DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-4-234-242

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 18.05.2020
Принята к печати 27.07.2020

Эритроцит как идеальный носитель для внутрисосудистой доставки лекарств

Л.Д. Колева[1, 2], Ф.И. Атауллаханов[1–3], Е.И. Синауридзе[1, 2]

[1]*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва*
[2]*ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва*
[3]*ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва*

Контактная информация:
Колева Лариса Дмитриевна, младший научный сотрудник лаборатории биофизики ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: larulea@mail.ru

Доставка лекарств с использованием природных биологических носителей, в частности эритроцитов, является быстро развивающейся областью изучения. Эритроциты могут действовать как носители с постепенным высвобождением фармакологического агента, в качестве биореакторов с инкапсулированными ферментами или в качестве инструмента для направленной доставки лекарств в органы-мишени, прежде всего в тканевые макрофаги, печень и селезенку. На сегодняшний день эритроциты изучены в качестве носителей для широкого спектра лекарственных соединений, таких как ферменты, антибиотики, противовоспалительные, противовирусные препараты и т. д. Обзор посвящен преимуществам эритроцитов как носителей для доставки лекарств, загруженных в них, или связанных с их поверхностью, и определяет основные направления исследований эритроцитов-носителей биологически активных веществ. Особое внимание уделяется исследованиям *in vivo*, раскрывающим потенциал эритроцитов-носителей для клинического применения.

Ключевые слова: *доставка лекарств, эритроцит-носитель, направленная доставка лекарств, эритроцит-биореактор, противоопухолевая терапия, фермент-заместительная терапия*

Колева Л.Д. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020; 19 (4): 234–242.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-4-234-242

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 18.05.2020
Accepted 27.07.2020

Erythrocyte as an ideal carrier for intavascular drug delivery

L.D. Koleva[1, 2], F.I. Ataullakhanov[1–3], E.I. Sinauridze[1, 2]

[1]*Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow*
[2]*Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow*
[3]*Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Correspondence:
Larisa D. Koleva, junior researcher of the Laboratory of Biophysics, Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: larulea@mail.ru

Drug delivery using natural biological carriers, especially erythrocytes, is a rapidly developing field. Erythrocytes can act as carriers with the gradual release of a pharmacological agent, as bioreactors with encapsulated enzymes, or as a tool for targeted delivery of drugs to target organs especially tissue macrophages, liver and spleen. To date, red blood cells have been studied as carriers for a wide range of drug compounds, such as enzymes, antibiotics, anti-inflammatory, antiviral drugs, etc. The review is devoted to the advantages of erythrocytes as carriers for the delivery of drugs loaded into the erythrocyte, or related to its surface, and defines the main directions of research on erythrocytes carriers of biologically active substances. Particular attention is paid to *in vivo* studies that reveal the potential of carrier erythrocytes for clinical use.

Key words: *antitumor therapy, carrier erythrocyte, drug delivery, enzyme replacement therapy, erythrocyte-bioreactor, targeted drug delivery*

Koleva L.D., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2020; 19 (4): 234–242.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-4-234-242

Эритроциты составляют самую большую популяцию клеток крови у млекопитающих. Их главной функцией является перенос кислорода в клетки и ткани организма [1]. У зрелых эритроцитов отсутствует клеточное ядро и большинство органелл, однако внутри содержится гемоглобин, способный связывать кислород. Двояковогнутая форма обеспечивает хорошую гибкость и способность эритроцита к деформации для прохождения по узким капиллярам. Время жизни эритроцитов в кровотоке составляет 100–120 дней, затем они утилизируются селезенкой. Указанные свойства делают эритроциты привлекательной доступной биосовместимой системой для внутрисосудистой доставки лекарственных средств (ЛС). Такое уникальное свойство эритроцитов, как способность обратимо образовывать поры в мембране под действием различных внешних факторов, позволяет нагружать эти клетки биологически активными веществами разной молекулярной массы, используя различные методы.

