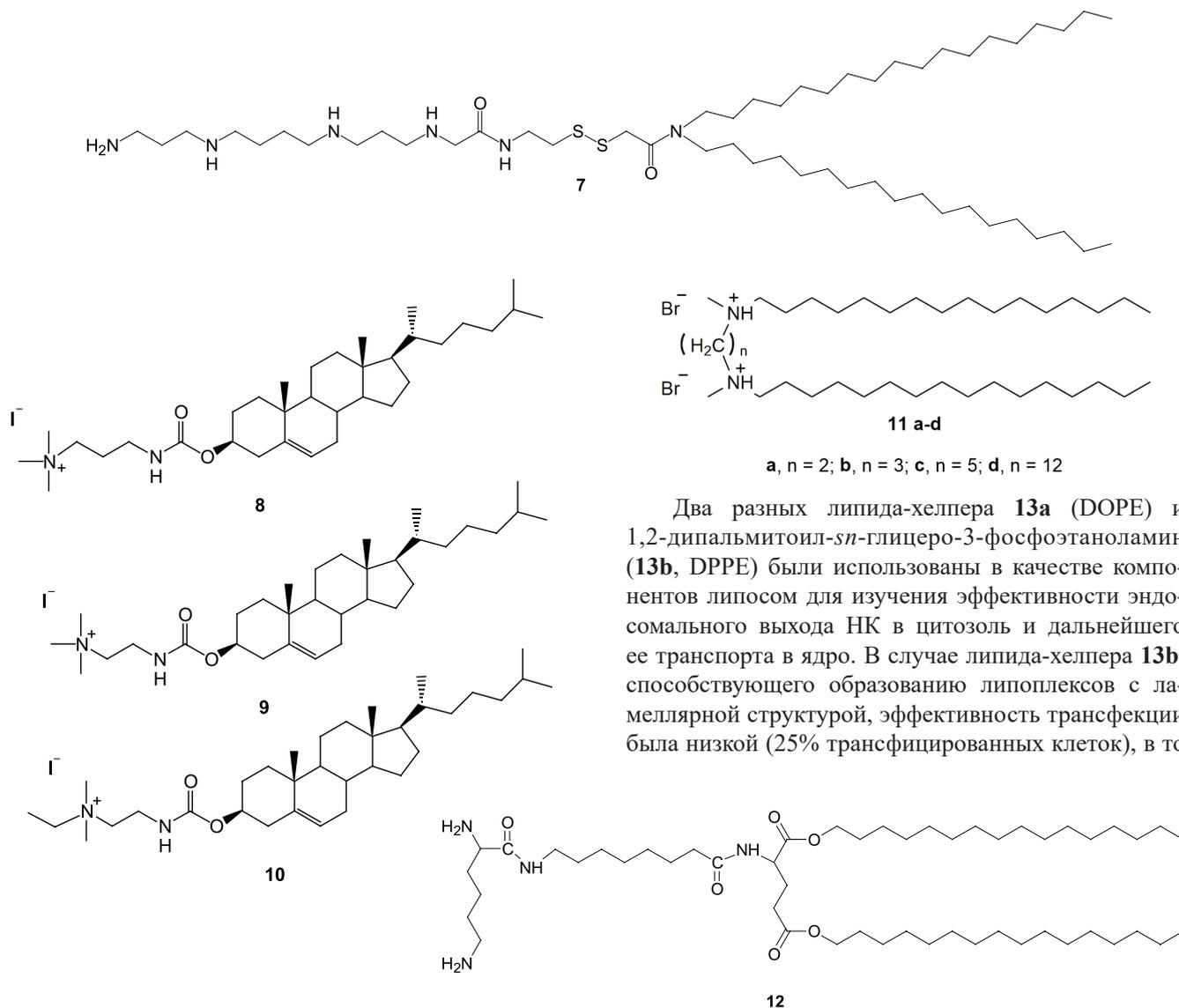
При использовании спейсеров одной длины, но ГКГ с различной структурой, было показано, что замена метильной группы в соединении **9** на этильную в соединении **10** приводит к увеличению как токсичности, так и ЭТ *in vitro* [53].

Катионные гемини-амфифилы **11a** и **11b** с короткими СГ способствовали более высокой ЭТ, чем их аналоги **11c** и **11d** с длинными спейсерами [54].

Кроме длины, важную роль в доставке НК играет гидрофобность СГ. При сравнении ЭТ липосом на основе КЛ с гидрофобными олигометиленовыми спейсерами ($n = 3, 5, 7, 11$) и гидрофильным заместителем на основе короткого триоксиэтиленового фрагмента максимальный уровень экспрессии был достигнут при использовании липида **12** с гептаметиленовым спейсером [55].

ЛИПИДЫ-ХЕЛПЕРЫ

Катионные липосомы могут формироваться только из одного КЛ, однако добавление в их состав дополнительного нейтрального липида-хелпера может увеличить ЭТ [56]. Среди липидов-хелперов наиболее часто используются 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (**13a**, DOPE) [19] и фосфатидилхолин (**14**, PC) [57].



Два разных липида-хелпера **13a** (DOPE) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (**13b**, DPPE) были использованы в качестве компонентов липосом для изучения эффективности эндосомального выхода НК в цитозоль и дальнейшего ее транспорта в ядро. В случае липида-хелпера **13b**, способствующего образованию липоплексов с ламеллярной структурой, эффективность трансфекции была низкой (25% трансфицированных клеток), в то

время как при использовании липида **13a**, формирующего инвертированную гексагональную фазу, количество трансфицированных клеток увеличивалось до 75% [58]. В отличие от ламеллярной структуры, представляющей собой повторяющиеся слои пДНК и КЛ, инвертированная гексагональная структура способствует конденсации пДНК внутри цилиндров [19], которые собираются за счет Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий между липидными «хвостами».

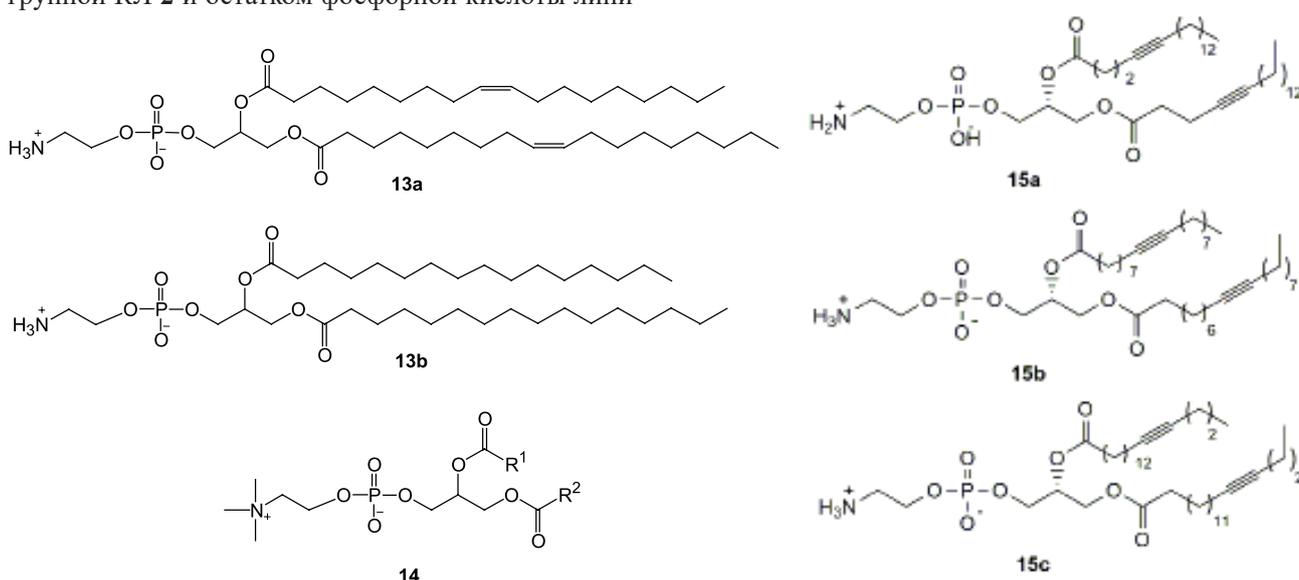
Использование DOPE в качестве липида-хелпера в составе различных катионных липосом приводит к повышению ЭТ многих клеточных линий [19, 56, 59], поскольку в условиях эндосомального закисления при понижении значения pH он способен формировать инвертированную гексагональную фазу и тем самым дестабилизировать мембрану эндосом. Так, исследование мицелл, сформированных DOPE, показало, что при снижении pH от 10.8 до 7 происходит переход сферических мицелл к гексагонально упакованным цилиндрам [60]. Оптимальным диапазоном для такого перехода является значение pH от 9 до 7. Этот переход связан с цвиттер-ионной природой полярной головки группы DOPE. При высоких значениях pH фосфатная группа заряжена отрицательно, что обуславливает отталкивание гидрофильных групп соседних молекул. При снижении значений pH происходит формирование водородных связей, которые вместе с электростатическим взаимодействием являются причиной формирования гексагонально упакованных структур.

