



УДК 577.115.7:577.113.7:577.112.6

ПЕПТИД NLS УЛУЧШАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДОСТАВКИ пДНК В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ КАТИОННЫМИ ЛИПОСОМАМИ

© 2025 г. Е. В. Шмендель^{*,#}, О. В. Марков^{**}, М. А. Зенкова^{**}, М. А. Маслов^{*}

^{*} Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова,
МИРЭА – Российский технологический университет,
Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

^{**} Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 15.05.2025 г.

После доработки 28.05.2025 г.

Принята к публикации 29.05.2025 г.

Получены обычные и мультифункциональные катионные липосомы, эффективно доставляющие плазмидную ДНК (пДНК). Показано частичное ингибирование рецептор-опосредованного эндоцитоза комплексов пДНК с мультифункциональными катионными липосомами, содержащими фолатные липиды, в присутствии свободной фолиевой кислоты в клеточной среде. Дополнительное формирование комплексов пДНК с пептидом сигнала ядерной локализации (NLS) позволило увеличить эффективность экспрессии улучшенного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) в 1.5–2 раза с использованием обычных и мультифункциональных катионных липосом. Добавление пептида NLS к пДНК и дальнейшее формирование комплексов с катионными липосомами может быть использовано для решения проблемы эффективной доставки пДНК в эукариотические клетки.

Ключевые слова: мультифункциональные катионные липосомы, ПЭГ-липид, фолатный липид, пептид NLS, пДНК, фолиевая кислота

DOI: 10.31857/S0132342325050222

ВВЕДЕНИЕ

Доставка плазмидной ДНК (пДНК) с целью лечения сердечно-сосудистых заболеваний [1], рака [2], а также проведения ДНК-вакцинации [3, 4] возможна с использованием вирусных и не-вирусных транспортных систем. Вирусные системы доставки пДНК могут быть онкогенны, иммуногенны, а также стимулируют воспалительные реакции [5].

Для решения проблемы эффективной доставки пДНК в эукариотические клетки разрабатываются различные невирусные транспортные системы доставки пДНК, способные преодолевать внеклеточные и внутриклеточные биологические

барьеры [6]. Катионные и ионизируемые липиды эффективно связывают пДНК и способствуют ее компактизации [7], липиды-хелперы обеспечивают высвобождение пДНК из эндосом [8, 9], вместе формируя катионные липосомы. Для обеспечения селективности катионных липосом в их состав вводят адресные лиганды с остатками фолиевой кислоты (ФК) [10], а для увеличения времени циркуляции в кровотоке – полиэтиленгликоль (ПЭГ) – липиды, которые создают стерический барьер и предотвращают адсорбцию белков плазмы крови (опсонинов) на их поверхности [11].

После проникновения через плазматическую мембрану и высвобождения в цитоплазму пДНК необходимо преодолеть следующий барьер – по-

Сокращения: 2X3 – 1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16-2-тетраазагексакозантетрагидрохлорид; DOPE – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин; FBS – эмбриональная бычья сыворотка; EGFP – улучшенный зеленый флуоресцентный белок; NLS – сигнал ядерной локализации; НК – нуклеиновая кислота; пДНК – плазмидная ДНК; ФК – фолиевая кислота; ЯПК – ядерные поровые комплексы;

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (499) 600-80-80, эл. почта: elena_shmendel@mail.ru).

пасть в ядро клетки через двойную ядерную мембрану, содержащую ядерные поровые комплексы (ЯПК) [12, 13]. ЯПК формируются в основном белками нуклеопоринами и представляют собой сложные супрамолекулярные образования с внешним диаметром ~80–120 нм, внутренним диаметром ~40 нм и внутренним каналом ~30 нм [14]. Низкомолекулярные соединения, такие как соли и молекулы некоторых лекарств, могут легко проходить через ядерные поровые комплексы. Макромолекулярный транспорт через ядерные поровые комплексы энергозависимый, однонаправленный и, как правило, очень быстрый. Крупные молекулы способны проникать через ЯПК только с помощью импортина- α – ядерного рецептора, узнающего специфические пептидные последовательности – сигналы ядерной локализации (NLS) [15]. В структуре переносимых белков могут содержаться классические однокомпонентные NLS ($^{126}\text{PKKKRKV}^{132}$) и двухкомпонентные последовательности NLS ($^{155}\text{KRPAATKKA-GQAKKKK}^{170}$), которые облегчают их транспорт в ядро [16].