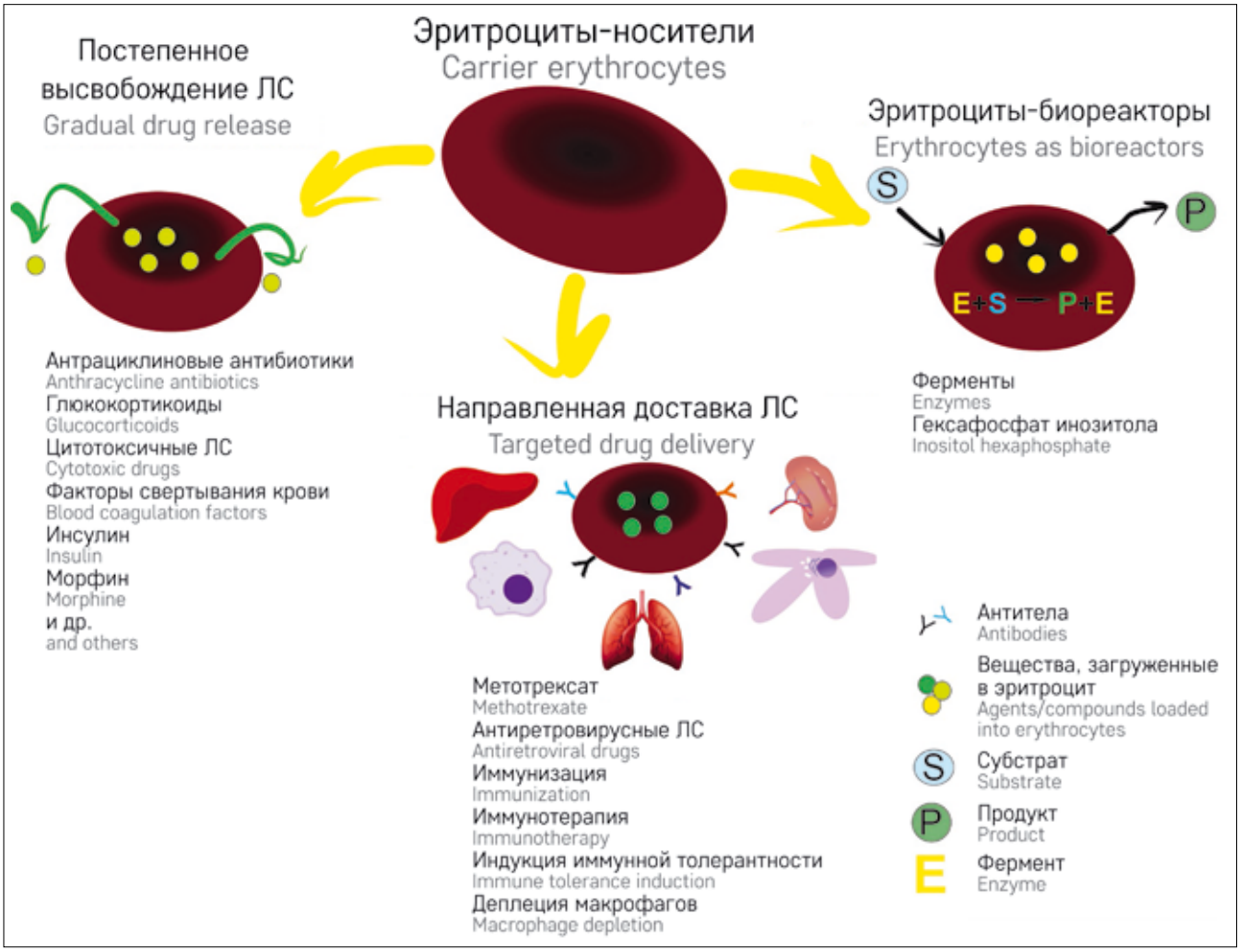
История эритроцитов-носителей начинается с 1973 г. С тех пор количество выпускаемых статей на тему эритроцитов-носителей увеличивается с каждым годом, и в настоящее время общее их количество превышает 400. В другом нашем обзоре [2] представлен наиболее полный список всех биологических веществ, которые были включены в эритроциты, начиная с 1973 г. Интерес к использованию этих клеток для доставки лекарств объясняется наличием у них ряда преимуществ по сравнению с существующим арсеналом способов и систем доставки ЛС, в связи с чем эритроцит является идеальным кандидатом для

такой доставки. Эти клетки удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к системам доставки, среди которых биосовместимость (для терапии пациентов можно использовать как аутологичные, так и донорские эритроциты); биодеградируемость (старые или поврежденные эритроциты утилизируются естественным образом в селезенке); длительное время циркуляции в кровотоке (время жизни лекарства в кровотоке определяется временем жизни загруженных лекарством клеток); фармакокинетика и фармакодинамика препарата в эритроцитах позволяют сильно увеличить желаемый терапевтический эффект; снижение побочных эффектов препаратов (в кровотоке отсутствуют высокие пиковые концентрации свободного препарата); легкость получения и выделения клеток в большом количестве, возможность масштабирования производства.

Терапевтический препарат может быть включен внутрь эритроцита или связан с его поверхностью. В зависимости от вида препарата эритроцит может быть использован как носитель с постепенным высвобождением ЛС, как биореактор или как система направленной доставки препарата, в первую очередь к тканевым макрофагам, печени и селезенке (*рисунок*) [3]. В первом случае в эритроцит загружается препарат, способный медленно диффундировать сквозь клеточную мембрану в кровоток, либо недиффундирующее пролекарство, которое в эритроците превращается в диффундирующие через мембрану активные компоненты, обладающие терапевтическим эффектом. Механизм работы эритроцитов-биореакторов основан на инкапсуляции в эритроцит ферментов, способных элиминировать токсические вещества и метаболиты, циркулирующие в кровотоке, при условии, что эти метаболиты-субстраты проникают внутрь эритроцита, загруженного ферментом, где происходит их расщепление на безопасные продукты. Для направленной доставки препарата с помощью эритроцитов-носителей проводят либо специальную обработку эритроцитов, вызывающую серьезные изменения их мембран (например, глутаровым альдегидом), либо связывание на их поверхности определенных антител к антигенам, присутствующим на поверхности различных видов опухолевых клеток. В результате такие эритроциты либо быстро распознаются и захватываются макрофагами печени и селезенки, либо избирательно связы-

Рисунок
Применение эритроцитов-носителей в терапии

Figure
Therapeutic applications of carrier erythrocytes



ваются с теми клетками организма, которые несут соответствующие антигены. В этом обзоре мы сосредоточили свое внимание на исследованиях, демонстрирующих преимущества эритроцитов как носителей лекарств.

