DOI: 10.23868/202012005

НЕВИРУСНАЯ ДОСТАВКА ГЕНА *BMP2* ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

И.А. Недорубова[1, 2], Т.Б. Бухарова[1, 2], А.В. Васильев[1, 2], Д.В. Гольдштейн[1, 2], А.А. Кулаков[2]

[1] *Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия*

[2] *Национальный медицинский исследовательский центр «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии», Москва, Россия*

Поступила: 17.09.2020
Принята к печати: 21.12.2020
Опубликована on-line: 29.12.2020

NON-VIRAL DELIVERY OF THE *BMP2* GENE FOR BONE REGENERATION

I.A. Nedorubova[1, 2], T.B. Bukharova[1, 2], A.V. Vasilyev[1, 2], D.V. Goldshtein[1, 2], A.A. Kulakov[2]

[1] *Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia*

[2] *Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russia*

e-mail: nedorubova.ia@gmail.com

Ген-активированные костно-пластические материалы являются перспективным инструментом для заживления костных дефектов, они способны индуцировать пролонгированную продукцию факторов роста с терапевтическим действием в физиологических концентрациях. Наиболее безопасны для клинического применения невирусные способы доставки плазмидных конструкций с целевыми генами, но их эффективность ниже по сравнению с вирусными векторами. Для решения проблемы доставки плазмид в клетки ведется разработка систем с высокой трансфицирующей активностью, обеспечивающих достаточную жизнеспособность клеток. Кроме того, используются подходы для повышения уровня экспрессии целевых генов и их адресной доставки в зону костного дефекта с целью достижения локальных терапевтических концентраций. В настоящем обзоре рассмотрены подходы, направленные на повышение эффективности методов регенерации костной ткани, основанных на невирусных системах доставки генов индукторов остеогенеза на примере гена костного морфогенетического белка-2 — *BMP-2*.

Ключевые слова: ген-активированные материалы, BMP-2, невирусные системы доставки, регенерация костной ткани.

Gene-activated bone grafts and substitutes are promising tools for the bone defect healing, which are capable to induce prolonged production of growth factors with a therapeutic effect at physiological concentrations. Non-viral methods of delivering plasmid constructs with target genes are the safest for clinical use, but their efficiency is lower in comparison with viral vectors. To solve the problem of plasmid delivery into cells, some systems with a high transfection capacity and ensure sufficient cell viability are being developed. Moreover, there are different approaches to improve the level of expression of target genes and targeted delivery to the bone defect in order to achieve local therapeutic concentrations. This review considers approaches which are aimed to increase the efficiency of bone tissue regeneration methods based on non-viral delivery systems for osteoinduction genes using the example of the bone morphogenetic protein-2 gene.

Keywords: gene-activated materials, BMP-2, non-viral delivery systems, bone tissue regeneration.

Введение

Для заживления костных дефектов традиционно применяют аутогенную костную ткань. Её достоинством является наличие естественных факторов роста, которые обеспечивают эффективную остеоиндукцию. Тем не менее, аутотрансплантация, являясь «золотым стандартом», не лишена недостатков, связанных с необходимостью дополнительного хирургического вмешательства и ограниченностью объёма донорских тканей [1]. Заменой аутотрансплантатов могут стать активированные костно-пластические материалы, являющиеся источниками остеогенных факторов [2].

Ключевыми остеоиндуктивными факторами в организме являются костные морфогенетические белки (bone morphogenetic proteins, BMPs) [3]. Они представляют собой секретируемые гетеро- и гомодимерные гликопротеины, которые действуют как лиганды для специфических BMP-рецепторов на плазматической мембране клеток различных типов, осуществляя паракринную регуляцию процессов клеточной пролиферации, апоптоза, дифференцировки и морфогенеза и имеют важное значение в эмбриональном развитии [3]. Особенно важную роль в формировании и регенерации костной ткани играют BMP-2, -4, -6, -7 и -9 [4, 5].

Один из наиболее эффективных индукторов остеогенеза, активирующих экспрессию маркеров остеобластов — белок BMP-2 (локализация 20p12) [6, 7]. Мутации в гене, кодирующем BMP-2, способствуют повышению хрупкости костей, нарушениям энхондрального остеогенеза и минерализации костного матрикса [8]. Нокаут гена *BMP2* у эмбрионов приводит к летальному исходу [9]. Эти данные обуславливают интерес многих ученых к исследованию регенерации с использованием BMP-2 с целью его дальнейшего применения в качестве ключевого компонента костно-пластических материалов.

По результатам экспериментальных и клинических исследований было показано, что материалы с BMP-2 являются более эффективными по сравнению с традиционными неактивированными костно-пластическими материалами [10]. Изделие на основе BMP-2 (INFUSE Bone Graft) был одобрен FDA (Food and Drug Administration, США) в качестве альтернативы костным трансплантатам для межтелового спондилодеза (2002), костной пластики при переломах большеберцовой кости (2004), а также для синуслифтинга и аугментации альвеолярного гребня (2007) [4, 11].

Однако существенным недостатком использования белков семейства BMPs, осуществляющих паракринную регуляцию, является короткий период полураспада и быстрая деградация, что требует добавления избыточного количества остеоиндуктора для достижения терапевтического эффекта. Супрафизиологические дозы BMP-2 могут вызывать нежелательные осложнения в виде воспалительных [12, 13] и иммунных реакций, приводить к избыточному разрастанию костной ткани [14, 15] или, напротив, усиливать костную резорбцию [16,