Известно, что пептид NLS распознается рецепторами на поверхности клеточного ядра и участвует в транспорте НК внутрь ядра [17]. Ранее липидный конъюгат, содержащий пептид NLS (PKKKRKVEDPYC), вводили в состав ка-

тионных липосом для изучения связывания с ядрами клеток JAWS II [18]. Известно также, что белок NMM, содержащий последовательность NLS (MRRANHRRRRASHRRMRGG), способен эффективно конденсировать ДНК, формируя пептидоплексы, которые эффективно доставлялись ниосомами в клетки НЕК 293Т и МСF-7 [19].

Ранее нами были разработаны катионные липосомы L на основе катионного липида 1,26-бис-(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7,11,16,-20-тетраазагексакозантетрагидрохлорида (2X3, рис. 1) и липида-хелпера 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламина (DOPE), которые успешно зарекомендовали себя как перспективные средства доставки олигодезоксирибонуклеотидов, пДНК, малых интерферирующих РНК, мРНК как *in vitro*, так *in vivo* [10, 20]. Также были описаны успешные примеры создания мультифункциональных катионных липосом на основе системы 2X3-DOPE путем введения в липосомальный состав 2–4% мольн. фолатных (F12) и/или ПЭГ-липидов (P800, рис. 1) [20]. Данные липосомы были успешно применены для адресной доставки пДНК в клетки НЕК 293 и KB-3-1 [10], иммуностимулирующей РНК при внутривенном введении мышам и отличались от 2X3-DOPE увеличенным временем циркуляции в организме [20].

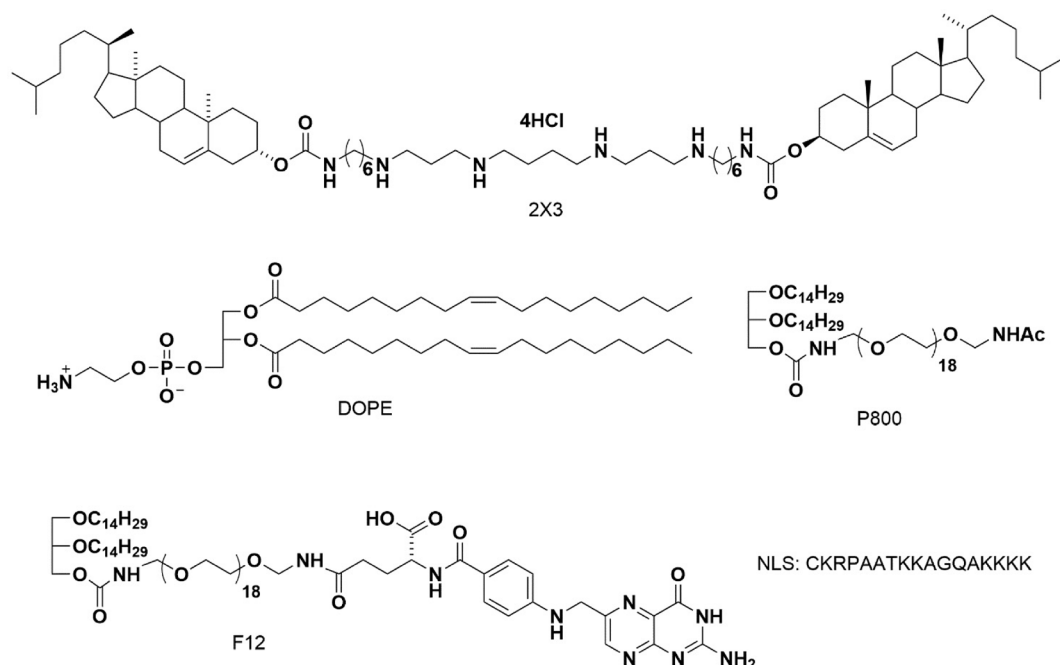


Рис. 1. Структуры катионного липида 2X3, липида-хелпера DOPE, ПЭГ-липиды P800, фолатного липида F12 и последовательность пептида NLS.

Цель данной работы – оценка влияния пептида NLS (СКРРААТККAGQAKKKK) на эффективность доставки пДНК обычными и мультифункциональными катионными липосомами в эукариотические клетки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние пептида NLS на физико-химические свойства и эффективность доставки пДНК обычными катионными липосомами. Ранее нами было показано, что при соотношении N/P (отношение количества аминокислотных групп катионного липида 2X3 к количеству фосфатных групп НК), равном 2/1, наблюдалось практически полное связывание пДНК с липосомами L [21]. Данное соотношение было выбрано для изучения влияния пептида NLS на эффективность связывания пДНК в присутствии липосом L.