Снижение иммуногенности лекарственного средства и увеличение его времени жизни в кровотоке

Многие заболевания человека связаны с отсутствием или сниженной активностью необходимых ферментов. Одним из методов решения этой проблемы является фермент-заместительная терапия (ФЗТ), основанная на введении недостающего фермента в организм. Ферменты используют также для лечения определенных видов опухолей для истощения в кровотоке аминокислот, которые не могут продуцироваться опухолевыми клетками. В результате такого истощения опухолевые клетки гибнут [4]. Селективность этих методов относительно опухолевых клеток определяется тем, что нормальные клетки организма способны самостоятельно синтезировать истощаемую аминокислоту. Однако лекарственный препарат фермента – это белок, чужеродный для организма, поэтому введение свободного фермента в кровоток, как правило, сопровождается ответной иммунной реакцией организма, включая острые аллергические реакции, образование антител и быстрое выведение препарата из кровотока, что сильно затрудняет или заставляет прекратить терапию [5, 6]. Например, методом лечения болезни Помпе является пожизненная ФЗТ с внутривенным введением рекомбинантного аналога алглюкозидазы-α (аналог кислой α-глюкозидазы человека), которая в конечном итоге вызывает устойчивый гуморальный ответ и заставляет прекратить лечение [6]. Чтобы снизить иммунный ответ на вводимый фермент, зачастую применяют ферменты, связанные с различными полимерными носителями, в первую очередь с полиэтиленгликолем (ПЭГ). Это частично снижает иммуногенность препарата, так как связывание молекулы белка с полимером блокирует ряд потенциальных иммуногенных эпитопов нативной молекулы фермента, а также экранирует его от присутствующих в плазме антител. Все это продлевает время жизни препарата, однако сильно повышает стоимость лечения. Кроме того, остается проблема иммуногенности и токсичности самого ПЭГ [7, 8].

Альтернативным решением в этой ситуации может оказаться инкапсуляция фермента в эритроцит, который изолирует и сохраняет препарат. В данном случае эритроцит работает как биореактор с ферментом, расщепляющим субстрат, проникающий внутрь эритроцита. В результате ферментный лекарственный препарат не попадает непосредственно в кровоток, что решает проблему его иммуногенности и преждевременной инактивации и увеличивает его период полувыведения.

Применение эритроцитов-носителей в фермент-заместительной терапии

Различными группами авторов было показано, что нагруженные ферментом эритроциты могут быть альтернативой свободной или ПЭГ-форме фермента в ФЗТ [9–12]. B.E. Bax и соавт. была продемонстрирована возможность инкапсуляции как нативного, так и ПЭГ-фермента аденозиндезаминазы (АДА) в эритроциты человека [9, 13]. Дефицит АДА приводит к тяжелому комбинированному иммунодефициту, в настоящее время для его эффективного лечения применяют трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток или генную терапию путем инфузии клеток костного мозга $CD34^+$, трансдуцированных вектором, содержащим АДА. В качестве поддерживающей терапии до трансплантации зарекомендовала себя ФЗТ ПЭГ-АДА (PEG-ADA, Adagen®) [8]. Однако период полувыведения PEG-ADA из кровотока составляет от 3 до 6 дней, что требует частого введения препарата и увеличения дозы в случае образования нейтрализующих антител, это сильно увеличивает стоимость и без того очень дорогой поддерживающей терапии. В то же время было показано, что при введении пациенту с дефицитом АДА включенных в эритроциты нативной АДА или PEG-ADA периоды полувыведения препаратов составляли 12,5 и 16 дней соответственно, что значительно выше, чем для свободной формы PEG-ADA [9]. Эффективность включения в эритроциты была значительно выше для нативного фермента (50% против 9%). Было показано, что у взрослого пациента долгосрочная терапия АДА в эритроцитах может быть клинически и метаболически эффективной [14]. После 9 лет терапии АДА в эритроцитах наблюдалось значительное улучшение метаболических показателей, уменьшение частоты респираторных инфекций, восстановление уровня сывороточного иммуноглобулина. При этом не наблюдалось образования антител к АДА. Активность АДА в эритроцитах достигала 40–100 нмоль/ч на 1 мг гемоглобина, что соответствует норме.