Липоплексы, сформированные пДНК и липосомами на основе КЛ **2**, эффективно образовывались начиная с соотношения N/P = 2:1 и выше [59]. Введение DOPE в состав липосом и дальнейшая инкубация с ДНК приводит к образованию отрицательно заряженного липоплекса. Формирование солевых мостиков между положительно заряженной гидрофильной группой КЛ **2** и остатком фосфорной кислоты липи-

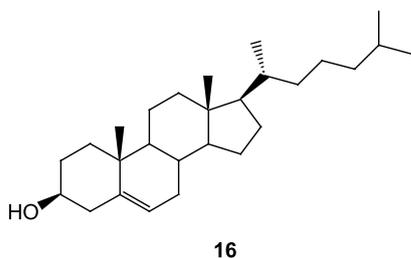
да DOPE позволяет первичной аминогруппе DOPE стабилизироваться на поверхности липосом и более тесно взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. Следует отметить, что при высоких соотношениях N/P = 6:1 и выше происходило образование компактных и однородных липоплексов с высоким положительным зарядом. Также липид DOPE может обеспечить доступность гидрофильных катионных групп КЛ для связывания с ДНК, тем самым снижая энергию взаимодействия [59]. Таким образом, использование DOPE обеспечивает эффективный выход из эндосом компактизированной НК посредством дестабилизации эндосомальной мембраны [58, 61], а также способствует более компактной упаковке спиралей ДНК [62, 63].

Фосфатидилхолин (**14**, PC) представляет собой группу фосфолипидов, содержащих остаток холина в качестве гидрофильной группы и фосфатидную кислоту с различными ацильными остатками в качестве гидрофобного домена [57]. Однако использование PC в качестве липида-хелпера, формирующего ламеллярную структуру в составе катионных липосом, приводило к понижению ЭТ, в отличие от DOPE [56].

Низкая температура фазового перехода DOPE (10 °C) обуславливает низкую стабильность катионных липосом и липоплексов в экспериментах *in vivo*. Одним из подходов к решению данной проблемы является синтез аналогов DOPE, фазовый переход которых находится вблизи температуры организма человека (~37 °C). Были синтезированы аналоги DOPE **15a–c**, в которых *цис*-двойная связь в двух ацильных остатках заменена тройной связью, расположенной в разных положениях углеводородных заместителей [64]. Такая химическая модификация позволила сформировать новую межмолекулярную упаковку, способствующую увеличению температуры фазового перехода в физиологических условиях.

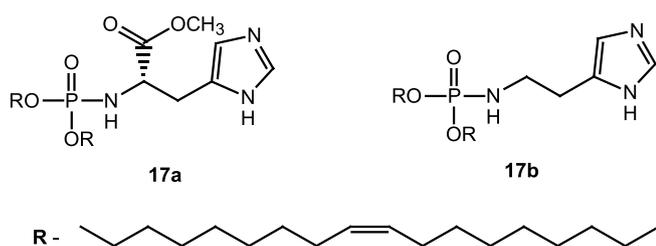


Холестерин (16, Chol) является еще одним популярным липидом-хелпером [65–72]. Увеличение количества холестерина до 66.7% в составе липосом с КЛ 3 привело к образованию стабильных частиц, обеспечивающих высокую ЭТ клеток в присутствии сыворотки крови. Дальнейший рост количества холестерина до 80% не изменял ЭТ [66].



Было обнаружено, что некоторые КЛ имеют высокое сродство к липиду-хелперу и проявляют активность только с холестерином или только с DOPE. Часто липосомы, содержащие в качестве липида-хелпера холестерин, более эффективны при трансфекции клеток, чем липосомы с фосфолипидами, что, возможно, связано с эндогенной природой холестерина [73].

Другой подход к поиску более эффективных липидов-хелперов был реализован путем синтеза совершенно новых липидов 17a и 17b с имидазольной полярной группой, которые не заряжены при физиологическом pH, а их протонирование в эндосомах индуцирует слияние липоплексов с эндосомальной мембраной и способствует высвобождению НК в цитозоль. Стоит отметить, что новые липиды-хелперы 17a и 17b в составе катионных липосом могут улучшить трансфекцию в 100 раз по сравнению с DOPE [74].



Таким образом, эффективность доставки НК может быть оптимизирована путем добавления липидов-хелперов в состав катионных липосом.

КОММЕРЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ КАТИОННЫХ ЛИПИДОВ

На сегодняшний день существует ряд коммерческих препаратов на основе КЛ: липофектамыны (Lipofectamine 2000, Lipofectamine 3000, Lipofectamine RNAiMAX, Lipofectamine MessengerMAX, Lipofectamine CRISPRMAX, Lipofectamine LTX,

Lipofectamine Stem), липофектин (Lipofectin), липофектейс (LipofectACE), трансфектейс (TransfectACE), трансфектам (Transfectam), селлфектин (Cellfectin и Cellfectin II) и др. [75–79].

С момента запуска в масштабное производство в 1993 году липофектамин и его аналоги наиболее часто используются для трансфекции клеток [80]. Обладая высокой ЭТ широкого диапазона клеточных линий и способностью переносить различные типы НК, липофектамыны считаются «золотым стандартом» среди трансфицирующих реагентов и наиболее часто используются для сравнительной оценки эффективности при разработке как новых КЛ, так и альтернативных методов трансфекции.

Lipofectamine 2000 (Lf 2000) представляет собой смесь поликатионного липида 5 и нейтрального липида DOPE в мольном соотношении 3:1 [78]. При выборе подходящего трансфицирующего агента необходимо учитывать тип доставляемой НК. Существуют универсальные реагенты Lf 2000 и Lf 3000, которые используются для доставки ДНК и РНК. Lipofectamine RNAiMAX [81, 82] и Lipofectamine MessengerMAX были разработаны специально для трансфекции клеток siRNA и микроРНК, соответственно.

Lf 2000 успешно трансфицирует клетки почек новорожденных хомячков (ВНК-21), эмбриональные фибробласты мыши (NIH 3T3), клетки африканской зеленой мартышки (COS-1), клетки эпителия толстого кишечника человека (HT-29), диплоидные клетки человека (MRC-5) и клетки рака молочной железы (SK-BR3). Lf 3000 является усовершенствованной версией реагента Lf 2000 и успешно трансфицирует самые разнообразные биологически релевантные типы клеток [78, 83–85]. Его отличительной чертой является высокая ЭТ в присутствии сыворотки крови, в связи с чем отпадает необходимость смены культуральной среды после трансфекции, а также наличия второго компонента, который используется только для доставки пДНК.

Lipofectamine LTX – эффективный трансфицирующий реагент для работы с трудно трансфицируемыми, чувствительными клетками и первичными клеточными культурами. В свою очередь, Lipofectamine Stem был разработан специально для трансфекции стволовых клеток. Invivofectamine 3.0 подходит для доставки НК *in vivo* [86–88], в частности siRNA и микроРНК-дуплексов в клетки печени мыши путем инъекции липоплексов в хвостовую вену.

Трансфицирующий агент Lipofectin представляет собой смесь липидов 1 и DOPE, взятых в мольном соотношении 1:1, и применяется для трансфекции широкого спектра клеток [89, 90]. Считается, что ДНК самопроизвольно взаимодействует с липидом 1 по тому же принципу, как и с липидом 5; при этом 100% ДНК находится в составе липоплексов.

На основе липополиамины **4** создан коммерческий препарат Transfectam, который эффективно доставляет НК в клетки кортикотропной опухоли (AtT20) и NIH 3T3 [91, 92].