Используемый нами пептид NLS (рис. 1) богат L-лизином и L-аргинином и способен конденсировать пДНК за счет электростатических взаимодействий. Результаты нативного гель-электрофореза в агарозном геле для пДНК и ее комплекса с NLS при соотношении пДНК/NLS 1 : 1 (зарядовое соотношение) показали их неполное взаимодействие – пДНК стала удерживаться в геле (рис. 2а). При взаимодействии пДНК с липосомами L при соотношении N/P, равном 2/1, эффективность связывания увеличивалась, а при использовании NLS и липосом L (рис. 2а) происходило полное связывание и наблюдалась компактизация пДНК.

Предварительная обработка пДНК пептидом NLS приводила к уменьшению размеров пДНК в 5.5 раз, при этом ζ -потенциал оставался отрицательным (рис. 2б, в). При добавлении липосом L к пДНК или ее комплексам с NLS размеры также

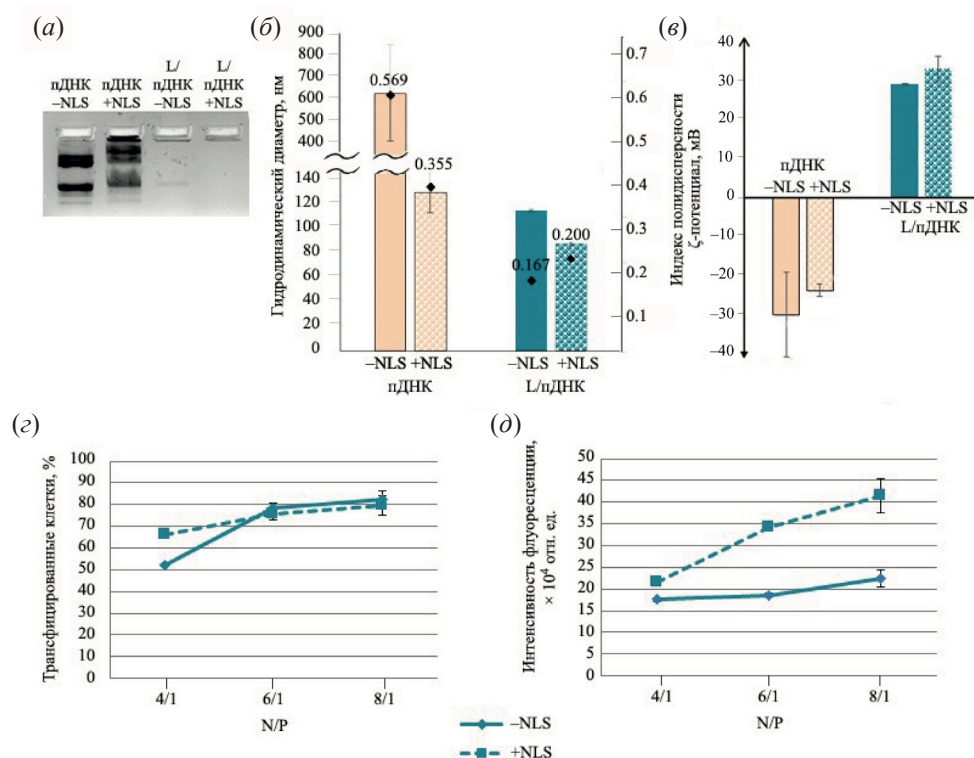


Рис. 2. Влияние пептида NLS на эффективность доставки пДНК pEGFP-C2 (2 мкг/мл) катионными липосомами L. (а) – Электрофореграмма связывания пДНК и комплексов пДНК/NLS с катионными липосомами L при соотношении N/P = 2/1; (б) – гидродинамический диаметр, индекс полидисперсности и (в) – ζ -потенциал пДНК и комплексов пДНК/NLS с катионными липосомами L при соотношении N/P = 2/1; (г, д) – экспрессия зеленого флуоресцентного белка в клетках HEK 293, трансфицированных комплексами пДНК с катионными липосомами L при соотношениях N/P = 4/1, 6/1 и 8/1 в присутствии (+NLS) или в отсутствие (–NLS) пептида NLS. Клетки трансфицировали комплексами в течение 4 ч в среде с 10% FBS с последующей и дополнительной инкубацией клеток в течение 44 ч; (з) – процент трансфицированных клеток и (д) – уровень средней интенсивности флуоресценции (отн. ед.) клеток в популяции, измеренные методом проточной цитометрии.

уменьшались до 109.3 ± 1.1 нм и 83.2 ± 1.4 нм соответственно, при этом частицы становились более гомогенными (значения индекса полидисперсности 0.167 и 0.200 соответственно) и положительно заряженными (рис. 2б, в).