Не менее привлекательным кажется применение эритроцитов-биореакторов, нагруженных ферментом тимидинфосфорилазой (ТР) для лечения митохондриальной нейрогастроинтестинальной энцефаломиопатии (МНГИЭ) – аутосомно-рецессивного заболевания, вызванного дефицитом активности ТР [15]. Сниженная активность ТР приводит к накоплению тимидина и дезоксиуридина, что вызывает нарушение функции митохондрий. В качестве поддерживающей терапии применяется инфузия тромбоцитов от здоровых доноров, частично восстанавливающая активность ТР или гемодиализ. Эффективным лечением МНГИЭ является аллогенная трансплантация

гемопоэтических стволовых клеток [16], однако для нее тоже имеются ограничения. В настоящее время проводится II фаза клинических испытаний эритроцитов-биореакторов, нагруженных ТР (EE-TP), в ходе которой планируется оценить безопасность, переносимость и эффективность повторных доз EE-TP (trials.gov: NCT03866954). Ранее биохимическая и клиническая терапевтическая эффективность EE-TP была показана у 3 пациентов с МНГИЭ [10]. У всех 3 больных наблюдалось снижение в плазме концентраций, связанных с болезнью метаболитов, – тимидина и дезоксиуридина, а также увеличение веса и улучшение показателей, изменяющихся при заболевании. Метод терапии МНГИЭ с применением EE-TP запатентован B.E. Bax и M. Bain (Патент US2014/0219980A1).

Таким образом, ФЗТ с помощью эритроцитов-носителей следует рассматривать как поддерживающую терапию для пациентов до получения возможности проведения подходящей аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток или в качестве альтернативного лечения для пациентов с необратимой болезнью на конечной стадии и без оптимально подобранного донора, а также в качестве альтернативы существующим дорогостоящим методам ФЗТ.

Ферменты, используемые в противоопухолевой терапии

Было показано, что ферменты L-аспарагиназа, L-метионināза и аргининдеиминаза (ADI) эффективны в отношении некоторых типов опухолевых клеток, чувствительных к истощению аспарагина, метионина и аргинина соответственно [4].

Положительные результаты клинических исследований L-аспарагиназы в эритроцитах (GRASPA) были получены в терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей [11] и взрослых [12]. Период полувыведения препарата, инкапсулированного в эритроциты, составил 40 дней (для сравнения: он равен 1,24 дня для нативной L-аспарагиназы из *E. Coli* [5] и 5–6 дней для ПЭГ-аспарагиназы [7]). Кроме того, в III фазе клинических испытаний для пациентов с рецидивом ОЛЛ было показано значительное уменьшение частоты (0% против 46%) и степени тяжести аллергических реакций, вызванных GRASPA, по сравнению с нативным препаратом L-аспарагиназы из *E. coli*, вводимым внутривенно [17]. В данный момент компания Erytech проводит в США III фазу клинических испытаний эритроцитов-носителей аспарагиназы (Eryaspase) при метастатическом раке поджелудочной железы (исследование TRYbeCA1) и II фазу для лечения трижды негативного рака молочной железы (TRYbeCA-2). Ранее сообщалось об успешном проведении I и II фаз клинических испытаний Eryaspase в сочетании с химиотерапией для лечения метастатического рака поджелудочной железы [18, 19]. Исследование II фазы насчитывало 140 пациентов. Было продемонстрировано, что препарат вызывает значительное повышение общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования. Химиотерапия в комбинации с Eryaspase снижала риск смертности на 40% по сравнению с применением только химиотерапии. Это первый случай в клинической практике, когда терапия с применением L-аспарагиназы оказалась эффективной в лечении солидной опухоли.

Применение метионināзы, инкапсулированной в эритроцитах (Erymethionase), было продемонстрировано *in vivo* на мышах с глиобластомой [20] и с карциномой молочной железы [21]. В обоих случаях наблюдались значительное уменьшение объема опухоли, длительное истощение метионина и хорошая переносимость метионināзы, загруженной в эритроциты. Кроме того, K. Sénécha и соавт. впервые продемонстрировали возможность и эффективность комбинации терапии Erymethionase и иммунотерапии раковых клеток путем блокирования точек иммунного контроля PD-1 (анти-PD-1) [21]. Ранее было известно, что эффективность иммунотерапии анти-PD-1 ограничивается высоким содержанием аденозина в микроокружении опухоли. Авторы предположили, что метионināза помимо истощения метионина косвенно снизит количество аденозина в микроокружении опухоли и продемонстрировали на мышах преимущество такой комбинации. Отмечены значительное ингибирование роста опухоли и увеличенное время выживания для терапии Erymethionase в тандеме с иммунотерапией по сравнению с каждой из них в отдельности.

В 2015 г. Erytech Pharma запатентовала использование эритроцитов, содержащих ADI (ERY-ADI) для лечения, в частности, гепатокарциномы и злокачественной меланомы (Патент US9,125,876B2). На мышах было показано, что время истощения аргинина (5 дней) при лечении ERY-ADI было увеличено по сравнению с тем же временем для свободной формы ADI (24 ч) [22].

Таким образом, основными преимуществами использования эритроцитов как носителей ферментных лекарственных препаратов являются снижение их иммуногенности, токсических эффектов и увеличение срока жизни препарата в кровотоке. Это не только снижает нежелательные иммунологические реакции, но и позволяет сократить частоту введения препарата в ходе терапии при сохранении его эффективности и улучшении условий жизни пациентов.