Изучение возможности использования самых простых поверхностно-активных веществ для трансфекции эукариотических клеток показало, что липосомы на основе диметилдиоктадециламмоний бромида (**18**, DDAB) и DOPE оказались более эффективными, чем Lipofectin [93, 94], в связи с чем был запатентован препарат TransfectACE (или LipofectACE), содержащий соединение **18** и DOPE в мольном соотношении 1:2.5.

Трансфицирующие агенты Cellfectin и Cellfectin II представляют собой смесь *N,N,N,N*-тетраметил-*N,N,N,N*-тетра(гексадецил)спермина (**19**, TM-TPS) и DOPE в мольном соотношении 1:1.5. Эти реагенты подходят для трансфекции как клеток млекопитающих, так и клеток насекомых (Sf9, Sf21 и S2) [78, 79, 94].

Трансфицирующий агент DMRIE-C, состоящий из 1,2-ди(тетрадецилокси)пропил-3-*N*-2-гидроксиэтил-*N,N*-диметиламмоний бромида **20** и холестерина в мольном соотношении 1:1, подходит для трансфекции эукариотических клеток и особенно эффективен для трансфекции суспензионных культур (например, клеток Т-лимфобластной лейкемии человека, Jurkat), а также других клеточных линий, полученных из лимфоидных клеток [95, 96].

Oligofectamine представляет собой запатентованную композицию для доставки ОДН и siRNA в эукариотические клетки. За счет образования стабильных комплексов с ОДН он эффективно трансфицирует эукариотические клетки, включая клетки яичников китайских хомячков (CHO), клетки эмбриона почки человека (HEK 293), NIH 3T3 и клетки рака шейки матки человека (HeLa) [97].

Несмотря на большое разнообразие существующих трансфицирующих агентов, разработка систем доставки, способных переносить различные типы НК *in vitro* и *in vivo* с высокой эффективностью и не оказывать токсического воздействия на жизнедеятельность клеток, приводит к появлению все новых и новых липосом.

ЛИПОСОМЫ НА ОСНОВЕ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ КАТИОННЫХ ЛИПИДОВ

За последние два десятилетия было опубликовано большое количество работ, в которых катионные липосомы используются в качестве носителей для доставки НК *in vitro* и *in vivo*. Формирование комплексов липосом с НК и их способность трансфицировать эукариотические клетки зависят как от состава липосом, так и от особенностей строения КЛ. Кроме того, соотношение компонент комплексов (определяется соотношением N/P) и их физико-химические характеристики (размер и дзета-потенциал) также определяют эффективность трансфекции клеток.

Относительно недавно было высказано предположение, что проникновение липоплексов в клетку происходит при участии специальных переносчиков холестерина. Присутствующий в клеточных мембранах холестерин нарушает плотную упаковку фосфолипидов и уменьшает их текучесть мембран, а также их проницаемость для малых водорастворимых молекул. Поскольку энергетический барьер для «флип-флоп»-перехода молекул холестерина оказывается низким, его перераспределение между слоями осуществляется быстро, что влияет на клеточное поглощение комплексов, образование и деградацию эндосом [98].

Использование холестеринсодержащих КЛ или холестерина в качестве липида-хелпера приводит к повышению ЭТ [66]. Это может быть обусловлено образованием в структуре липоплексов холестеринных нанодоменов, которые опосредуют эндоцитоз и/или внутриклеточный транспорт комплексов. Кроме того, холестерин в составе КЛ защищает НК от деградации нуклеазами в организме, снижает связывание липоплексов с белками сыворотки крови, тем самым улучшая доставку НК. Таким образом, использование КЛ на основе холестерина может привести к значительному увеличению эффективности доставки НК и ее экспрессии [59, 66, 67, 99–105].

Один из самых широко используемых КЛ на основе холестерина DC-Chol (**3**) эффективно доставлял НК в различные эукариотические клетки, как самостоятельно, так и в сочетании с другими липидами [59, 66, 68, 99, 100]. Помимо него, были синтезированы и другие КЛ (**21–26**) на основе холестерина (табл. 1) для доставки различных типов НК.

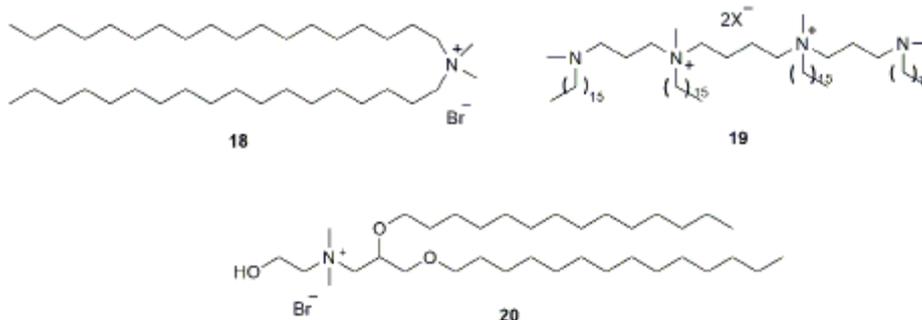
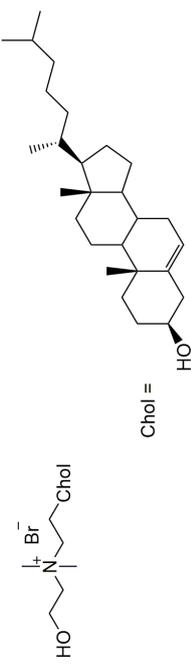
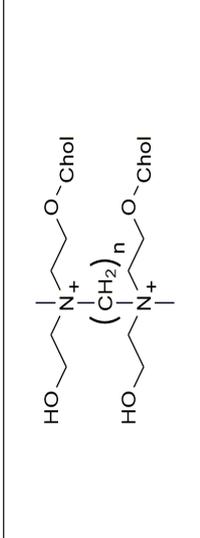
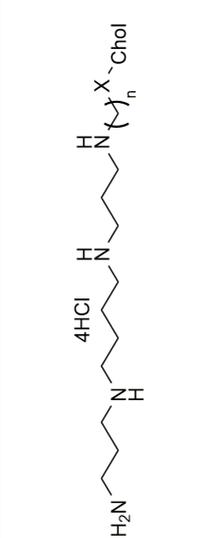
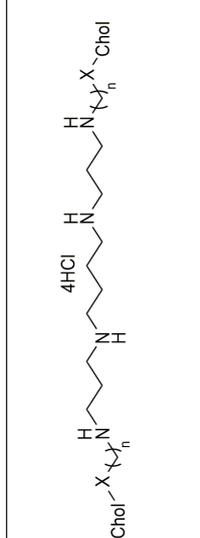
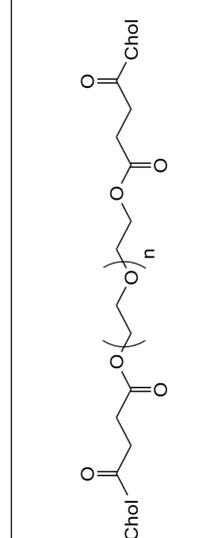


Таблица 1. КЛ на основе холестерина
Table 1. CL based on cholesterol

	Структура КЛ CL structure	КЛ:липид- хелпер, мольное соотн. CL:helper lipid, molar ratio	Доставляемая НК Transferred NA	Тип клеток Cell type	IC ₅₀ ¹ , мкМ IC ₃₀ ¹ , μM	TK ² , % TC ² , %		СИФ ³ , отн. ед. MFP ³ , rel. unit	Источник Source
						FBS (-) / FBS (+) ⁴			
21		21-DOPE, 1:1		HeLa ⁶	>80 / >80	70 / 20	20 / 20	[101]	
22a		22a-DOPE, 1:1	pEGFP-C3 ⁵	HeLa ⁶	>80 / >80	60 / 40	20 / 30	[101]	
22b		22b-DOPE, 1:1				70 / 70	25 / 30		
22c		22c-DOPE, 1:2				70 / 50	75 / 60		
22d		22d-DOPE, 1:2				55 / 45	55 / 55		
22e		22e-DOPE, 1:2				45 / 40	30 / 55		
23a		23a-DOPE, 1:1		HEK 293 ⁷	36.0 / 35.0	55 / 29.6	30 / 21.4	[59]	
23b		23b-DOPE, 1:1	pEGFP-C2		37.2 / 37.3	68 / 44.2	55 / 42.1		
23c		23c-DOPE, 1:1			38.8 / 35.5	45 / 18.9	18 / 9.1		
24a		24a-DOPE, 1:1			>80	35 / 21.5	12 / 5.9	[59]	
24b		24b-DOPE, 1:1	pEGFP-C2	HEK 293	>80 / 71.9	35 / 21.8	10 / 3.3		
24c		24c-DOPE, 1:1			40.5 / 37.1	70 / 75.7	29 / 42		
25a		2-16-25a		SKOV-3 ⁸	100 / n.d. ¹⁰	20 / n.d.		[102]	
25b		2-16-25b	pEGFP	A549 ⁹	n.d.	17 / n.d.	n.d.		
25c		2-16-25c			SKOV-3	143 / n.d.	7 / n.d.		n.d.