Накопление комплексов пДНК(pEGFP)/NLS и катионных липосом L, сформированных при соотношениях N/P, равных 4/1, 6/1 и 8/1, в эукариотических клетках НЕК 293 оценивали методом проточной цитометрии, измеряя количество трансфицированных клеток (рис. 2г) и среднюю интенсивность флуоресценции (уровень экспрессии трансгена EGFP) в клеточной популяции (рис. 2д).

При соотношении N/P, равном 4/1, введение пептида NLS к пДНК приводило к увеличению эффективности трансфекции в 1.2 раза как по количеству трансфицированных клеток, так и по значениям средней интенсивности флуоресценции в клеточной популяции. При высоких соотношениях N/P, равных 6/1 и 8/1, уровень интенсивности флуоресценции для комплекса пДНК/NLS возрастал в 2 раза (рис. 2д). При этом количество трансфицированных клеток было одинаковым (рис. 2г), что указывает на более эффективное проникновение пДНК в ядро клетки и экспрессию улучшенного зеленого флуоресцентного белка (EGFP).

Изучение доставки пДНК фолат-содержащими катионными липосомами в условиях адресной доставки. Фолатные липосомы, содержащие липид F12, обеспечивали проникновение пДНК с помощью рецептор-опосредован-

ного эндоцитоза в клетки рака шейки матки человека KB-3-1 (выращены в фолат-децифитной среде FD-RPMI для увеличения количества фолатных рецепторов [10, 22]). При добавлении свободной фолиевой кислоты (ФК, 1 мМ) в культуральную среду за 60 мин до трансфекции клеток KB-3-1 и последующей инкубации клеток с комплексами катионных липосом/пДНК (N/P = 2/1) в течение 90 мин происходило уменьшение процента трансфицированных клеток только в случае фолатных липосом F4 и F2P2 на 46 и 57% соответственно (рис. 3а), что указывает на частичное ингибирование механизма рецептор-опосредованного эндоцитоза комплексов за счет взаимодействия свободной ФК с фолатными рецепторами на поверхности клеток KB-3-1. Аналогичное ингибирование процесса транспорта нуклеиновых кислот фолатсодержащими средствами доставки в присутствии свободной ФК (250 мкМ – 2.5 мМ) наблюдали для клеточных линий KB, SKOV-3 (рак яичников человека) и СНО-1 (эпителиальные клетки яичников китайского хомячка) [23–25]. Уровень средней интенсивности флуоресценции клеточной популяции также снижался при предварительной обработке клеток свободной ФК только в случае фолатных липосом F4 и F2P2, но уже менее значительно (рис. 3б), что, возможно, связано с небольшим временем инкубации (90 мин).

Изучение доставки пДНК мультифункциональными катионными липосомами. Влияние пептида NLS на эффективность доставки пДНК

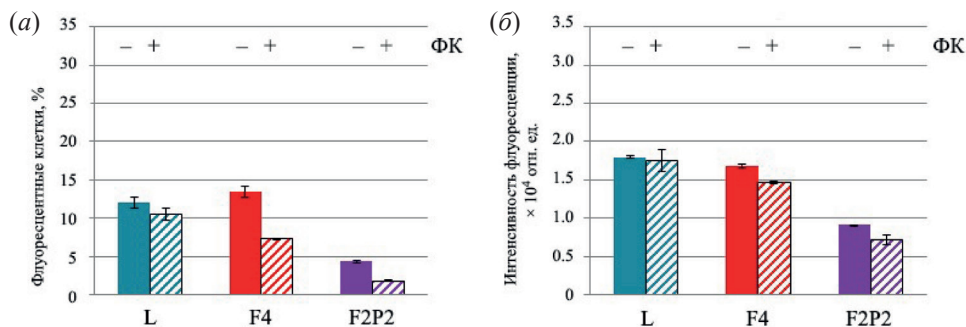


Рис. 3. Доставка пДНК pEGFP-C2 (2 мкг/мл) в клетки KB-3-1 с помощью катионных липосом L и мультифункциональных липосом F4 и F2P2, содержащих фолатный липид F12, в присутствии (+) или в отсутствие (–) свободной фолиевой кислоты (ФК, 1 мМ) в клеточной среде при соотношении N/P = 2/1 в присутствии 5% FBS. Клетки инкубировали с комплексами, сформированными пДНК и липосомами, в течение 90 мин с последующей отмывкой и дополнительной инкубацией клеток до 48 ч. (а) – Процент трансфицированных клеток и (б) уровень средней интенсивности флуоресценции (отн. ед.) клеток в популяции, измеренные методом проточной цитометрии. Стандартное отклонение не превышает 7–9%.