Пролонгированное действие и снижение побочных эффектов препарата

В ряде случаев эритроцит, загруженный лекарственным препаратом, может действовать как система с постепенным его высвобождением в кровоток. Преимущество такого подхода заключается в длительном поддержании постоянной терапевтической концен-

трации ЛС в кровотоке и снижении его пиковой концентрации сразу после введения препарата для минимизации побочных эффектов. Как правило, такой принцип действия эритроцитов-носителей осуществляется в случае включения в них низкомолекулярных веществ, а также при связывании препарата с поверхностью эритроцита. К настоящему времени в эритроциты было включено множество низкомолекулярных препаратов, таких как метотрексат [23], глюкокортикоиды [24–26], антрациклиновые антибиотики [27, 28] и др. Последние 2 класса препаратов были применены в клинической практике. Известно, что оба эти класса препаратов обладают дозозависимыми кумулятивными побочными эффектами [29, 30]. Для антрациклиновых антибиотиков особенно выражена кардиотоксичность, а частые и высокие дозы глюкокортикоидов вызывают гормональную зависимость и серьезные побочные эффекты, такие как иммунологическое подавление и диабет. Поскольку глюкокортикоиды быстро выводятся из организма (3–4 ч), для поддержания терапевтической дозы требуется введение препарата несколько раз в день [30]. Хорошим решением проблемы в данной ситуации является создание носителя с постепенным высвобождением лекарственного препарата в кровоток. К настоящему времени компания EryDel провела многочисленные клинические испытания дексаметазон-21-фосфата (Dex-21-P) в аутологичных эритроцитах (Ery-Dex), доказавшие преимущества использования дексаметазона в эритроцитах перед свободной формой препарата у пациентов с муковисцидозом [24], язвенным колитом [25] и болезнью Крона [26]. Во всех случаях наблюдались отсутствие побочных эффектов, клиническая ремиссия и отсутствие зависимости от стероидных препаратов. Была показана медленная продолжительная доставка дексаметазона в кровоток в течение 28 дней [24]. На данный момент компания EryDel проводит III фазу клинических испытаний Ery-Dex (trials.gov NCT02770807) для пациентов с редким наследственным заболеванием – атаксией-телеангиэктазией, для которого в настоящее время не существует эффективного лечения.

Группа российских авторов (Ф.И. Атауллаханов, О.А. Скороход и др.) продемонстрировала преимущество введения даунорубицина и доксорубицина в эритроциты по сравнению с введением свободной формы этих препаратов у пациентов с лейкозами и лимфомами [27, 28, 31]. Препараты в эритроцитах лучше переносились пациентами. При этом наблюдались уменьшенное количество побочных реакций, отсутствие кумулятивного эффекта и значительное снижение кардиотоксичности, а также уменьшение пиковой концентрации препаратов в плазме минимум в 2 раза и увеличение периода их полувыведения. Так, для свободной формы доксорубицина наблюдалось быстрое снижение концентрации препарата в течение 10–30 мин после введения, а через 12–24 ч она падала до нуля, тогда как для доксорубицина в эритроцитах в быстрой фазе наблюдалась аналогичная картина, но после снижения концентрации в плазме до 0,1 мкг/мл уровень препарата поддерживался практически постоянным до 3 дней [31].

Многообещающие результаты были получены V.R. Muzykantov и соавт., применившими эритроциты-носители тканевого активатора плазминогена (tPA) для тромбопрофилактики в случаях высокого риска возникновения тромбозов. Успешное профилактическое применение tPA, связанного с поверхностью эритроцитов, было показано на животных. В настоящее время tPA применяется в лечении заболеваний, сопровождающихся тромбообразованием (инфаркт миокарда, тромбоэмболия легочной артерии и ишемический инсульт), однако он очень быстро выводится из кровотока (5–10 мин), способен диффундировать в ткани и вызывать нейротоксичность, не способен различать новообразующиеся патологические тромбы и зрелые гемостатические аналоги. В связи с этим профилактическое применение tPA сопряжено с большими рисками. На животных моделях венозного и артериального тромбоза было продемонстрировано, что связывание tPA с поверхностью эритроцитов (RBC/tPA) продлевает время циркуляции tPA в кровотоке в 10 раз, не нарушая выживаемость эритроцитов и гемостаз. Препарат преимущественно усиливает лизис зарождающихся тромбов, а большой размер комплекса RBC/tPA исключает его диффузию в ткани и зрелые гемостатические тромбы и таким образом обеспечивает эффективную тромбопрофилактику [32]. В то время как введение свободного tPA усугубляло воспаление, усиливало кровотечение, нейротоксичность и летальность, комплекс RBC/tPA активировал противовоспалительный путь, ослаблял повреждение головного мозга и вторичный тромбоз [33, 34]. Связывание tPA с поверхностью эритроцитов осуществляли с помощью биотинилирования эритроцитов и белков и последующей их конъюгации через стрептавидин [35, 36]. Эти исследования показывают потенциальные преимущества связывания тромболитических препаратов с эритроцитами для обеспечения эффективной и безопасной тромбопрофилактики, пока недостигаемой существующими препаратами.

Таким образом, использование эритроцитов как контейнеров для низкомолекулярных ЛС, способных проникать через их мембрану или связанных с их поверхностью, позволяет создавать депо-формы препаратов, обеспечивающие постепенное их высвобождение в кровоток (или постоянную его концентрацию в случае связывания с поверхностью) в достаточной для терапии дозе, но без высоких пиковых концентраций в момент введения. Это пролонгирует действие ЛС и снижает его токсические эффекты, обусловленные

слишком высокой концентрацией свободного лекарства в кровотоке.