Сравнительное исследование эффективности липосом, состоящих из мономерного КЛ (**21**) или димерных КЛ (**22a–e**) и липида-хелпера DOPE, которое проводили как в отсутствие (–FBS), так и в присутствии (+FBS) сыворотки крови (табл. 1), показало, что в отсутствие сыворотки липосомы на основе КЛ **21** трансфицировали около 70% клеток со средней интенсивностью флуоресценции (СИФ) 20 отн. ед., в то время как липосомы на основе КЛ **22a–e** трансфицировали 45–70% клеток с СИФ 20–75 отн. ед. В присутствии сыворотки крови ЭТ мономерных КЛ снизилась до ~20%, а димерных КЛ – до 40%. Липосомы на основе КЛ **22d–e** оказались токсичными в отсутствие сыворотки в культуральной среде [101].

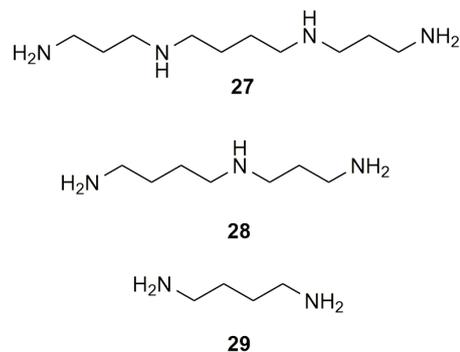
Трансфицирующая активность липосом на основе поликатионных липидов зависит от типа линкера, длины спейсера и количества остатков холестерина. Липосомы, состоящие из КЛ **24c** (табл. 1), содержащего два холестеринных остатка, карбамоильный линкер и спейсер из шести метиленовых звеньев, и DOPE, продемонстрировали лучшие результаты трансфекции *in vitro* среди других протестированных аналогов **23a–c**, **24a** и **24b** [59]. В отсутствие сыворотки крови увеличение ЭТ наблюдалось с увеличением соотношения N/P для всех липосомальных композиций; при этом липосомы **23a-DOPE**, **23b-DOPE** или **24c-DOPE** переносили пДНК эффективно при соотношении N/P = 6:1. Lf 2000 обеспечивал менее эффективную доставку НК. Наличие сыворотки крови приводило к снижению ЭТ на 20–30% для всех катионных липосом, кроме композиции **24c-DOPE** (табл. 1).

Катионные липосомы на основе КЛ **2**, липида-хелпера **16** и холестеринсодержащих ПЭГ-производных **25a–c** эффективно доставляли пДНК, кодирующую зеленый флуоресцентный белок, трансфицируя 7–20% клеток SKOV-3 и 12–17% клеток A549 (табл. 1) [102].

Был изучен ряд липосом на основе липидов **26a–f** (табл. 1), в которых холестерин был использован в качестве гидрофобного домена, а первичные и третичные аминогруппы и четвертичные аммонийные соли служили в качестве гидрофильной катионной группы. Гидрофобный и гидрофильный домен были связаны с помощью простых эфирных или сложноэфирных связей. Среди шести исследованных композиций наибольшую ЭТ продемонстрировали липосомы с КЛ **26a** и **26f**, содержащими в своей структуре первичные аминогруппы. Такие липосомы доставляли пДНК pEGFP в клетки 293T эффективнее, чем коммерческий агент Lf 2000 [103].

Другим структурным элементом, который оказывает сильное влияние на ЭТ, является катионная группа, необходимая для связывания и компактизации НК. Известно, что полиамины млекопитающих, такие как спермин (**27**), спермидин (**28**) и путресцин (**29**), не только обладают возможностью связывать НК, но и способствуют слиянию липосом с клеточной мембраной [104].

Для доставки siRNA в клетки HeLa были использованы липосомы на основе КЛ **30a–c** (табл. 2) [105]. Максимальное количество трансфицированных клеток (62%) достигалось при использовании липосом с КЛ **30a** на основе спермина.



Важная роль спермина при формировании липоплексов была показана в ряде научных публикаций [105–111]. В работе [106] рассмотрены перспективы применения катионных липосом, состоящих из сперминсодержащих КЛ **31a–c** с ацильными заместителями различной длины и липида-хелпера **14** (табл. 2). Среди них липосомы, содержащие КЛ **31a** с миристоильным заместителем, продемонстрировали самый высокий уровень трансфекции, при котором наблюдалась самая низкая цитотоксичность. Та же закономерность была характерна при использовании данных липидов в составе липосом (неионных поверхностно-активных везикул) [107].

Липосомы на основе N^4, N^9 -диацилированных производных спермина **32a–j** (табл. 2), содержащих два жирнокислотных остатка длиной от 18 до 24 углеводородных звеньев, защищают НК от нуклеаз и способствуют эффективному транспорту НК. В отсутствие сыворотки наиболее эффективными по количеству трансфицированных клеток (68%) оказались липосомы на основе асимметричного КЛ **32d** с остатками олеиновой и арахидоновой кислот, а по средней интенсивности флуоресценции (15 отн. ед.) – КЛ **32c** с двумя остатками линолевой кислоты [108]. В присутствии сыворотки липосомы на основе КЛ **32e–j** продемонстрировали эффективность, сравнимую с эффективностью Lf 2000 или превосходящую ее [70, 109]. Наиболее перспективные КЛ **32g**, содержащие остатки ненасыщенной олеиновой и насыщенной лигноцереновой кислот, в липосомальной форме трансфицировали 85% клеток HeLa со средней интенсивностью флуоресценции 50 отн. ед.

В работах [110, 111] авторами исследована трансфицирующая активность липосом на основе сперминсодержащих КЛ с различающимися линкерными группами – ди(оксиэтил)амино- (**33**); ди(оксиэтил)аминокарбоксо- (**34a–c**); 3-амино-1,2-диоксипропил- (**35a–c**); 2-амино-1,3-диоксипропил- (**36a–c**)

Таблица 2. КЛ на основе спермина
Table 2. CL based on spermine

	Структура КЛ CL structure	КЛ:липид- хелпер, мольное соотн. CL:helper lipid, molar ratio	Доставляемая НК Transferred NA	Тип клеток Cell type	IC ₅₀ ¹ , мкМ IC ₅₀ ² , μМ	TK ² , %		СИФ ³ , отн. ед. MFI ³ , rel. unit	Источник Source
						FBS (-) / FBS (+) ⁴	TC ² , %		
30a		30a				62 / n.d.			
30b		30b	siRNA	HeLa ⁵	50 / n.d. ⁶	43 / n.d.	n.d.	[105]	
30c		30c					15 / n.d.		
31a		31a-14, 5:1			30 / n.d.	15 / n.d.			
31b		31b-14, 5:1	pEGFP-C2 ⁷	HeLa	40 / n.d.	12.5 / n.d.	n.d.	[106], [107]	
31c		31c-14, 5:1				40 / n.d.	10 / n.d.		
32a		32a				50 / n.d.	17 / n.d.		
32b		32b				30 / n.d.	10 / n.d.		
32c		32c	siEGFP-AF	HeLa	n.d. / 100	25 / n.d.	15 / n.d.	[108]	
32d		32d				68 / n.d.	10 / n.d.		