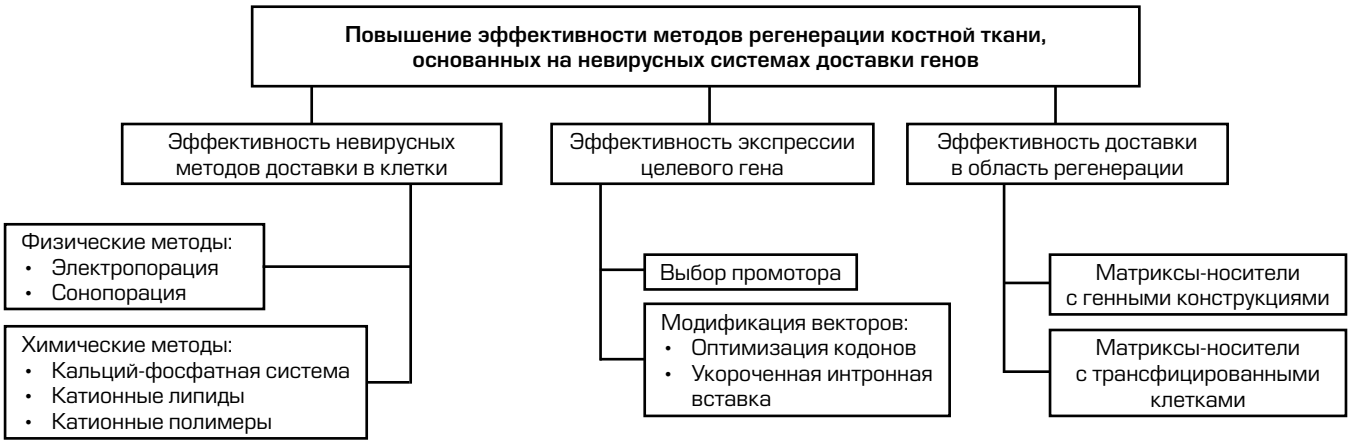

Рис. 1. Повышение эффективности методов регенерации костной ткани, основанных на невирусных системах доставки генов

17]. В нескольких исследованиях был сделан вывод о том, что использование rhBMP-2 не повышает риск возникновения опухолевых новообразований [18, 19]. Но также есть данные, что при артродезе поясничного отдела позвоночника с применением высоких доз rhBMP-2 через 2 года риск развития опухоли увеличивался пятикратно [20]. Кроме того, BMP-2 может способствовать развитию уже существующих опухолей [21, 22]. В связи с опасениями по поводу возможности rhBMP вызывать онкологическую трансформацию, FDA запретили использование rhBMP у пациентов с опухолями в анамнезе. Из-за непредсказуемых побочных эффектов и высокой стоимости рекомбинантных белков перспективы белковой терапии сильно ограничены.

В отличие от применения rhBMP-2, генная терапия обеспечивает продолжительную секрецию BMP-2 в невысоких физиологических концентрациях, имитируя действие BMP-2 в процессе заживления раны, что позволяет избежать побочных эффектов, связанных с использованием высоких доз rhBMP-2. В зависимости от выбора системы доставки, трансфекция BMP-2 может быть транзиентной или стабильной и инициировать секрецию белка в течение от нескольких дней до нескольких недель, соответственно [23]. При этом эффективная концентрация BMP-2 при трансфекции составляет 100–10000 пг/мл, что существенно ниже по сравнению с применением рекомбинантного белка (0,75–2,0 мг/мл) [24]. Трансфекция плазмидным вектором с *BMP2* обеспечивает медленное, но устойчивое формирование кости с физиологической морфологией, тогда как рекомбинантный белок вызывает нежелательный быстрый рост неоформленной костной ткани [25].

Эффективность и безопасность генной терапии зависит, главным образом, от выбора векторной системы, которые можно разделить на вирусные и невирусные. Применение вирусных векторов, благодаря природным механизмам проникновения вирусов в клетки, позволяет достичь высокой эффективности генной трансдукции и может обеспечивать адресную доставку в определенные типы клеток, что приводит к высокому уровню экспрессии генов в зоне регенерации [23]. Недостатками вирусной доставки являются ограниченная пакующая способность векторов, опасность инсерционного мутагенеза и иммунного ответа на вирусные частицы. Подходы, основанные на использовании плазмид, лишены этих недостатков — невирусные векторы имеют высокую пакующую емкость, они относительно безопасны с точки зрения канцерогенности и, как правило, неиммуногенны, что делает их более предпочтительными для клинического применения по сравнению с вирусными векторами [26]. Кроме того, экспрессия трансгена плазмиды является временной, что исключает перманентную экспрессию после регенерации ткани [27]. Однако методы невирусной доставки тоже имеют свои недостатки, основным из которых является низкая эффективность трансфекции, особенно когда клетка-мишень относится к «трудно-трансфицируемым», как, например, клеточные линии первичных корковых нейронов [28], карциномы толстой кишки CT26 [29] и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) [30, 31], поэтому в настоящее время усилия исследователей направлены на повышение эффективности невирусных методов доставки генных конструкций в клетки и увеличение уровня экспрессии целевого гена для обеспечения эффективных концентраций терапевтических генов (рис. 1).

Выбор методов усиления трансфекции клеток

Плазмиды, в отличие от вирусов, не обладают природной способностью проникать через плазматическую мембрану, поэтому для трансфекции используют специальные физические или химические методы доставки. Как правило, проникновение плазмид в клетки сопровождается нарушением целостности клеточной мембраны или накоплением токсических компонентов, что может вызывать гибель клетки. Современные методы невирусной доставки нацелены на решение проблемы повышения трансфицирующей способности при сохранении жизнеспособности клеток.

Физические методы усиления трансфекции

На сегодняшний день в генной терапии костной ткани наиболее широко используют такие физические методы, как электропорация [32–34] и сонопорация [35]. Электропорация позволяет увеличить проницаемость клеточных мембран для введения целевых генов за счет подачи коротких импульсов высокого напряжения [36]. Механизм образования пор при сонопорации основан на действии акустической кавитации, возникающей в результате ультразвукового воздействия высокой интенсивности, что приводит к образованию более крупных пор, чем при электропорации [35, 37]. Хотя данные подходы и показывают значительную эффективность, но высокая интенсивность воздействия часто оказывается губительной для клеток [37].