Возможность адресной доставки фармакологического агента

Целевая доставка лекарств с использованием эритроцитов может осуществляться в первую очередь в клетки, которые занимаются естественной утилизацией старых и поврежденных эритроцитов (т. е. в макрофаги, печень и селезенку, а также к дендритным клеткам печени (антигенпрезентирующие клетки)). Это может быть использовано для лечения опухолей этих тканей, заболеваний, связанных с макрофагами, а также для индукции иммунной толерантности, иммунотерапии рака и иммунизации, так как известно, что макрофаги способны облегчать презентацию пептидов Т-лимфоцитам [37]. Чтобы доставить эритроцит, загруженный лекарством, в эти клетки-мишени, его необходимо модифицировать, чтобы клетки-мишени воспринимали его как поврежденный. Существуют различные способы такой модификации. Все они сводятся к модификации мембраны эритроцитов. К таким способам относятся опсонизация эритроцитов антителами к естественным детерминантам клеточной мембраны, например, резус-антителами [38]; обработка эритроцитов ионофором кальция, приводящая к экстернализации фосфатидилсерина на поверхности клеток [39], и глутаровым альдегидом [40], что делает эритроцит более жестким за счет сшивания аминогрупп на поверхности мембраны. Другими методами являются обработка реагентами, которые вызывают кластеризацию белка полосы 3, например, бисульфосукцинимидилсубератом (BS^3) в среде $ZnCl_2$ [41], или биотинилирование эритроцитов с помощью NHS-биотина [42].

Существует немало исследований, посвященных адресной доставке эритроцитов в макрофаги для терапии вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [43–46], гепатита С [47], деплеции опухоль-ассоциированных макрофагов [48], злокачественных заболеваний [49], а также для индукции иммунной толерантности [6, 50], иммунизации [51, 52] и иммунотерапии рака [53, 54].

Многообещающие результаты продемонстрировала группа M. Magnani и соавт. для избирательного уничтожения ВИЧ-инфицированных макрофагов (STAT1-экспрессирующих клеток) путем инкапсуляции флударабина в эритроциты. Флударабин активен против STAT1-экспрессирующих макрофагов, но неактивен против неинфицированных макрофагов. Чтобы направить флударабин в макрофаги, его инкапсулировали в эритроциты, которые затем обрабатывали $BS^3/ZnCl_2$. В этом исследовании *in vitro* был получен мощный избирательный (> 98%) и длительный (не менее 4 нед) эффект ингибирования высвобождения вируса иммунодефицита из ВИЧ-инфицированных макрофагов [45]. Этой же группой авторов было обнаружено [46], что эритроциты, связанные с белком Tat ВИЧ-1 (RBC-Tat), который имеет важное значение для репликации вируса иммунодефицита, способны вызывать иммунный ответ против Tat ВИЧ-1 и таким образом обеспечивать гораздо более эффективную иммунизацию против ВИЧ, чем Tat в адъюванте Фрейнда. Выработка нейтрализующих Tat антител наблюдалась у всех 6 мышей при введении им RBC-Tat в отличие от 2 из 6 мышей при введении Tat в адъюванте Фрейнда.

Противоположным иммунизации направлением является стимуляция иммунной толерантности, т. е. «обучение» иммунной системы толерантности к какому-либо антигену для предотвращения его атаки. Такая стимуляция может применяться при аутоиммунных заболеваниях, пересадке аллотрансплантата или возникновении аллергии на лекарственный препарат. В работе M. Cremel и соавт. [6] было предложено использовать индукцию иммунной толерантности к ферменту α-глюкозидазе, который применяется в настоящее время в ФЗТ болезни Помпе путем введения эритроцитов, нагруженных антигеном (α-глюкозидаза) и обработанных $BS^3/ZnCl_2$ для доставки к антигенпрезентирующим клеткам в печени и селезенке. Как уже было сказано выше, терапия болезни Помпе осуществляется частым внутривенным введением рекомбинантного аналога α-глюкозидазы, который в конечном итоге вызывает устойчивый гуморальный ответ, что зачастую приводит к необходимости прекращать лечение. Работа показала, что нагруженные α-глюкозидазой и обработанные $BS^3/ZnCl_2$ эритроциты имеют толерогенные свойства, т. е. способны устранять гуморальный ответ на α-глюкозидазу и восстанавливать толерантность к заместительной терапии.

Интересной кажется стратегия использования эритроцитов, загруженных опухолево-ассоциированными антигенами, в иммунотерапии рака, предложенная A. Banz и соавт. Иммунотерапия рака – это использование иммунной системы для уничтожения опухолевых клеток, которые обладают специфическими опухоль-ассоциированными антигенами (tumor-associated antigens, TAA) [55]. В настоящее время установлено, что иммунизация против TAA индуцирует TAA-специфические цитотоксические Т-лимфоциты, которые способны контролировать рост опухоли. Была продемонстрирована эффективность такой иммунизации путем доставки TAA эритроцитами на мышиных моделях меланомы: введение небольшого количества TAA (TRP-2), загруженного в эритроциты, обработанные антителом anti-TER119 mAb совместно с полиинозин-полицитидиловой кислотой (Poly (I:C) (лиганд к толл-подобным рецепторам III, активирующим $CD4^+$-Т-клеточный ответ, специфичный для аллоантигена эритроцитов), вызывало антиген-специфический

Т-клеточный ответ и контроль роста опухоли у мышей, тогда как инъекция такого же количества свободного антигена TRP-2 не вызывала подобного ответа [53].