было изучено с использованием мультифункциональных катионных липосом F4, P4 и F2P2 (рис. 4а, б), которые содержали 4% мольн. фолатного липида F12 (липосомы F4), 4% мольн. ПЭГ-липидов P800 (липосомы P4), по 2% мольн. фолатного и ПЭГ-липидов (липосомы F2P2). Эффективность трансфекции оценивали для соотношения N/P = 2/1 – наиболее оптимального для адресной доставки пДНК фолатными липосомами (рис. 3а, б) [10], а также высоком соотношении N/P = 6/1, оптимальном для трансфекции клеток обычными липосомами L (рис. 2з, д) и ПЭГ-содержащими катионными липосомами [20].

При соотношении N/P = 2/1 наличие пептида NLS в комплексах с пДНК не влияло в случае липосомы F4 как на количество трансфицированных клеток, так и на интенсивность флуоресценции, а в случае липосом P4 эффективность трансфекции

снижалась (рис. 4а, б). Ранее также было описано, что ковалентное связывание пептида NLS с линейной ДНК не увеличивало эффективность трансфекции клеток катионными полимерами [26]. Только в случае мультифункциональных катионных липосом F2P2 наблюдалось 1.5-кратное увеличение количества трансфицированных клеток комплексами пДНК/NLS (рис. 4а) и 1.3-кратное увеличение средней интенсивности флуоресценции (рис. 4б) по сравнению с использованием комплекса без NLS.

При соотношении N/P = 6/1 (рис. 4а, б) ПЭГ-содержащие липосомы P4 в 2 раза эффективнее доставляли предварительно сформированный комплекс пДНК/NLS по количеству трансфицированных клеток и в 1.5 раза – по средней интенсивности флуоресценции по сравнению с доставкой пДНК в отсутствие NLS.

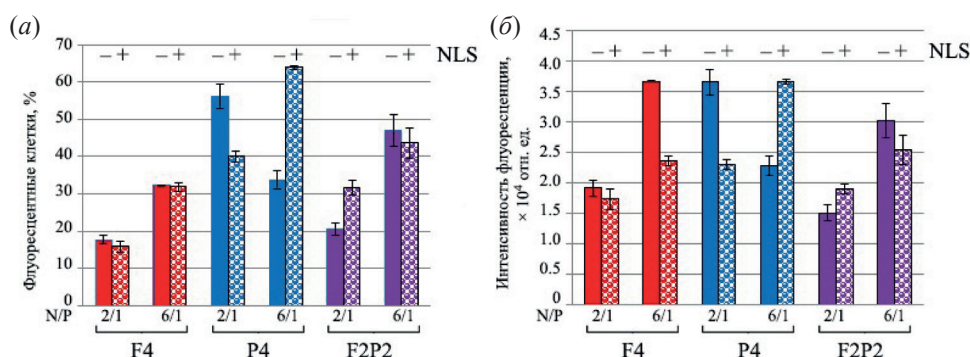


Рис. 4. Доставка пДНК pEGFP-C2 (2 мкг/мл) в клетки KB-3-1 с помощью мультифункциональных липосом F4, P4 и F2P2. Комплексы пДНК с липосомами формировали в присутствии (+) или в отсутствие (–) пептида NLS при соотношениях N/P = 2/1 и 6/1. Клетки инкубировали с комплексами в течение 4 ч с последующей отмывкой и дополнительной инкубацией клеток в течение 44 ч. (а) – Процент трансфицированных клеток и (б) уровень средней интенсивности флуоресценции (отн. ед.) клеток в популяции, измеренные методом проточной цитометрии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление катионных липосом. Все катионные липосомы были приготовлены методом гидратации тонкой липидной пленки. Раствор поликатионного липида 1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозана тетрагидрохлорида (2X3) в смеси CHCl₃ : CH₃OH (5 : 1 мольн.) добавляли к раствору 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DOPE, Avanti Polar Lipids, США) в CHCl₃ в мольном соотношении 1 : 2 и осторожно перемешивали. Добавляли 4% мольн. раствор липида F12 (липосомы F4), 4% мольн. раствор липида P800 (липосомы P4) или по 2% мольн. растворов ли-

пида F12 и P800 (липосомы F2P2) в CHCl₃ : CH₃OH (1 : 1), органические растворители удаляли в вакууме. Полученную липидную пленку высушивали в течение 4 ч при 0.1 Торр для удаления остаточных органических растворителей и гидратировали в деионизированной воде (MilliQ, Burlington, США) при 4°C в течение ночи. Полученную липидную дисперсию обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин при 70–75°C в ультразвуковом аппарате банного типа (Bandelin Sonorex Digitec DT 52H, Германия), фильтровали через стерильный фильтр Chromafil CA-45/25 (S) (Macherey-Nagel, Германия) с размером пор 450 нм и хранили при 4°C. В полученной дисперсии концентрация катионного липида 2X3 составляла 1 мМ.