Таблица 2. Продолжение
Table 2. Continued

	Структура КЛ CL structure	К.Липид- хелпер, мольное соотн. CL:helper lipid, molar ratio	Доставляемая НК Transferred NA	Тип клеток Cell type	IC ₅₀ ¹ , мкМ IC ₅₀ ² , μМ	FBS (-) / FBS (+) ⁴		СИФ ³ , отн. ед. MFI ² , rel. unit	Источник Source
						TK ² , % TC ² , %			
32e	R ¹ =	32e				n.d. / 75	n.d. / 19		[108]
	R ² =								
32f	R ¹ =	32f				n.d. / 73	n.d. / 35		[108]
	R ² =								
32g	R ¹ =	32g				n.d. / 85	n.d. / 50		[108]
	R ² =								
32h		32h	siEGFP-AF	HeLa	n.d. / 100	n.d. / 57	n.d. / 10		[108]
32i	R ¹ =	32i				n.d. / 83	n.d. / 23		[70], [109]
	R ² =								
32j	R ¹ =	32j				n.d. / 75 n.d. / 30			[70], [109]
	R ² =								
33		33-DOPE, 1:1	pCMV	HeLa	40 / n.d.	30 / 21	n.d.		[110], [111]

– и тремя гидрофобными доменами (лауриновая, миристиновая и пальмитиновая кислоты). Все полученные липосомы и их комплексы с пДНК оказались малотоксичными для клеток (табл. 2). Среди липосом, содержащих КЛ **33–36**, наиболее эффективными при трансфекции клеток были липиды **35b** и **35c** с остатками миристиновой и пальмитиновой кислот, хотя КЛ **36a** с более короткой углеводородной цепью также способствовал эффективной доставке пДНК в отсутствие сыворотки крови. Добавление сыворотки к культуральной среде приводило к уменьшению ЭТ липосом с КЛ **35b** и **35c** с 3-амино-1,2-диоксипропильным линкером, при этом ЭТ липосом на основе КЛ **36a** с 2-амино-1,3-диоксипропильным линкером не изменялась (93% клеток).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка катионных липосом, способных эффективно доставлять НК в клетки-мишени и при этом оказывать на них минимальное токсическое воздействие, является конечной целью любых исследований в области трансфекции. Несмотря на проведенные многочисленные исследования по созданию оптимальных систем доставки НК в эукариотические клетки, вопрос эффективности катионных липосом по-прежнему остается одним из главных факторов, лимитирующих их использование в генной или антисмысловой терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ginn S.L., Alexander I.E., Edelstein M.L., Abedi M.R., Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *J. Gene Med.* 2013;15:65-77. <https://doi.org/10.1002/jgm.2698>
2. Verma I.M., Weitzman M.D. Gene Therapy: Twenty-First Century Medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 2005;74:711-738. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.050304.091637>
3. Zhang X.-X., McIntosh T.J., Grinstaff M.W. Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery. *Biochimie.* 2012;94:42-58. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.05.005>
4. Elsbahy M., Nazarali A.M., Foldvari M. Non-viral nucleic acid delivery: key challenges and future directions. *Curr. Drug Deliv.* 2011;8:235-244. <https://doi.org/10.2174/156720111795256174>
5. Gao Y., Liu X.L., Li X.R. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. *Int. J. Nanomedicine.* 2011;6:1017-1025. <https://doi.org/10.2147/ijn.s17040>
6. Guo J., Fisher K.A., Darcy R., Cryan J.F., O'Driscoll C. Therapeutic targeting in the silent era: advances in non-viral siRNA delivery. *Mol. BioSyst.* 2010;6:1143-1161. <https://doi.org/10.1039/c001050m>
7. Giacca M., Zacchigna S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J. Controlled Release.* 2012;161(2):377-388. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.008>

Синтетические и структурные исследования по поиску новых катионных липидов и конструированию липосом на их основе открывают новые перспективы в разработке невирусных систем доставки нуклеиновых кислот в генной терапии. Весьма перспективными для *in vitro* доставки являются липиды на основе холестерина и спермина с различными вариациями состава, длины спейсера и типа используемого линкера. Однако для решения проблемы адресной доставки нуклеиновых кислот необходимо учитывать, помимо состава, также и физико-химические параметры катионных липосом и комплексов, которые они формируют с нуклеиновыми кислотами. К таким параметрам относятся размер и поверхностный потенциал комплексов, которые зависят как от соотношения компонентов, так и от состава липоплексов. Таким образом, помимо поиска оптимальных структур катионных липидов, одной из дополнительных задач является определение соотношения компонентов липоплексов, обеспечивающего направленную доставку нуклеиновых кислот в клетки-мишени.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-33-00589.

Acknowledgments

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project No. 18-33-00589.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

8. Crespo-Barreda A., Encabo-Berzosa M.M., González-Pastor R., Ortíz-Teba P., Iglesias M., Serrano J.L., Martín-Duque P. Viral and nonviral vectors for *in vivo* and *ex vivo* gene therapies. *Translating Regenerative Medicine to the Clinic.* 2016; 155-177. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800548-4.00011-5>
9. Mertena O.-W., Gaillet B. Viral vectors for gene therapy and gene modification approaches. *Biochem. Eng. J.* 2016;108:98-115. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.09.005>
10. Baum C., Kustikova O., Modlich U., Li Z., Fehse B. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther.* 2006;17:253-263. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.253>
11. Bessis N., GarciaCozar F.J., Boissier M.-C. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Therapy.* 2004;11:10-17. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302364>
12. Waehler R., Russell S.J., Curiel D.T. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8:573-587. <https://doi.org/10.1038/nrg2141>
13. Thomas C.E., Ehrhardt A., Kay M.A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 2003;4:346-358. <https://doi.org/10.1038/nrg1066>
14. Lollo C.P., Banaszczyk M.G., Chiou H.C. Obstacles and advances in non-viral gene delivery. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2000;2(2):136-142.
15. Li S.O.-D., Huang L. Non-viral is superior to viral gene delivery. *J. Controlled Release.* 2007;123:181-183. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.004>