Как правило, эти технологии используют в генной терапии ex vivo для трансфекции клеток перед трансплантацией. Электропорация человеческих ММСК плазмидой с геном *BMP2* обеспечивала продукцию белка BMP-2 в течение 14 сут. in vitro, а после внутримышечной трансплантации трансфицированных клеток мышам наблюдалось формирование кости через 4 недели [33]. В некоторых исследованиях физические методы для доставки гена *BMP2* применяли in vivo. Было показано, что перенос плазмид, содержащих ген *BMP2,* в том числе в сочетании с другими генами, с помощью электропорации приводил к образованию большого объема новой костной ткани в модели дистракционного остеогенеза нижней челюсти кролика [32], а также в тканях пародонта первых верхнечелюстных моляров крыс [34]. Применение сонопорации для доставки *BMP2/7* в область дефекта бедренной кости крыс способствовало эктопическому образованию кости и заживлению раны [35]. Однако, из-за высокой вероятности повреждения клеток, применение физических методов трансфекции ограничено.

Химические методы усиления трансфекции

Кальций-фосфатные соединения

Одним из первых химических компонентов для доставки нуклеиновых кислот стала кальций-фосфатная система. Двухвалентные катионы Ca^{2+} образуют стабильные ионные комплексы с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами, которые переносятся в клетки посредством эндоцитоза. Комплексы хорошо совместимы и легко биоразлагаются в отличии от катионных полимеров и липидов [38]. Недостатком кальций-фосфатного метода является относительно низкая эффективность трансфекции, около 10–20% [39]. Было показано, что трансфекция клеток пульпы зубы наночастицами фосфата кальция с плазмидой с геном *BMP2* способствует значительному увеличению продукции BMP-2 и активности щелочной фосфатазы [40].

Катионные липиды

За последние десять лет было разработано большое количество векторов на основе липидов для трансфекции клеток. Катионные липиды имеют положительно заряженные гидрофильные головки и гидрофобные хвосты, связанные друг с другом линкером. Катионные участки связываются с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами, образуя липоплексы. Линкерная группа (сложноэфирная, эфирная, карбамоильная, дисульфидная) определяет стабильность и способность катионных липидов к биодеградации [38]. Проникновение липоплексов через клеточную мембрану осуществляется путем эндоцитоза в результате электростатического взаимодействия между катионным липидом и отрицательно заряженной поверхностью клетки [41]. Относительно недавно было высказано предположение, что в этом процессе принимают участие специальные переносчики холестерина. В связи с этим для повышения эффективности трансфекции разрабатываются новые холестеринсодержащие катионные липиды [42]. Они являются одним из самых универсальных и эффективных инструментов для доставки нуклеиновых кислот [43]. Была показана способность препаратов на основе катионных липидов, таких как Lipofectamine, обеспечивать доставку гена *BMP2* в различные клеточные культуры, в том числе в такие «труднотрансфицируемые», как ММСК [44, 45] и первичные клетки пульпы зуба [46], вызывая остеогенную дифференцировку. По сравнению с наночастицами фосфата кальция, Lipofectamine 2000 оказался более эффективным при трансфекции ММСК геном *BMP2* [40]. Использование липоплексов других марок, например, LipoGen, с *BMP2* также приводило к успешной трансфекции ММСК и увеличению экспрессии остеогенных маркеров [47]. Однако в сравнении с вирусной трансдукцией, липосомный препарат Metafectene, хотя и продемонстрировал достаточную эффективность, но значительно уступал аденовирусным конструкциям для доставки гена *BMP2* в ММСК [48].

Катионные полимеры

Еще одним важным классом веществ для доставки плазмид в клетки являются катионные полимеры. Они образуют комплексы (полиплексы) с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот посредством электростатических взаимодействий. Катионные полимеры обеспечивают трансфекцию за счет нейтрализации заряда и конденсации нуклеиновых кислот, что облегчает их поглощение клетками, они способствуют защите ДНК от нуклеаз, помогают в эндосомальном высвобождении за счет притяжения отрицательно заряженных ионов в эндосому, вызывая ее разрыв и высвобождение полиплексов в цитоплазму [49]. Полиплексы обычно более стабильные, чем липоплексы [50]. Полимеры, используемые для доставки нуклеиновых кислот, по происхождению можно разделить на природные (хитозан, альгинат и т.д.) и синтетические (полиэтиленимины, полиамины, полипропиленимины и т.д.) [51]. Искусственные молекулы не подвержены биологическому разложению, поэтому высок риск их накопления в организме. Преимущества природных полимеров — их низкая токсичность и способность разрушаться клеточными ферментами. Кроме того, они могут служить носителями для клеток и векторов [52].

Известно, что наиболее широко используемым синтетическим катионным полимером для трансфекции на сегодняшний день является полиэтиленимин (PEI) [53–55]. Его свойства варьируют в зависимости от геометрии цепи (линейной или разветвленной) и молекулярной массы полимера. Уровень эффективности трансфекции, достигаемый с помощью PEI, считается сравнимым с уровнем вирусных векторов [56]. Во многих исследованиях как in vitro, так и in vivo было показано, что PEI — высокоэффективный агент для доставки плазмид. Проникновение полиплексов с PEI в клетки обусловлено связыванием с рецепторами синдеканов (трансмембранных гепарансульфатпротеогликанов) с последующим постепенным электростатическим смыканием плазматической мембраны вокруг частиц [57]. Применение разветвленного PEI25 (MW=25 kDa) с плазмидами, несущими ген *BMP2,* приводило к остеогенной дифференцировке культур ММСК [54, 55, 58, 59] и остеобластов [60]. Однако было обнаружено, что трансфекция ММСК с PEI25 вызывала резкое снижение жизнеспособности клеток [54]. Модификация систем на основе PEI позволяет снизить токсичность. Для этой цели может быть использована пептидная последовательность mTAT, несущая остатки гистидина и цистеина. При внутриклеточной доставке *BMP2* с помощью полиплекса с mTAT/PEI не было выявлено цитотоксичности и была продемонстрирована значительно более эффективная остеогенная дифференцировка ММСК по сравнению с применением PEI25 [54]. Также повысить жизнеспособность клеток удалось при использовании полимера с более низкой молекулярной массой — PEI2 (MW=2 kDa) [54]. Значительные успехи могут быть достигнуты при

применении для трансфекции молекул хитозана. При добавлении хитозана к PEI был получен низкомолекулярный гетерополимер (MW=1.8 kDa), способствующий более эффективной трансфекции и остеогенной дифференцировке клеток ММСК, чем PEI25 [61]. PELA микросферы на основе триблок-сополимера: полилактид (PLA) — полиэтиленгликоль (PEG) — полилактид (PLA) с инкапсулированными наночастицами аргинин-хитозан/рBMP-2 и хитозан/рBMP-2 вызывали остеоиндукцию клеток MC3T3-E1 [62], а также ММСК [63]. Кроме того, эффективными поликатионными реагентами являются полиамидамин (PAMAM), дендример и TurboFect, применение которых для доставки гена *BMP2* способствовало эффективной дифференцировке остеобластов [64, 65] и ММСК [66, 67].