Ограничения использования эритроцитов в качестве носителей лекарственных препаратов

Несмотря на то, что эритроциты перспективны для использования в качестве носителей фармакологических агентов, их применение имеет ряд ограничений.

1. Производство эритроцитов-носителей связано с необходимостью стерильной работы и сложностью крупномасштабного производства таких клеток. Создание автоматических устройств для включения лекарственных веществ в эритроциты может решить эти проблемы.

2. Для предотвращения быстрой утилизации эритроцитов-носителей и неуправляемого высвобождения лекарственного препарата в кровоток к качеству полученных клеток предъявляются высокие требования. Оно сильно зависит от выбора метода включения препарата. Однако есть возможность выбора щадящих методов включения (используемые в настоящее время методы являются достаточно мягкими и не оказывают сильного влияния на эритроциты). Существует набор физико-химических методов, позволяющих контролировать качество полученных клеток.

3. Далеко не любое вещество может быть включено в эритроциты. Некоторые низкомолекулярные соединения или, наоборот, соединения, имеющие слишком большую молекулярную массу, не могут быть помещены в эритроциты. Первые легко проходят через мембрану эритроцита, что делает невозможным создание долгосрочной эритроцитарной депо-формы этих соединений. Чтобы замедлить высвобождение таких веществ из эритроцитов, клетки можно обрабатывать различными сшивающими агентами (глутаровый альдегид, BS^3 и т. д.) или включать фосфорилированную форму пролекарства в эритроциты, легко проходящую через мембрану только после дефосфорилирования фосфатазой внутри эритроцитов. В свою очередь, вещества, имеющие слишком большую молекулярную массу, не могут быть эффективно инкапсулированы в эритроциты без сильного повреждения мембраны, так как образующиеся во время инкапсуляции поры в мембране не могут превышать некий критический размер без ущерба для эритроцита.

4. В ряде случаев для эритроцитов-биореакторов возникают ограничения, связанные со скоростью транспорта необходимых субстратов (или продуктов) реакции через клеточную мембрану или с возможным воздействием загруженных в клетку ферментов на метаболизм эритроцитов, прежде всего гликолиз. Это взаимодействие может привести к истощению пулов некоторых метаболитов (например, NAD(P) и NAD(P)H), если они используются одновременно гликолизом и ферментами, встроенными в эритроциты. В этом случае стационарное состояние гликолиза может быть потеряно, что приводит к быстрой гибели клеток. Чтобы справиться с этой ситуацией, можно использовать математические модели для расчета допустимых доз загруженных ферментов, не приводящих к потере стационарного состояния в гликолизе. Кроме того, можно загрузить в эритроциты помимо целевого фермента необходимые кофакторы (при условии, что они не проникают легко через мембрану клетки).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доставка лекарств посредством естественных биологических носителей является стремительно развивающейся областью изучения. Большое количество исследований доказывает безопасность и эффективность применения эритроцитов в качестве внутрисосудистой системы доставки ЛС и демонстрирует огромный потенциал эритроцитов в этой области.

Несмотря на такие положительные свойства и широкую популярность эритроцитов-носителей в научных исследованиях, лишь немногие препараты, включенные в эритроциты, дошли до клинического применения. Возможно, это связано со сложностью масштабирования производства таких препаратов, так как терапия эритроцитами, нагруженными ЛС, скорее, относится к персонифицированной медицине и требует индивидуального подхода, хотя для конкретного пациента это можно отнести, скорее, к плюсам. Тем не менее существуют препараты, уже проходящие клинические испытания для внедрения в клиническую практику. Это препарат L-аспарагиназы в эритроцитах компании Erytech Pharma (Франция) (GRASPA) для лечения ОЛЛ и Eryaspase для терапии рака поджелудочной железы и трижды негативного рака молочной железы [56]. На стадии разработки и доклинических испытаний находятся метионин-γ-лиаза в эритроцитах (Erymethionase) для терапии солидных опухолей, иммунотерапии рака и инкапсуляция ферментов в эритроциты для ФЗТ.

Компания EryDel (Италия), в свою очередь, сосредоточила свое внимание на клинических испытаниях дексаметазона (Ery-Dex) для лечения атаксии-телангиэктазии. На стадии доклинических исследований находятся эритроциты, нагруженные фенилаланин-аммиачной лиазой для лечения фенилкетонурии, рекомбинантной уриказой для утилизации мочевой кислоты и гуанидинметилтрансферазой для ФЗТ. Европейское медицинское агентство уже предоставило статус орфанных препаратов дексаметазона фосфату в эритроцитах для лечения муковисцидоза (EU/3/04/230) [57] и L-аспарагиназе (EU/3/09/633) для лечения рака поджелудочной железы и ОЛЛ (EU/3/06/409).