16. Mintzer M.A., Simanek E.E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* 2009;109:259-302. <https://doi.org/10.1021/cr800409e>
17. Yin H., Kanasty R.L., Eltoukhy A.A., Vegas A.J., Dorkin J.R., Anderson D.J. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* 2014;15(8):541-555. <https://doi.org/10.1038/nrg3763>
18. Vlerken L.E., Vyas T.K., Amiji M.M. Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharm. Res.* 2007;28(8):1405-1414. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9284-6>
19. Balazs D.A., Godbey W.T. Liposomes for Use in Gene Delivery. *J. Drug Deliv.* 2011;2011:1-12. <https://doi.org/10.1155/2011/326497>
20. Kang S.H., Cho H.J., Shim G., Lee S., Kim S.H., Choi H.G., Kim C.W., Oh Y.K. Cationic liposomal co-delivery of small interfering RNA and a MEK inhibitor for enhanced anticancer efficacy. *Pharm. Res.* 2011;28:3069-3078. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0569-4>
21. Shim G., Han S.E., Yu Y.H., Lee S., Lee H.Y., Kim K., Kwon I.C., Park T.G., Kim Y.B., Choi Y.S., Kim C.-W., Oh Y.K. Trilysinoyl oleylamide-based cationic liposomes for systemic co-delivery of siRNA and an anticancer drug. *J. Controlled Release.* 2011;155:60-66. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.10.017>
22. Zuhorn I.S., Engberts J.B.F.N., Hoekstra D. Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *Eur. Biophys. J.* 2017;36(4-5):349-362. <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0092-4>
23. Movahedi F., MS., Hu R.G., PhD., Becker D.L., PhD., Xu C., PhD. Stimuli-responsive liposomes for the delivery of nucleic acid therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2015;11(6):1575-1584. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.03.006>
24. Monopoli M.P., Bombelli F.B., Dawson K.A. Nanoparticle coronas take shape. *Nat. Nanotechnol.* 2011;6:11-12. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.267>
25. Walczyk D., Bombelli F.B., Monopoli M.P., Lynch I., Dawson K.A. What the cell "sees" in bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* 2010;132:5761-5768. <https://doi.org/10.1021/ja910675v>
26. Allen L.T., Tosetto M., Miller I.S., O'Connor D.P., Penney S.C., Lynch I., Keenana A.K., Pennington S.R., Dawson K.A., Gallagher W.M. Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction. *Biomaterials.* 2006;27:3096-3108. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.019>
27. Senior J.H. Fate and behavior of liposomes *in vivo* — a review of controlling factors. *CRC Crit. Rev. Ther. Drug.* 1987;3:123-193.
28. Monopoli M.P., Walczyk D., Campbell A., Elia G. Lynch I., Bombelli F.B., Dawson K.A. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to *in vitro* and *in vivo* biological impacts of nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2011;133:2525-2534. <https://doi.org/10.1021/ja107583h>
29. Aggarwal P., Hall J.B., McLeland C.B., Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009;61:428-437. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009>
30. Ishida T., Harashima H., Kiwada H. Liposome clearance. *Biosci. Rep.* 2002;22(2):197-224. <https://doi.org/10.1023/a:1020134521778>
31. Chonn A., Cullis P.R., Devine D.V. The role of surface-charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J. Immunol.* 1991;146:4234-4241.
32. Senior J., Gregoriadis G. Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability? *FEBS Lett.* 1982;145(1):109-114. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)81216-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)81216-7)
33. Judge A.D., Sood V., Shaw J.R., Fang D., McClintock K., MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* 2005;23(4):457-462. <https://doi.org/10.1038/nbt1081>
34. Kleinman M.E., Yamada K., Takeda A., Chandrasekaran V., Nozaki M., Baffi J.Z., Albuquerque R.J.C., Yamasaki S., Itaya M., Pan Y.Z., Appukkuttan B., Gibbs D., Yang Z.L., Kariko K., Ambati B.K., Wilgus T.A., DiPietro L.A., Sakurai E., Zhang K., Smith J.R., Taylor E.W., Ambati J. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature.* 2008;452:591-597. <https://doi.org/10.1038/nature06765>
35. Robbins M., Judge A., Ambegia E., Choi C., Yaworski E., Palmer L., McClintock K., MacLachlan I. Misinterpreting the therapeutic effects of small interfering RNA caused by immune stimulation. *Hum. Gene Ther.* 2008;19:991-999. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.131>
36. Kedmi R., Ben-Arie N., Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials.* 2010;31:6867-6875. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.027>
37. Buyens K., Smedt S.C.D., Braeckmans K., Demeester J., Peeters L., Grunsven L.A.V., Mollerat du Jeu X.D., Sawant R., Torchilin V., Farkasova K., Ogris M., Sanders N.N. Liposome based systems for systemic siRNA delivery: Stability in blood sets the requirements for optimal carrier design. *J. Controlled Release.* 2012;158:362-370. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.009>
38. Conner S.D., Schmid S.L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003;422:37-44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>
39. Jones C.H., Chen C.-K., Ravikrishnan A., Rane S., Pfeifer B.A. Overcoming nonviral gene delivery barriers: perspective and future. *Mol. Pharmaceutics.* 2013;10:4082-4098. <https://doi.org/10.1021/mp400467x>
40. Rehman Z.U., Hoekstra D., Zuhorn I.S. On the mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis. *ACS Nano.* 2013;7(5):3767-3777. <https://doi.org/10.1021/nn3049494>
41. Ward C.M., Read M.L., Seymour L.W. Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy. *Blood.* 2001;97(8):2221-2229. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.8.2221>
42. Van der Aa M.A., Mastrobattista E., Oosting R.S., Hennink W.E., Koning G.A., Crommelin D.J. The nuclear pore complex: the gateway to successful nonviral gene delivery. *Pharm. Res.* 2006;23(3):447-459. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-9445-4>
43. Zhi D., Zhang S., Cui S., Zhao Y., Wang Y., Zhao D. The Headgroup evolution of cationic lipids for gene delivery. *Bioconjugate Chem.* 2013;24(4):487-519. <https://doi.org/10.1021/bc300381s>

44. Bottega R., Epanand R.M. Inhibition of protein kinase C by cationic amphiphiles. *Biochemistry*. 1992;31:9025-9030. <https://doi.org/10.1021/bi00152a045>
45. Floch V., Loisel S., Guenin E., Herve A.C., Clement J.C., Yaouanc J.J., Abbayes H.D., Ferec C. Cation substitution in cationic phospholipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity. *J. Med. Chem.* 2000;43:4617-4628. <https://doi.org/10.1021/jm000006z>
46. Ui-Tei K., Naito Y., Takahashi F., Haraguchi T., Ohki-Hamazaki H., Juni A., Ueda R., Saigo K. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Research*. 2004;32(3):936-948. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh247>
47. Rao G., Yadava P., Hughes J. Rationally designed synthetic vectors for gene delivery. *The Open Drug Deliv. J.* 2007;1:7-19. <https://doi.org/10.2174/1874126600701010007>
48. Choi J.S., Lee E.J., Jang H.S., Park J.S. New cationic liposomes for gene transfer into mammalian cells with high efficiency and low toxicity. *Bioconjugate Chem.* 2001;12:108-113. <https://doi.org/10.1021/bc000081o>
49. Liu D., Hu J., Qiao W., Li Z., Zhang S. Cheng L. Synthesis of carbamate-linked lipids for gene delivery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005;15(12):3147-3150. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.04.010>
50. Liu D., Qiao W., Li Z., Chen Y., Cui X., Li K., Yu L., Yan K., Zhu L., Guo Y. Cheng L. Structure-function relationship research of glycerol backbone-based cationic lipids for gene delivery. *Chem. Biol. Drug Des.* 2008;71:336-344. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00644.x>
51. Tang F., Hughes J.A. Use of dithiodiglycolic acid as a tether for cationic lipids decreases the cytotoxicity and increases transgene expression of plasmid DNA *in vitro*. *Bioconjugate Chem.* 1999;10:791-796. <https://doi.org/10.1021/bc990016i>
52. Byk G., Wetzler B., Frederic M., Dubertret C., Pitard B., Jaslin G., Scherman D. Reduction-sensitive lipopolyamines as a novel nonviral gene delivery system for modulated release of DNA with improved transgene expression. *J. Med. Chem.* 2000;43:4377-4387. <https://doi.org/10.1021/jm000284y>
53. Reynier P., Briane D., Coudert R., Fadda G., Bouchemal N., Bissieres P., Taillandier, Cao A. Modifications in the head group and in the spacer of cholesterol-based cationic lipids promote transfection in melanoma B16-F10 cells and tumours. *J. Drug Target.* 2004;12(1):25-38. <https://doi.org/10.1080/10611860410001683040>
54. Muñoz-Úbeda M., Misra S. K., Barrán-Berdón A.L., Datta S., Aicart-Ramos C., Castro-Hartmann P., Kondaiah P., Junquera E., Bhattacharya S., Aicart E. How does the spacer length of cationic gemini lipids influence the lipoplex formation with plasmid DNA? Physicochemical and biochemical characterizations and their relevance in gene therapy. *Biomacromolecules*. 2012;13:3926-3937. <https://doi.org/10.1021/bm301066w>
55. Obata Y., Saito S., Takeda N., Takeoka S. Plasmid DNA-encapsulating liposomes: effect of a spacer between the cationic head group and hydrophobic moieties of the lipids on gene expression efficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1788:1148-1158. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2009.02.014>
56. Du Z., Munye M.M., Tagalakis A.D., Manunta M.D.I., Hart S.L. The role of the helper lipid on the DNA transfection efficiency of lipopolyplex formulations. *Scientific Rep.* 2015;4(7107):1-6. <https://doi.org/10.1038/srep07107>
57. Pisani M., Mobbili G. Bruni P. Neutral liposomes and DNA transfection. *Non-Viral Gene Ther.* 2011;319-348. <https://doi.org/10.5772/21283>
58. Zuhorn I.S., Bakowsky U., Polushkin E., Visser W.H., Stuur M. Engberts J., Hoekstra D. Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. *Mol. Ther.* 2005;11(5):801-810. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.12.018>
59. Maslov M.A., Kabilova T.O., Petukhov I.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA. *J. Controlled Release.* 2012;160:182-193. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.023>
60. Mochizuki S., Kanegae N., Nishina K., Kamikawa Y., Koiwai K., Masunaga H., Sakurai K. The role of the helper lipid dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) for DNA transfection cooperating with a cationic lipid bearing ethylenediamine. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1828:412-418. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.10.017>
61. Chesnoy S., Huang L. Structure and function of lipid-dna complexes for gene delivery. *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2000;29:27-47. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.27>
62. Cho S.M., Lee H.Y., Kim J.C. pH-dependent release property of dioleoylphosphatidyl ethanolamine liposomes. *Korean J. Chem. Eng.* 2008;25(2):390-393. <https://doi.org/10.1007/s11814-008-0066-6>
63. Zuidam N.J., Barenholz Y. Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998;1368:115-128. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(97\)00187-9](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(97)00187-9)
64. Fletcher S., Ahmad A. Perouzel E., Jorgensen M.R., Miller A.D. A dialkynoyl analogue of DOPE improves gene transfer of lower-charged, cationic lipoplexes. *Org. Biomol. Chem.* 2006;4:196-199. <https://doi.org/10.1039/b514532e>
65. Dabkowska A.P., Barlow D.J., Hughes A.V., Campbell R.A., Quinn P.J., Lawrence M.J. The effect of neutral helper lipids on the structure of cationic lipid monolayers. *J. R. Soc. Interface.* 2012;9:548-561. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0356>
66. Pozzi D., Marchini C., Cardarelli F., Amenitsch H., Chiara Garulli C., Bifone A., Caracciolo G. Transfection efficiency boost of cholesterol-containing lipoplexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1818:2335-2343. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.05.017>
67. Yang S., Zheng Y., Chen J., Zhang Q., Zhao D., Han D., Chen X. Comprehensive study of cationic liposomes composed of DC-Chol and cholesterol with different mole ratios for gene transfection. *Colloid. Surf., B: Biointerfaces.* 2013;101:6-13. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.05.032>
68. Bae Y.-U., Huh J.-W., Kim B.-K., Parka H.Y., Seu Y.-B., Doh K.-O. Enhancement of liposome mediated gene transfer by adding cholesterol and cholesterol modulating drugs. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016;1858:3017-3023. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2016.09.013>
69. Duarte S., Faneca H., Pedroso de Lima M.C. Non-covalent association of folate to lipoplexes: A promising strategy to improve gene delivery in the presence of serum. *J. Controlled Release.* 2011;149:264-272. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.10.032>