Химические методы доставки нуклеиновых кислот, в отличие от физических, основаны на использовании физиологических механизмов проникновения частиц в клетки, таких как эндоцитоз, поэтому их применение не так губительно для клеток. Благодаря вариабельности структуры и свойств используемых молекул, могут быть получены комплексы, которые способны эффективно проникать в клетку, в том числе посредством взаимодействия с мембранными рецепторами.

Повышение уровня экспрессии целевого гена

Подходы, направленные на повышение уровня экспрессии целевого гена с целью обеспечения терапевтических концентраций целевого белка, могут существенно повысить эффективность заживления костного дефекта при использовании ген-активированных материалов.

Выбор промотора

Ключевым компонентом плазмидных конструкций, определяющим эффективность экспрессии целевого гена, является промотор. Плазмиды, используемые для доставки *BMP2,* в большинстве случаев содержат промотор цитомегаловируса (CMV), обеспечивающий достаточно высокий уровень экспрессии гена [32, 40, 54, 68]. Кроме того, в их состав могут входить промотор фактора элонгации 1α человека (EF1α) [44, 63], промотор убиквитина С человека (UBC) [64], промотор β-актина цыпленка в сочетании с ранним энхансером CMV (CAG) [34, 63] и ранний промотор вируса обезьяны 40 (SV40) [58]. Сравнительное исследование функционирования этих конститутивных промоторов (CMV, EF1α, UBC, CAG и SV40) с репортерным геном *GFP* на нескольких клеточных линиях, показало не только различия в эффективности, но и существенную вариабельность в зависимости от типа клеток. Промотор UBC оказался самым слабым во всех типах клеток, а промоторы EF1A, CAG и SV40, напротив, продемонстрировали высокую эффективность, при этом промотор SV40 был несколько слабее, чем EF1A и CAG. Наиболее вариабельным в зависимости от типа клеток оказался промотор CMV: он обеспечивал высокую эффективность экспрессии целевого гена в клетках культур фибросаркомы человека (HT1080), эмбриональных почек человека (HEK 293) и опухоли молочной железы (CMMT), но низкую эффективность в культурах ММСК крысы и фибробластов человека (MRC5) [69].

Модификация векторов

Эффективность экспрессии *BMP2* часто повышают с помощью так называемых Advanced-векторов, модифицированных путем оптимизации кодонов и содержащих сильно укороченную интронную вставку [63, 70, 71]. Кодоновая оптимизация направлена на применение триплетов, предпочтительно используемых данным организмом, которые определяют по концентрации соответствующих тРНК внутри клеток. Кодоны могут влиять на регуляцию биосинтеза белка, ускоряя трансляцию. Добавление коротких искусственных интронов повышает скорость транскрипции, позволяет стабилизировать молекулы мРНК и способствует их экспорту в цитозоль. Было показано, что трансфекция различных клеточных линий и культур ММСК Advanced-векторами приводила к значительному увеличению синтеза белка BMP-2 по сравнению с немодифицированными плазмидами [63, 70]. Однако результаты сравнительной оценки эффективности различных промоторов EF1α и CMV в Advanced-векторах противоречат друг другу в разных работах, что может быть связано с особенностями клеточных культур или условий трансфекции [63, 70].

Для генной терапии представляет большой интерес использование систем, в которых экспрессию терапевтических генов можно регулировать. Наиболее часто применяют систему TetOn, содержащую промотор, чувствительный к доксициклину [35]. На модели дефекта бедренной кости крыс было показано эффективное образование костной ткани при активации экспрессии генов *BMP2/7* системным применением доксициклина [35].

Таким образом, выбор оптимальной конфигурации плазмидной конструкции позволяет существенно повысить уровень экспрессии целевого гена, в том числе регулируя сроки этой экспрессии. Это приводит к повышению концентрации остеоиндуктора для достижения терапевтического эффекта при использовании ген-активированных материалов.

Доставка плазмид в область дефекта

Еще одной важной задачей при разработке генной терапии костной ткани является адресная доставка генных конструкций в область костного повреждения для достижения высокой терапевтической эффективности. С этой целью плазмиды размещают на матриксах-носителях, что обеспечивает их стабильную локализацию в реципиентном ложе, доступ к резидентным клеткам, участвующим в регенерации, возможность пролонгированного высвобождения плазмид в соответствии с этапами регенерации и защиту от деградации внешними факторами среды. При выборе материала для доставки плазмид важно обратить внимание на необходимость использования трансфицирующих факторов для формирования комплексов с нуклеиновыми кислотами. В связи с этим особый интерес представляют материалы на основе фосфатов кальция [72, 73] или катионных полимеров, таких как хитозан [63, 74], которые сами могут связываться с плазмидами и доставлять их в клетки. Было показано, что применение кальций-фосфатных частиц с коллагеном [73] и фибронектином [72] в качестве матриксов-носителей гена *BMP2* эффективно способствовало костной регенерации при восполнении дефектов черепа [72] и большеберцовой кости у крыс [73]. Также было продемонстрировано заживление костных ран при использовании ген-активированных материалов с *BMP2* на основе хитозана при восполнении дефектов черепа крыс [63] и дефектов альвеолярной кости гончих собак [74].

По результатам многих исследований признано эффективным совместное использование

трансфицирующего компонента полиэтиленимина с материалами на основе эфиров органических кислот. Применение поли(d,l-лактида) (PDLLA) или полилактоглиголида (PLGA) для доставки полиплексов PEI с геном *BMP2* в зону повреждения приводило к восполнению костных дефектов черепа [60] и нижней челюсти [25, 75] у крыс.