Плазмиды. Коммерчески доступную плазмиду pEGFP-C2 (Clontech, Германия), кодирующую EGFP, использовали для проведения экспериментов по трансфекции плазмидной ДНК (пДНК).

Приготовление комплексов катионных липосом с нуклеиновыми кислотами. Растворы катионных липосом L (25 мкл) и пДНК (25 мкл) в концентрациях, соответствующих необходимым соотношениям N/P, смешивали в среде Opti-MEM® (ThermoFisher Scientific, США) и инкубировали 20 мин при 24°C.

Растворы катионных липосом F4, P4 или F2P2 (25 мкл) и пДНК (25 мкл) в концентрациях, соответствующих необходимым соотношениям N/P, смешивали в среде FD-RPMI (ThermoFisher, США) с добавлением 5% FBS и инкубировали 20 мин при 24°C.

В случае оценки эффекта NLS пДНК (0.5 мг/мл), разведенные в Opti-MEM® (ThermoFisher Scientific, США), смешивали с раствором пептида NLS в воде (1 мг/мл) при зарядовом соотношении 1 : 1. Полученные смеси инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Комплексы катионных липосом с пДНК : NLS формировались при соотношениях N/P 2/1 и 6/1. Полученные смеси дополнительно инкубировали в течение 20 мин при 24°C.

Клеточные линии и условия культивирования. Клетки почки эмбриона человека НЕК 293 и клетки рака шейки матки человека KB-3-1 получены из Банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия).

Клетки KB-3-1 и НЕК 293 выращивали на среде FD-RPMI с добавлением 5% FBS, антибиотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина) в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37°C и регулярно пассировали для поддержания экспоненциального роста.

Трансфекция клеток. Клетки НЕК 293 и KB-3-1 высаживали в 24-луночные планшеты (при плотности посадки 1.2×10^5 клеток на лунку для НЕК 293 и 0.5×10^5 клеток на лунку для KB-3-1) и инкубировали в течение 24 ч. В день трансфекции культуральную среду заменяли на среду FD-RPMI (200 мкл) с 5%-ной FBS (без антибиотиков). К клеткам добавляли комплексы пДНК (2 мкг/мл) с катионными липосомами (0.77, 1.54, 2.31 и 3.08 мкл), сформированные при соотношениях N/P

2/1, 4/1, 6/1 и 8/1 соответственно, и инкубировали в стандартных условиях в течение 4 ч (рис. 2, 4) или 90 мин (рис. 3), затем заменяли среду на свежую FD-RPMI с 5% FBS (500 мкл) и дополнительно инкубировали при 37°C в течение 44 ч (рис. 2) или 46.5 ч (рис. 4).

Проточная цитометрия. Для оценки эффективности доставки пДНК клетки KB-3-1 и НЕК 293 дважды промыли фосфатно-солевым буфером (PBS), обрабатывали раствором трипсина в PBS (0.5 мг/мл) в течение 2 мин при 37°C для открепления клеток с поверхности лунки. Открепившиеся клетки суспендировали в среде DMEM с 10% FBS для ингибирования дальнейшего действия трипсина, переносили в пробирки и осаждали центрифугированием (Eppendorf MiniSpin, Eppendorf, Германия) при 200g в течение 10 мин. Супернатант убирал, клетки дважды промывали PBS и фиксировали 2%-ным раствором формальдегида в PBS (600 мкл). Количество трансфицированных клеток и среднее значение интенсивности флуоресценции в клеточной популяции измеряли на цитофлуориметрах NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, США) и Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали не менее 2×10^4 клеток. Все экспериментальные точки были получены в результате трех независимых экспериментов.

Анализ задержки в геле. Для оценки эффективности упаковки пДНК электрофорез проводили с использованием 1%-ного агарозного геля в трис-боратном буфере (pH 8.0) при постоянном потенциале 180 В в течение 20 мин при комнатной температуре. Подвижность пДНК pEGFP-C2 визуализировали с помощью окрашивания бромистым этидием.