70. Metwally A.A., Blagbrough I. S. Quantitative silencing of EGFP reporter gene by self-assembled siRNA lipoplexes of LinOS and cholesterol. *Mol. Pharmaceutics*. 2012;9:3384-3395. <https://doi.org/10.1021/mp300435x>
71. Tao J., Ding W.-F., Che X.-H., Chen Y.-C., Chen F., Chen X.-D. Ye X.-L., Xiong S.-B. Optimization of a cationic liposome-based gene delivery system for the application of miR-145 in anticancer therapeutics. *Int. J. Mol. Med*. 2016;37:1345-1354. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2530>
72. Cui S., Zhi D., Zhao Y., Chen H., Meng Y., Zhang C., Zhang S. Cationic liposomes with folic acid as targeting ligand for gene delivery. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2016;26(16):4025-4029. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.085>
73. Rao N.M. Cationic lipid-mediated nucleic acid delivery: beyond being cationic. *Chem. Phys. Lipids*. 2010;163:245-252. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.01.001>
74. Mevel M., Neveu C., Goncalves C., Yaouanc J.-J., Pichon C. Jaffres P.-A., Midoux P. Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. *Chem. Commun*. 2008;(27):3124-3126. <https://doi.org/10.1039/b805226c>
75. Богданенко Е.В., Свиридов Ю.В., Московцев А.А., Жданов Р.И. Невирусный перенос генов *in vivo* в генной терапии. *Вопросы медицинской химии*. 2000;46(3):226-245. [Bogdanenko E.V., Sviridov Yu.V., Moskovtsev A.A., Zhdanov R.I. Non-viral gene transfer *in vivo* in gene therapy. *Voprosy meditsinskoj khimii = Issues of Medicinal Chemistry*. 2000;46(3):226-245 (in Russ.)]
76. Kulkarni P.R., Yadav J.D., Vaidya K.A. Liposomes: a novel drug delivery system. *Int. J. Curr. Pharm. Res*. 2010;3(2):10-18.
77. Goyal P., Goyal K., Kumar S.G., Singh A., Katare O.P., Mishra D.N. Liposomal drug delivery systems – Clinical applications. *Acta Pharm*. 2005;55:1-25.
78. Byk T., Haddada H., Vainchenker W., Louache F. Lipofectamine and related cationic lipids strongly improve adenoviral infection efficiency of primitive human hematopoietic cells. *Hum. Gene Ther*. 1998;9:2493-2502. <https://doi.org/10.1089/hum.1998.9.17-2493>
79. Masotti A., Mossa G., Cametti C., Ortaggi G., Bianco A., Grosso N.D., Malizia D., Esposito C. Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloid. Surf., B: Biointerfaces*. 2009;68:136-144. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.09.017>
80. Cardarelli F., Digiacomio L., Marchini C., Amici A., Salomone F., Fiume G., Rossetta A., Gratton E., Pozzi D., Caracciolo G. The intracellular trafficking mechanism of lipofectaminebased transfection reagents and its implication for gene delivery. *Scientific Rep*. 2016;6(25879). <https://doi.org/10.1038/srep25879>
81. Zhao M., Yang H., Jiang X., Zhou W., Zhu B., Zeng Y., Yao K., Ren C. Lipofectamine RNAiMAX: an efficient siRNA transfection reagent in human embryonic stem cells. *Mol. Biotechnol*. 2008;40:19-26. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9043-x>
82. Zuris J.A., Thompson D.B., Shu Y., Guilinger J.P., Bessen J.L., Hu J.H., Maeder M.L., Joung J.K., Chen Z.Y., Liu D.R. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Biotechnol*. 2015; 33:73-80. <https://doi.org/10.1038/nbt.3081>
83. Cui S., Zhang S., Chen H., Wang B., Zhao Y., Zhi D. The mechanism of lipofectamine 2000 mediated transmembrane gene delivery. *Engineering*. 2012;5:172-175. <https://doi.org/10.4236/eng.2012.410b045>
84. Dalby B., Cates S., Harris A., Ohki E.C., Tilkins M.L., Price P.J., Ciccarone V.C. Advanced transfection with lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*. 2004;33:95-103. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.11.023>
85. Mo R.H., Zaro J.L., Ou J., H.J., Shen W.-C. Effects of lipofectamine 2000/siRNA complexes on autophagy in hepatoma cells. *Mol. Biotechnol*. 2012;51:1-8. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9422-6>
86. Markowitz D., Liu C., Gurpreet M., Cuning C., de Mollerat du Jeu X.J. In vivo lipofectamine™-new non-viral delivery reagent for *in vivo* delivery of Stealth™ RNAi. *Mol. Ther*. 2009;17:391. [https://doi.org/10.1016/s1525-0016\(16\)39386-8](https://doi.org/10.1016/s1525-0016(16)39386-8)
87. Schlosser K., Taha M., Stewart D.J. Systematic assessment of strategies for lung-targeted delivery of microRNA mimics. *Theranostics*. 2018;8(5):1213-1226. <https://doi.org/10.7150/thno.22912>
88. Eadon M.T., Cheng Y.-H., Hato T., Benson E.A., Ipe J., Collins K.S., De Luca T., El-Achkar T.M., Bacallao R.L., Skaar T.D., Dagher P.C. *In vivo* siRNA delivery and rebound of renal LRP2 in mice. *J. Drug. Deliv*. 2017;2017:1-12. <https://doi.org/10.1155/2017/4070793>
89. Legendre J.Y., Szoka Jr F.C. Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharm. Res*. 1992;9(10):1235-1242. <https://doi.org/10.1023/a:1015836829670>
90. Wang H., Wang B., Zhang Z. H. Inhibition of corneal neovascularization by vascular endothelia growth inhibitor gene. *Int. J. Ophthalmol*. 2010;3(3):196-199. <https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2010.03.03>
91. Barthel F., Remy J.S., Loeffler J.P., Behr J.P. Laboratory methods: Gene transfer optimization with lipospermine-coated DNA. *DNA and Cell Biology*. 1993;12(6):553-560. <https://doi.org/10.1089/dna.1993.12.553>
92. Staedel C., Remy J.S., Hua Z., Broker T.R., Chow L.T., Behr J.P. High-efficiency transfection of primary human keratinocytes with positively charged lipopolyamine: DNA complexes. *J. Invest. Dermatol*. 1994;102(5):768-772. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12377673>
93. Mahato R.I., Kawabata K., Takakura Y., Hashida M. *In vivo* disposition characteristics of plasmid DNA complexed with cationic liposomes. *J. Drug Target*. 1995;3:149-157. <https://doi.org/10.3109/10611869509059214>
94. Mahato R.I., Kawabata K., Nomura T., Takakura Y., Hashida M. Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of plasmid DNA/cationic liposome complexes. *J. Pharm. Sci*. 1995;84(11):1267-1271. <https://doi.org/10.1002/jps.2600841102>
95. Gebhart C.L., Kabanov A.V. Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J. Controlled Release*. 2001;73:401-416. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00357-1](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00357-1)
96. Ciccarone V., Anderson D., Jianqing Lan J., Schifferli K., Joel Jessee J. DMRIE-C Reagent for transfection of suspension cells and for RNA transfection. *Focus*. 1995;17(3):84-87.
97. Groth-Pedersen L., Aits S., Corcelle-Termeau E., Petersen N.H.T, Nylandsted J., Jaattela M. Identification of cytoskeleton-associated proteins essential for lysosomal stability and survival of human cancer cells. *Plos One*. 2012;7(10):1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045381>
98. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd Edn. New York: Garland Publishing; 1994, 1361 p.