Достаточно часто в качестве материалов-носителей для генной терапии костной ткани используют природные полимеры, импрегнированные полиплексами или липоплексами с геном *BMP2*. Хорошо себя зарекомендовали такие материалы, как фибриновый сгусток [76], гидрогель на основе альгината [45] и коллагеновые губки [77, 78] при восполнении дефектов различных костей конечностей крысы [76], кролика [78] и свиньи [77]. Однако применение природных компонентов вызывает проблемы, связанные с их стерилизацией, стандартизацией состава, потенциальной возможностью сохранения антигенных свойств, что существенно ограничивает перспективы клинического использования таких материалов.

Более эффективные стратегии доставки нуклеиновых кислот основаны на применении подходов генной терапии ex vivo, предполагающей трансплантацию клеток, предварительно трансфицированных векторами, в составе различных материалов. Такой подход позволяет отбирать представляющие интерес популяции клеток, контролировать и анализировать генетические изменения в клетках до трансплантации, обеспечивать защиту векторов от иммунных клеток и ферментных воздействий, а также высокую эффективность экспрессии терапевтических генов при использовании небольшого количества векторов. Более высокая эффективность терапии ex vivo в сравнении с in vivo была показана в экспериментальных исследованиях при трансплантации ММСК, трансфицированных плазмидами с геном *BMP2*, и введении плазмид мышам и крысам подкожно и внутримышечно [45, 68].

Наиболее предпочтительными культурами для применения в терапии ex vivo являются культуры ММСК благодаря их высокой пролиферативной активности и способности дифференцироваться в клетки костной, хрящевой, жировой и других тканей [79, 80]. Эффективность терапии с использованием ММСК и остеобластов, трансфицированных плазмидами с геном *BMP2,* была доказана в модели гетеротопического остеогенеза у иммунодефицитных мышей [81, 82], а также при заживлении костных дефектов у различных животных [47, 48, 64, 71].

Материалами матриксов-носителей для трансфицированных клеток также часто являются различные полимеры. Были признаны успешными ген-активированные остеопластические материалы с геном *BMP2* на основе желатиновых или коллагеновых губок [48, 83, 84]. Важно отметить, что одни и те же матрицы можно использовать как для доставки плазмид, так и трансфицированных клеток. Подкожная трансплантация альгинатного гидрогеля с ММСК, трансфицированными плазмидами с геном *BMP2,* по сравнению с введением этого материала с плазмидой иммунодефицитным мышам показала большую эффективность [45]. Аналогичные результаты были получены с использованием материала на основе пористого двухфазного фосфата кальция на крысах при подкожном и внутримышечном введении [68]. Особый интерес представляют технологии 3D-биопринтинга, получившие активное развитие в последние годы. Конструкции, напечатанные в системе 3D Discovery из гидрогелей на основе альгината и метилцеллюлозы-альгината, инкапсулированные ММСК, трансфицированными плазмидами с *BMP2*, индуцировали значительное усиление минерализации при подкожном введении иммунодифицитным мышам [85].

Однако по сравнению с использованием ген-активированных материалов, подходы генной терапии ex vivo имеют и свои недостатки — требуются дополнительное хирургическое вмешательство для получения аутогеннных клеток, а также технологии технически более сложные и дорогостоящие [24], что делает их менее перспективными для внедрения в клиническую практику [86].

Заключение

Методы оптимизации регенерации костной ткани, основанные на использовании генных конструкций с геном *BMP2*, имеют большой потенциал для клинического применения. Генная терапия обеспечивает продолжительную секрецию BMP-2 в невысоких физиологических концентрациях, что позволяет избежать нежелательных побочных эффектов, связанных с использованием высоких доз rhBMP-2. Наиболее безопасны невирусные способы доставки плазмидных конструкций с целевыми генами. Они лишены недостатков вирусных векторов: исключают риск развития инсерционного мутагенеза, не вызывают выраженных иммунных реакций и позволяют встраивать трансгены достаточно большого размера.

Существенным недостатком невирусной доставки является относительно низкая эффективность трансфекции клеток. Для повышения трансфицирующей способности наиболее перспективны химические методы доставки, с применением катионных липосом и полимеров. Их действие основано на реализации физиологических механизмов проникновения частиц в клетки, таких как эндоцитоз, что позволяет обеспечить высокий уровень трансфекции и сохранить жизнеспособность клеток на высоком уровне. Для достижения терапевтических концентраций целевого белка применяют подходы, нацеленные на повышение уровня экспрессии гена за счет выбора эффективного промотора и модификации векторов путем оптимизации кодонов и укороченных интронных вставок. Разработка новых матриц-носителей для адресной доставки генных конструкций и их пролонгированное высвобождение направлена на обеспечение локально высокой концентрации плазмид в зоне костного дефекта в соответствии с этапами регенерации.

Таким образом, использование ген-активированных материалов открывает большие возможности для стимуляции регенерации кости, что подтверждено на многочисленных моделях костных дефектов и гетеротопического остеогенеза у малых и крупных лабораторных животных. В настоящее время в России уже зарегистрирован первый в мире ген-активированный материал для костной пластики, содержащий ген фактора роста эндотелия сосудов [87]. Убедительные результаты исследований материалов с геном *BMP2* делают их многообещающими кандидатами для разработки новых перспективных технологий лечения костных дефектов.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 161500298 (основная часть обзора) и средств государственного задания Минобрнауки России (раздел «Повышение уровня экспрессии целевого гена»).

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]:

1. Kumar P., Vinitha B., Fathima G. Bone grafts in dentistry. J. Pharm. Bioallied Sci. 2013; 5(5): 125–7.

2. Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Бозо И.Я. Ординарные и активированные остеопластические материалы. Вестник травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова 2015; 1: 51–69. [Deev R.V., Drobyshev A.Yu., Bozo I.Y. Ordinary and activated osteoplastic materials. N.N. Priorov Journal of Traumatology and Orthopedics 2015; 1: 51–69].

3. Carreira A.C., Zambuzzi W.F., Rossi M.C. et al. Bone morphogenetic proteins: promising molecules for bone healing, bioengineering, and regenerative medicine. Vitam. Horm. 2015; 99: 293–322.