Физико-химические характеристики. Для характеристики липосом 25 мкл липосом (1 мМ) смешивали с 975 мкл деионизированной воды. Липоплексы предварительно формировали путем смешивания равных (25 мкл) объемов pEGFP-C2 и липосом, взятых в соответствующих концентрациях в деионизированной воде. Формирование липоплексов проводили в течение не менее 2 ч при 24°C. Затем липоплексы разводили в 1 мл деионизированной воды. Для измерения физико-химических параметров 1 мл липоплекса или суспензии липосом помещали в складчатую капиллярную кювету DTS1070 (Malvern Instruments, Malvern, Великобритания). Размер и индекс поли-

дисперсности липоплексов измеряли в трех биологических повторностях методом динамического рассеяния света с использованием анализатора Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, Великобритания) при угле рассеяния 173° и температуре 25°C . Измерения проводили с использованием программного обеспечения Zetasizer v7.11 (Malvern Instruments, Malvern, Великобритания). В программном обеспечении устанавливали вязкость 0.8872 сП и показатель преломления (RI) 1.330 для диспергатора, а также RI 1.020 и поглощение 1.335 для материала в суспензии. Перед общим измерением устанавливали время уравнивания 30 с. ζ -Потенциал измеряли при 25°C в трех биологических повторностях. Перед измерением устанавливали время уравнивания 120 с. Каждое измерение приостанавливали на 30 с перед следующим.

Статистический анализ. Переменные были выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD). Средние значения считали статистически значимыми при $p < 0.05$ (t -критерий Стьюдента).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было изучено влияние пептида NLS на эффективность доставки пДНК обычными и мультифункциональными катионными липосомами. В случае использования NLS в условиях адресной доставки пДНК (при низких соотношениях N/P) в клетки KB-3-1 наиболее оптимальные характеристики (эффективное ингибирование рецепторопосредованного эндоцитоза в присутствии свободной фолиевой кислоты (рис. 3), увеличение в 1.5 раза количества трансфицированных клеток (рис. 4)) продемонстрировали мультифункциональные катионные липосомы F2P2, содержащие 2% мольн. фолатного и 2% мольн. ПЭГ-липиды. При более высоких соотношениях N/P в случае накопления комплексов липосом с пДНК/NLS наиболее оптимальными оказались обычные катионные липосомы L на клетках HEK 293 (рис. 2г, д) и ПЭГилированные липосомы P4, содержащие 4% ПЭГ-липиды P800, на клетках KB-3-1 (рис. 4).

Полученные данные могут быть использованы для решения проблемы эффективной доставки пДНК в эукариотические клетки и увеличения эффективности экспрессии целевого белка в 1.5–2 раза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП РТУ МИРЭА при поддержке Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2025-548 от 18.06.2025).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 23-73-10168, работа О.В. Маркова и М.А. Зенковой поддержана за счет бюджета Российской Федерации (проект № 125012300659-6).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – ЕВШ, МАМ, МАЗ; экспериментальные работы – ЕВШ, ОВМ; написание статьи – ЕВШ, МАМ; анализ данных – ЕВШ, ОВМ, МАМ; администрирование проекта – МАЗ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scalzo S., Santos A.K., Ferreira H.A.S., Costa P.A., Prazeres P.H.D.M., da Silva N.J.A., Guimarães L.C., E Silva M.M., Rodrigues Alves M.T.R., Viana C.T.R., Jesus I.C.G., Rodrigues A.P., Birbrair A., Lobo A.O., Frezard F., Mitchell M.J., Guatimosim S., Guimaraes P.P.G. // Int. J. Nanomedicine. 2022. V. 17. P. 2865–2881.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S366962>
2. Prazeres P.H.D.M., Ferreira H., Costa P.A.C., da Silva W., Alves M.T., Padilla M., Thatte A., Santos A.K., Lobo A.O., Sabino A., Del Puerto H.L., Mitchell M.J., Guimaraes P.P.G. // Int. J. Nanomedicine. 2023. V. 18. P. 5891–5904.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S424723>