99. Cardarelli F., Pozzi D., Bifone A., Marchini C., Caracciolo G. Cholesterol-dependent macropinocytosis and endosomal escape control the transfection efficiency of lipoplexes in CHO living cells. *Mol. Pharmaceutics*. 2012;9:334-340. <https://doi.org/10.1021/mp200374e>
100. Pozzi D., Marchini C., Cardarelli F., Salomone F., Coppola S., Montani M., Zabaleta M.E., Digman M.A., Gratton E., Colapicchioni V., Caracciolo G. Mechanistic evaluation of the transfection barriers involved in lipid-mediated gene delivery: Interplay between nanostructure and composition. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1838:957-967. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2013.11.014>
101. Biswas J., Mishra S.K., Kondaiah P., Bhattacharya S. Syntheses, transfection efficacy and cell toxicity properties of novel cholesterol-based gemini lipids having hydroxyethyl head group. *Org. Biomol. Chem*. 2011;9:4600-4613. <https://doi.org/10.1039/c0ob00940g>
102. Ma C.-C., He Z.-Y., Xia S., Ren K., Hui L.-W., Qin H.-X., Tang M.-H., Zeng J., Song X.-R. α , ω -Cholesterol-functionalized low molecular weight polyethylene glycol as a novel modifier of cationic liposomes for gene delivery. *Int. J. Mol. Sci*. 2014;15:20339-20354. <https://doi.org/10.3390/ijms151120339>
103. Ju J., Huan M.-L., Wan N., Hou Y.-L., Ma X.-X., Jia Y.-Y., Li C., Zhou S.-Y., Zhang B.-L. Cholesterol derived cationic lipids as potential non-viral gene delivery vectors and their serum compatibility. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2016;26:2401-2407. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.007>
104. Meers P., Hong K., Bentz J., Papahadjopoulos D. Spermine as a modulator of membrane fusion: interactions with acidic phospholipids. *Biochemistry*. 1986;25(11):3109-3118. <https://doi.org/10.1021/bi00359a007>
105. Patil S.P., Yi J.W., Bang E.-K., Jeon E.M. Kim B.H. Synthesis and efficient siRNA delivery of polyamine-conjugated cationic nucleoside lipids. *Med. Chem. Commun*. 2011;2(6):505-508. <https://doi.org/10.1039/c1md00014d>
106. Paecharoenchai O., Niyomtham N., Apirakaramwong A., Ngawhirunpat T., Rojanarata T., Yingyongnarongkul B.-E., Opanasopit P. Structure relationship of cationic lipids on gene transfection mediated by cationic liposomes. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13(4):1302-1308. <https://doi.org/10.1208/s12249-012-9857-5>
107. Paecharoenchai O., Niyomtham N., Ngawhirunpat T., Rojanarata T., Yingyongnarongkul B.-E., Opanasopit P. Cationic niosomes composed of spermine-based cationic lipids mediate high gene transfection efficiency. *J. Drug Target*. 2012;20(9):783-792. <https://doi.org/10.3109/1061186x.2012.716846>
108. Metwally A.A., Reelfs O., Pourzand C., Blagbrough I.S. Efficient silencing of EGFP reporter gene with siRNA delivered by asymmetrical N^4, N^9 -diacyl spermines. *Mol. Pharmaceutics*. 2012;9(7):1862-1876. <https://doi.org/10.1021/mp200429n>
109. Metwally A.A., Pourzand C., Blagbrough I.S. Efficient gene silencing by self-assembled complexes of siRNA and symmetrical fatty acid amides of spermine. *Pharmaceutics*. 2011;3(2):125-140. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3020125>
110. Niyomtham N., Apiratikul N., Suksen K., Opanasopit P., Yingyongnarongkul B.-E. Synthesis and *in vitro* transfection efficiency of spermine-based cationic lipids with different central core structures and lipophilic tails. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2015;25:496-503. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.043>
111. Niyomtham N., Apiratikul N., Chanchang K., Opanasopit P., Yingyongnarongkul B.-E. Synergistic effect of cationic lipids with different polarheads, central core structures and hydrophobic tails on gene transfection efficiency. *Biol. Pharm. Bull*. 2014;37(9):1534-1542. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00349>

Об авторах:

Михеев Алексей Александрович, научный сотрудник 4-го научно-исследовательского отдела Федерального государственного унитарного предприятия «Научный Центр «Сигнал» (107014, Россия, Москва, ул. Большая Оленья, д. 8). E-mail: aa-mixeev@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9466-0824>

Шмендель Елена Васильевна, кандидат химических наук, доцент кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: elena_shmendel@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3727-4905>

Жестовская Елизавета Сергеевна, научный сотрудник 1-го научно-аналитического отдела Федерального государственного унитарного предприятия «Научный Центр «Сигнал» (107014, Россия, Москва, ул. Большая Оленья, д. 8). E-mail: zhestovskaya@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-1297-8562>

Назаров Георгий Валерьевич, доктор химических наук, главный научный сотрудник Федерального государственного унитарного предприятия «научный центр» Сигнал» (107014, Россия, Москва, ул. Большая Оленья, д. 8). E-mail: denis-1000@list.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8805-6460>

Маслов Михаил Александрович, доктор химических наук, директор Института тонких химических технологий, профессор кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: mamaslov@mail.ru. Scopus Author ID 7003427092, <https://orcid.org/0000-0002-5372-1325>

About the authors:

Aleksey A. Mikheev, Researcher, The 4th Research Department, Federal State Unitary Enterprise “Scientific Center “Signal” (8, Bolshaya Olenya ul., Moscow, 107014, Russia). E-mail: aa-mixeev@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9466-0824>

Elena V. Shmendel, Cand. of Sci. (Chemistry), Associate Professor, N.A. Preobrazhensky Department of Chemistry and Technology of Biologically Active Compounds, Medical and Organic Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, “MIREA – Russian Technological University” (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: elena_shmendel@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3727-4905>

Elizaveta S. Zhestovskaya, Researcher, The 1th Research and Analytical Department, Federal State Unitary Enterprise “Scientific Center “Signal” (8, Bolshaya Olenya ul., Moscow, 107014, Russia). E-mail: zhestovskayae@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-1297-8562>

Georgy V. Nazarov, Dr. of Sci. (Chemistry), Chief Researcher, Federal State Unitary Enterprise “Scientific Center “Signal” (8, Bolshaya Olenya ul., Moscow, 107014, Russia). E-mail: denis-1000@list.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8805-6460>

Mikhail A. Maslov, Dr. of Sci. (Chemistry), Director of the Institute of Fine Chemical Technologies, Professor at the N.A. Preobrazhensky Department of Chemistry and Technology of Biologically Active Compounds, Medical and Organic Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, “MIREA – Russian Technological University” (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: mamaslov@mail.ru. Scopus Author ID 7003427092, <https://orcid.org/0000-0002-5372-1325>

*Поступила: 23.12.2019; Получена после доработки: 31.01.2020; Принята к опубликованию: 10.02.2020.
Submitted: December 23, 2019; Reviewed: January 31, 2020; Accepted: February 10, 2020.*