4. Schmidt-Bleek K., Willie B.M., Schwabe P. et al. BMPs in bone regeneration: Less is more effective, a paradigm-shift. Cytokine Growth Factor Rev. 2016; 27: 141–8.

5. Salazar V.S., Gamer L.W., Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. Nat. Rev. Endocrinol. 2016; 12(4): 203–21.

6. Mi L.Z., Brown C.T., Gao Y. et al. Structure of bone morphogenetic protein 9 procomplex. PNAS USA 2015; 112(12): 3710–5.

7. Spinella-Jaegle S., Roman-Roman S., Faucheu C. et al. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. Bone 2001; 29(4): 323–30.

8. Chen G., Deng C., Li Y.P. TGF-β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. Int. J. Biol. Sci. 2012; 8(2): 272–88.

9. Zhang H., Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. Development 1996; 122(10): 2977–86.

10. Кузнецова В.С., Васильев А.В., Бухарова Т.Б. и др. Безопасность и эффективность применения морфогенетических белков кости 2 и 7 в стоматологии. Стоматология 2019; 98(1): 64–9. [Kuznetsova V.S., Vasilyev A.V., Buharova T.B. et al. Safety and efficacy of BMP-2 and BMP-7 use in dentistry. Stomatology 2019; 98(1): 64–9].

11. Govender S., Csimma C., Genant H.K. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. J. Bone Joint Surg. Am. 2002; 84: 2123–34.

12. Cicciù M., Herford A.S., Cicciù D. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promote and stabilize hard and soft tissue healing for large mandibular new bone reconstruction defects. J. Craniofac. Surg. 2014; 25(3): 860–2

13. Boyne P.J., Lilly L.C., Marx R.E. et al. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic Protein-2 (rhbmp-2) in maxillary sinus floor augmentation. J. Oral Maxillofac. Surg. 2005; 63(12): 1693–707.

14. Axelrad T.W., Steen B., Lowenberg D.W. et al. Heterotopic ossification after the use of commercially available recombinant human bone morphogenetic proteins in four patients. J. of Bone Joint Surg. Br. 2008; 90(12): 1617–22.

15. Carragee E.J., Hurwitz E.L., Weiner B.K. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. Spine J. 2011; 11(6): 471–91.

16. Meisel H.J., Schnöring M., Hohaus C. et al. Posterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2. Eur. Spine J. 2008; 17(12): 1735–44.

17. McClellan J.W., Mulconrey D.S., Forbes R.J. et al. Vertebral bone resorption after transforaminal lumbar interbody fusion with bone morphogenetic protein (rhBMP-2). J. Spinal Disord. Tech. 2006; 19(7): 483–6.

18. Cooper G.S., Kou T.D. Risk of cancer after lumbar fusion surgery with recombinant human bone morphogenic protein-2 (rh-BMP-2). Spine J. 2013; 38: 1862–8.

19. Kelly M.P., Savage J.W., Bentzen S.M. et al. Cancer Risk from Bone Morphogenetic Protein Exposure in Spinal Arthrodesis. J. Joint Surg. Am. 2014; 96(17): 1417–22.

20. Carragee E.J., Chu G., Rohatgi R. et al. Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis. J. Bone Joint Surg. Am. 2013; 95: 1537–45.

21. Skovrlj B., Koehler S.M., Anderson P.A. et al. Association between bmp-2 and carcinogenicity. Spine J. 2015; 40(23): 1862–71.

22. Woo E.J. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: adverse events reported to the manufacturer and user facility device experience database. Spine J. 2012; 12: 894–9.

23. Kofron M.D., Laurencin C.T. Bone Tissue Engineering by Gene Delivery. Adv. Drug Deliv. Rev. 2006; 58: 555–76.

24. Park S.Y., Kim K.H., Kim S. et al. BMP-2 Gene Delivery-Based Bone Regeneration in Dentistry. Pharmaceutics 2019; 11(8): 393.

25. Kolk A., Boskov M., Haidari S. et al. Comparative analysis of bone regeneration behavior using recombinant human BMP-2 versus plasmid DNA of BMP-2. J. Biomed. Mater. Res. A 2019; 107(1): 163–73.

26. Abbas A.O., Donovan M.D., Salem A.K. Formulating poly(lactide-co-glycolide) particles for plasmid DNA delivery. J. Pharm. Sci. 2008; 97(7): 2448–61.

27. Raftery R.M., Walsh D.P., Castaño I.M. et al. Delivering nucleic-acid based nanomedicines on biomaterial scaffolds for orthopedic tissue repair: challenges, progress and future perspectives. Adv. Mater. 2016; 28(27): 5447–69.

28. Jin W., Lin D., Nguyen A.H. et al. Transfection of difficult-to-transfect rat primary cortical neurons with magnetic nanoparticles. J. Biomed. Nanotechnol. 2018; 14(9): 1654–64.

29. Figueroa E., Bugga P., Asthana V. et al. A mechanistic investigation exploring the differential transfection efficiencies between the easy-to-transfect SK-BR3 and difficult-to-transfect CT26 cell lines. J. Nanobiotechnology 2017; 15(1): 36.

30. Смирнихина С.А. Экспрессия генов, трансфицированных в мезенхимные стволовые клетки человека. Гены и клетки 2010; 5(4): 16–23. [Smirnikhina S.A. Expression of genes transfected in human mesenchymal stem cells. Genes and Cells 2010; 5(4): 16–23].

31. de Carvalho T.G., Pellenz F.M., Laureano A. et al. A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells. Biotechnol. Lett. 2018; 40(3): 617–22.

32. Wu G.P., He X.C., Hu C.B. et al. Effect of electroporation-mediated transfecting recombinant plasmid pIRES-hBMP-2-hVEGF165 on mandibular distraction osteogenesis. Ann. Plast. Surg. 2012; 69: 316–25.

33. Aslan H., Zilberman Y., Arbeli V. et al. Nucleofection-based ex vivo nonviral gene delivery to human stem cells as a platform for tissue regeneration. Tissue Eng. 2006; 12: 877–89.