3. Lu B., Lim J.M., Yu B., Song S., Neeli P., Sobhani N.K.P., Bonam S.R., Kurapati R., Zheng J., Chai D. // *Front. Immunol.* 2024. V. 15. P. 1–24.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1332939>
4. Baghban R., Ghasemian A., Mahmoodi S. // *Arch. Microbiol.* 2023. V. 205. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1007/s00203-023-03480-5>
5. Lim M., Badruddoza A.Z.M., Firdous J., Azad M., Mannan A., Al-Hilal T.A., Cho C.S., Islam M.A. // *Pharmaceutics*. 2020. V. 12. P. 1–29.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010030>
6. Durymanov M., Reineke J. // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. P. 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00971>
7. Amoako K., Mokhammad A., Malik A., Yesudasan S., Wheba A., Olagunju O., Gu S.X., Yarovsky T., Faustino E.V.S., Nguyen J., Hwa J. // *Front. Med. Technol.* 2025. V. 7. P. 1591119.
<https://doi.org/10.3389/fmedt.2025.1591119>
8. Xu E., Saltzman W.M., Piotrowski-Daspi A.S. // *J. Control. Release*. 2021. V. 335. P. 465–480.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.038>
9. Cheng X., Lee R.J. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. V. 99. P. 129–137.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.022>
10. Kabilova T.O., Shmendel E.V., Gladkikh D.V., Chernolovskaya E.L., Markov O.V., Morozova N.G., Maslov M.A., Zenkova M.A. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 123. P. 59–70.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.11.010>
11. Dilliard S.A., Siegwart D.J. // *Nat. Rev. Mater.* 2023. V. 8. P. 282–300.
<https://doi.org/10.1038/s41578-022-00529-7>
12. Lin D.H., Hoelz A. // *Annu. Rev. Biochem.* 2019. V. 88. P. 725–783.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011901>
13. Губанова Н.В., Морозова К.Н., Киселева Е.В. // *Цитология*. 2006. V. 11. P. 887–899.
14. Roy S.M., Garg V., Sivaraman S.P., Barman S., Ghosh C., Bag P., Mohanasundaram P., Maji P.S., Basu A., Dirisala A., Ghosh S.K., Maitymit R. // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2023. V. 83. P. 104408.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104408>
15. Yao J., Fan Y., Li Y., Huang L. // *J. Drug Target.* 2013. V. 21. P. 926–939.
<https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.830310>
16. Fontes M.R.M., Teh T., Kobe B. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 297. P. 1183–1194.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3642>
17. Mashal M., Attia N., Maldonado I., Enríquez Rodríguez L., Gallego I., Puras G., Pedraz J.L. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2024. V. 201. P. 114385.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2024.114385>
18. Kurihara D., Akita H., Kudo A., Masuda T., Futaki S., Harashima H. // *Biol. Pharm. Bull.* 2009. V. 32. P. 1303–1306.
<https://doi.org/10.1248/bpb.32.1303>
19. Nematollahi M.H., Torkzadeh-Mahanai M., Pardakhty A., Ebrahimi Meimand H.A., Asadikaram G. // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018. V. 46. P. 1781–1791.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1392316>
20. Bishani A., Makarova D.M., Shmendel E.V., Maslov M.A., Sen'kova A.V., Savin I.A., Gladkikh D.V., Zenkova M.A., Chernolovskaya E.L. // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. P. 92184.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092184>
21. Shmendel E.V., Bakhareva S.A., Makarova D.M., Chernikov I.V., Morozova N.G., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Maslov M.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 1250–1260.
<https://doi.org/10.1134/S106816202006031X>
22. Mornet E., Carmoy N., Lainé C., Lemiègre L., Le Gall T., Laurent I., Marianowski R., Férec C., Lehn P., Benvegnu T., Montier T. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 1477–1501.
<https://doi.org/10.3390/ijms14011477>
23. Wang S., Lee R.J., Cauchon G., Gorensteint D.G., Lowt P.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 3318–3322
24. Xu Z., Jin J., Siu L.K.S., Yao H., Sze J., Sun H., Kung H., Poon W.S., Ng S.S.M., Lin M.C. // *Int. J. Pharm.* 2012. V. 426. P. 182–192.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.009>
25. Jones S.K., Sarkar A., Feldmann D.P., Hoffmann P., Merkel O.M. // *Biomaterials*. 2017. V. 138. P. 35–45.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.05.034>
26. van der Aa M.A.E.M., Koning G.A., d'Oliveira C., Oosting R.S., Wilschut K.J., Hennink W.E., Crommelin D.J.A. // *J. Gene Med.* 2005. V. 7. P. 208–217.
<https://doi.org/10.1002/jgm.643>

NLS Peptide Improves the Efficiency of pDNA Delivery into Eukaryotic Cells by Cationic Liposomes

E. V. Shmendel^{*, #}, O. V. Markov^{**}, M. A. Zenkova^{**}, and M. A. Maslov^{*}

[#] Phone: +7 (499) 600-80-80, e-mail: elena_shmendel@mail.ru

^{*} Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University,
prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

^{**} Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
prosp. Ak. Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

Conventional and multifunctional cationic liposomes that efficiently deliver plasmid DNA (pDNA) were obtained. Partial inhibition of receptor-mediated endocytosis of pDNA complexes with multifunctional cationic liposomes containing folate lipids was shown in the presence of free folic acid in the cellular medium. Additional formation of pDNA complexes with the nuclear localization signal (NLS) peptide allowed increasing the efficiency of green fluorescent protein expression by 1.5–2 times using conventional and multifunctional cationic liposomes. Addition of the NLS peptide to pDNA and subsequent formation of complexes with cationic liposomes can be used to solve the problem of efficient pDNA delivery into eukaryotic cells.

Keywords: multifunctional cationic liposomes, PEG-lipid, folate lipid, NLS peptide, pDNA, folic acid