34. Kawai M., Kataoka Y.H., Sonobe J. et al. Non-surgical model for alveolar bone regeneration by bone morphogenetic protein-2/7 Gene Therapy. J. Periodontol. 2018; 89: 85–92.

35. Feichtinger G.A., Hofmann A.T., Slezak P. et al. Sonoporation increases therapeutic efficacy of inducible and constitutive BMP2/7 in vivo gene delivery. Hum. Gene Ther. Methods 2014; 25(1): 57–71.

36. Hamm A., Krott N., Breibach I. et al. Effcient transfection method for primary cells. Tissue Eng. 2002; 8: 235–45.

37. Зарницын В.Г., Праузниц М.Р., Чизмаджев Ю.А. Физические методы переноса нуклеиновых кислот в ткани и клетки. Биологические Мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии 2004; 21(5): 355–73. [Zarnitsyn V.G., Prausnitz M.R., Chizmadzhev Yu.A. Physical methods of nucleic acid delivery into cells and tissues. Biochem. (Mosc.) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2004; 21(5): 355–73].

38. Qadir A., Gao Y., Suryaji P. et al. Non-viral delivery system and targeted bone disease therapy. Int. J. Mol. Sci. 2019; 20(3): 565.

39. Curtin C.M., Cunniffe G.M., Lyons F.G. et al. Innovative collagen nano-hydroxyapatite scaffolds offer a highly efficient non-viral gene delivery platform for stem cell-mediated bone formation. Adv. Mater. 2012; 24(6): 749–54.

40. Yang X., Walboomers X.F., Van den Dolder J. et al. Non-viral bone morphogenetic protein 2 transfection of rat dental pulp stem cells using calcium phosphate nanoparticles as carriers. Tissue Eng. Part A 2008; 14(1): 71–81.

41. Conner S.D., Schmid S.L. Regulated portals of entry into the cell. Nature 2003; 422: 37–44.

42. Михеев А.А., Шмендель Е.В., Жестовская Е.С. и др. Катионные липосомы как средства доставки нуклеиновых кислот. Тонкие химические технологии 2020; 15(1): 7–27. [Mikheev A.A., Shmendel E.V., Zhestovskaya E.S. et al. Cationic liposomes as delivery systems for nucleic acids. Fine Chemical Technologies 2020; 15(1): 7–27].

43. Slivac I., Guay D., Mangion M. et al. Non-viral nucleic acid delivery methods. Expert Opin. Biol. Th. 2016; 17(1): 105–18.

44. Paidikondala M., Kadekar S., Varghese O. Innovative strategy for 3D transfection of primary human stem cells with BMP-2 expressing plasmid DNA: A clinically translatable strategy for ex vivo gene therapy. Int. J. Mol. Sci. 2018; 20(1): 56.

45. Wegman F., Bijenhof A., Schuijff L. et al. Osteogenic differentiation as a result of BMP-2 plasmid DNA based gene therapy in vitro and in vivo. Eur. Cells Mater. 2011; 21: 230–42.

46. Joenoes H., Yuniastuti M., Bachtiar E.W. et al. Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1/BMP-2 and its involvement in differentiation of human dental pulp-derived cells into an odontoblastic lineage. MJHR 2009; 13(1): 5–8.

47. Tang Y., Tang W., Lin Y. et al. Combination of bone tissue engineering and BMP-2 gene transfection promotes bone healing in osteoporotic rats. Cell Biol. Int. 2008; 32: 1150–7.

48. Park J., Ries J., Gelse K. et al. Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes. Gene Ther. 2003; 10: 1089–98.

49. Yang S., May S. Release of cationic polymer-DNA complexes from the endosome: A theoretical investigation of the proton sponge hypothesis. J. Chem. Phys. 2008; 129(18): 185105.

50. Osada K. Development of functional polyplex micelles for systemic gene therapy. Polym. J. 2014; 46(8): 469–75.

51. Scheller E.L., Krebsbach P.H. Gene therapy: design and prospects for craniofacial regeneration. J. Dent. Res. 2009; 88(7): 585–96.

52. Dang J., Leong K. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. Adv. Drug Deliv. Rev. 2006; 58(4): 487–99.

53. Kichler A., Leborgne C., Coeytaux E. et al. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. J. Gene Med. 2001; 3: 135–44.

54. Wang Y., You C., Wei R. et al. Modification of human umbilical cord blood stem cells using polyethylenimine combined with modified TAT peptide to enhance BMP-2 production. Biomed Res. Int. 2017: 1–9.

55. Lee J.E., Yin Y., Lim S.Y. et al. Enhanced transfection of human mesenchymal stem cells using a hyaluronic acid/calcium phosphate hybrid gene delivery system. Polymers 2019; 11(5): 798.

56. D'Mello S., Atluri K., Geary S.M. et al. Bone regeneration using gene-activated matrices. AAPS J. 2016; 19(1): 43–53.

57. Pandey A.P., Sawant K.K. Polyethylenimine: A versatile, multifunctional non-viral vector for nucleic acid delivery. Mater. Sci. Eng. C 2016; 68: 904–18.

58. Lee Y.H., Wu H.C., Yeh C.W. et al. Enzyme-crosslinked gene-activated matrix for the induction of mesenchymal stem cells in osteochondral tissue regeneration. Acta Biomater. 2017; 63: 210–26.

59. Atluri K., Seabold D., Hong L. et al. Nanoplex-mediated codelivery of fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein genes promotes osteogenesis in human adipocyte-derived mesenchymal stem cells. Mol. Pharm. 2015; 12(8): 3032–42.

60. Qiao C., Zhang K., Jin H. et al. Using poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres to encapsulate plasmid of bone morphogenetic protein 2/polyethylenimine nanoparticles to promote bone formation in vitro and in vivo. Int. J. Nanomed. 2013; 8: 2985–95.

61. Yue J., Wu J., Liu D. et al. BMP2 gene delivery to bone mesenchymal stem cell by chitosan-g-PEI nonviral vector. Nanoscale Res. Lett. 2015; 10(1): 203.

62. Xu X., Qiu S., Zhang Y. et al. PELA microspheres with encapsulated arginine–chitosan/pBMP-2 nanoparticles induce pBMP-2 controlled-release, transfected osteoblastic progenitor cells, and promoted osteogenic differentiation. Artif. Cells Nanomed. B 2016; 45(2): 330–9.

63. Raftery R.M., Mencía-Castaño I., Sperger S. et al. Delivery of the improved BMP-2-Advanced plasmid DNA within a gene-activated scaffold accelerates mesenchymal stem cell osteogenesis and critical size defect repair. J. Control. Release 2018; 283: 20–31.

64. Keeney M., Chung M.T., Zielins E.R. et al. Scaffold-mediated BMP-2 minicircle DNA delivery accelerated bone repair in a mouse critical-size calvarial defect model. J. Biomed. Mater. Res. A 2016; 104: 2099–107.

65. Chen W., Li W., Xu K. et al. Functionalizing titanium surface with PAMAM dendrimer and human BMP2 gene via layer-by-layer assembly for enhanced osteogenesis. J. Biomed. Mater. Res. A 2017; 106(3): 706–17.

66. Santos J.L., Oramas E., Pêgo A.P. et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells using PAMAM dendrimers as gene delivery vectors. J. Control. Release 2009; 134(2): 141–8.

67. Nedorubova I.A., Bukharova T.B., Zagoskin Y.D. et al. Development of osteoplastic material impregnated with plasmid encoding bone morphogenetic protein-2. Biotekhnologiya 2020; 36(4): 59–64.

68. Loozen L.D., Kruyt M.C., Kragten A.H.M. et al. BMP-2 gene delivery in cell-loaded and cell-free constructs for bone regeneration. PLoS One 2019; 14(7): e0220028.

69. Qin J.Y., Zhang L., Clift K.L. et al. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. PLoS One 2010; 5(5): e10611.

70. Hacobian A.R.A., Posa-Markaryan K., Sperger S. et al. Improved osteogenic vector for non-viral gene therapy. Eur. Cells Mater. 2016; 31: 191–204.

71. Kuttappan S., Anitha A., Minsha M.G. et al. BMP2 expressing genetically engineered mesenchymal stem cells on composite fibrous scaffolds for enhanced bone regeneration in segmental defects. Mater. Sci. Eng. 2018; 85: 239–48.

72. Zhang W., Tsurushima H., Oyane A. et al. BMP-2 gene-fibronectin-apatite composite layer enhances bone formation. J. Biomed. Sci. 2011; 18(1): 62.

73. Endo M., Kuroda S., Kondo H. et al. bone regeneration by modified gene-activated matrix: effectiveness in segmental tibial defects in rats. Tissue Eng. 2006; 12(3): 489–97.

74. Li H., Ji Q., Chen X. et al. Accelerated bony defect healing based on chitosan thermosensitive hydrogel scaffolds embedded with chitosan nanoparticles for the delivery of BMP2 plasmid DNA. J. Biomed. Mater. Res. A 2016; 105(1): 265–73.

75. Kolk A., Tischer T., Koch C. et al. A novel nonviral gene delivery tool of BMP-2 for the reconstitution of critical-size bone defects in rats. J. Biomed. Mater. Res. A 2016; 104: 2441–55.

76. Kaipel M., Schützenberger S., Hofmann A.T. et al. Evaluation of fibrin-based gene-activated matrices for BMP2/7 plasmid codelivery in a rat nonunion model. Int. Orthop. 2014; 38(12): 2607–13.

77. Park J., Lutz R., Felszeghy E. et al. The effect on bone regeneration of a liposomal vector to deliver BMP-2 gene to bone grafts in peri-implant bone defects. Biomaterials 2007; 28(17): 2772–82.

78. Khorsand B., Nicholson N., Do A.V. et al. Regeneration of bone using nanoplex delivery of FGF-2 and BMP-2 genes in diaphyseal long bone radial defects in a diabetic rabbit model. J. Control. Release 2017; 248: 53–9.

79. Logovskaya L.V., Bukharova T.B., Volkov A.V. et al. Induction of osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells from human adipose tissue. Bull. Exp. Biol. Med. 2013; 155(1): 145–50.

80. Perez J.R., Kouroupis D., Li D.J. et al. Tissue engineering and cell-based therapies for fractures and bone defects. Front. Bioeng. Biotechnol. 2018; 6: 105.

81. Krebs M.D., Salter E., Chen E. et al. Calcium phosphate-DNA nanoparticle gene delivery from alginate hydrogels inducesin vivoosteogenesis. J. Biomed. Mater. Res. A 2010; 92(3): 1131–8.

82. Lü K., Zeng D., Zhang Y. et al. BMP-2 gene modified canine bMSCs promote ectopic bone formation mediated by a nonviral PEI derivative. Ann. Biomed. Eng. 2011; 39(6): 1829–39.

83. Rose L.C., Kucharski C., Uludağ H. Protein expression following non-viral delivery of plasmid DNA coding for basic FGF and BMP-2 in a rat ectopic model. Biomaterials 2012; 33(11): 3363–74.

84. Vural A.C., Odabas S., Korkusuz P. et al. Cranial bone regeneration via BMP-2 encoding mesenchymal stem cells. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 2016; 45(3): 544–50.

85. Gonzalez-Fernandez T., Rathan S., Hobbs C. et al. Pore-forming bioinks to enable spatio-temporally defined gene delivery in bioprinted tissues. J. Control. Release 2019; 301: 13–27.

86. Steinert A.F., Noth U., Tuan R.S. Concepts in gene therapy for cartilage repair. Injury 2008; 39 Suppl 1: 97–113.

87. Бозо И.Я., Рожков С.И., Комлев В.С. и др. Сравнительная оценка биологической активности ген-активированных остеопластических материалов из октакальциевого фосфата и плазмидных ДНК, несущих гены VEGF и SDF: часть 2 — in vivo. Гены и клетки 2017; 12(4): 39–46. [Bozo I.Y., Rozhkov S.I., Komlev V.S. et al. Biological activity comparative evaluation of the gene-activated bone substitutes made of octacalcium phosphate and plasmid DNA carrying VEGF and SDF genes: part 2 — in vivo. Genes and Cells 2017; 12(4): 39–46].