Таким образом, можно ожидать, что в скором времени эритроциты-носители лекарственных препаратов получат широкое применение, особенно в ФЗТ и противоопухолевой терапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ
Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований для аспирантов второго года №19-34-90035 (для Колевой Л.Д.), а также Министерством науки и высшего образования РФ (проекты АААА-А17-117112420087-0 и АААА-А19-119111690006-9).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ
Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID
Koleva L.D. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8803-5694
Ataullakhanov F.I. ORCID: http://orcid.org/0000-0003-3403-181X
Sinauridze E.I. ORCID: http://orcid.org/0000-0002-5948-3444

Литература

1. Атауллаханов Ф.И., Борсакова Д.В., Протасов Е.С., Синауридзе Е.И., Зейналов А.М. Эритроцит: мешок с гемоглобином или живая, активная клетка? Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (1): 108–16.
2. Koleva L., Bovt E., Ataullakhanov F., Sinauridze E. Erythrocytes as carriers : from drug delivery to biosensors. Pharmaceutics 2020; 12 (3): 276.
3. Pierigè F., Bigini N., Rossi L., Magnani M. Reengineering red blood cells for cellular therapeutics and diagnostics. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 2017; 9 (5): e1454. DOI: 10.1002/wnan.1454
4. Fernandes H.S., Silva Teixeira C.S., Fernandes P.A., Ramos M.J., Cerqueira N.M.F.S.A. Amino acid deprivation using enzymes as a targeted therapy for cancer and viral infections. Expert Opin Ther Pat 2017; 27 (3): 283–97.
5. Rytting M.E. Role of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: focus on adult patients. Blood Lymphat Cancer Targets Ther 2012; 2: 117–24.
6. Cremel M., Guerin N., Campello G., Barthe Q., Berlier W., Horand F., et al. Innovative approach in Pompe disease therapy: induction of immune tolerance by antigen-encapsulated red blood cells. Int J Pharm 2015; 491 (1–2): 69–77.
7. Minetto P., Bisso N., Guolo F., Clavio M., Coviello E., Guardo D., et al. Patient and therapy-related factors affecting the toxicity of pegylated-asparaginase for the treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. Blood 2017; 130 (Suppl 1): 1297.
8. Booth C., Gaspar B. Pegademase bovine (PEG-ADA) for the treatment of infants and children with severe combined immunodeficiency (SCID). Biologics 2009; 3: 349–58.
9. Bax B.E., Bain M.D., Fairbanks L.D., Chalmers R.A., Webster A.D.B. *In vitro* and *in vivo* studies with human carrier erythrocytes loaded with polyethylene glycol-conjugated and native adenosine deaminase. Br J Haematol 2000; 109 (3): 549–54.
10. Levene M., Bain M., Moran N., Nirmalananthan N., Poulton J., Scarpelli M., et al. Safety and efficacy of erythrocyte encapsulated thymidine phosphorylase in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. J Clin Med 2019; 8 (4): 457.
11. Halfon-Domenech C., Thomas X., Chabaud S., Baruchel A., Gueyffier F., Mazingue F., et al. l-asparaginase loaded red blood cells in refractory or relapsing acute lymphoblastic leukaemia in children and adults: Results of the GRASPALL 2005-01 randomized trial. Br J Haematol 2011; 153 (1): 58–65.
12. Hunault-Berger M., Leguay T., Huguet F., Leprêtre S., Deconinck E., Ojeda-Uribe M., et al. A Phase 2 study of L-asparaginase encapsulated in erythrocytes in elderly patients with Philadelphia chromosome negative acute lymphoblastic leukemia: The GRASPALL/GRAALL-SA2-2008 study. Am J Hematol 2015; 90 (9): 811–8.
13. Bax B.E., Bain M.D., Fairbanks L.D., Simmonds H.A., Webster A.D., Ronald A. Carrier erythrocyte entrapped adenosine deaminase therapy in adenosine deaminase deficiency. Adv Exp Med Biol 2000; 486: 47–50.
14. Bax B.E., Bain M.D., Fairbanks L.D., Webster A.D.B., Ind P.W., Hershfield M.S., et al. A 9-yr evaluation of carrier erythrocyte encapsulated adenosine deaminase (ADA) therapy in a patient with adult-type ADA deficiency. Eur J Haematol 2007; 79 (4): 338–48. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2007.00927.x
15. Filosto M., Piccinelli S.C., Caria F., Cassarino S.G., Baldelli E., Galvagni A., et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE-MTDPS1). J Clin Med 2018; 7 (11): 389. DOI: 10.3390/jcm7110389
16. Halter J., Schupbach W., Casali C., Elhasid R., Fay K., Hammans S., et al. Allogeneic hematopoietic SCT as treatment option for patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a consensus conference proposal for a standardized approach. Bone Marrow Transplant 2011; 46 (3): 330–7.
17. Baruchel A., Bertrand Y., Thomas X., Blin N., Tavernier E., Ducassou S., et al. Updated clinical activity of GRASPA versus native l-asparaginase in combination with cooprall regimen in phase 3 randomized trial in patients with relapsed acute lymphoblastic leukemia. Blood 2015; 126 (23): 3723.
18. Bachet J., Gay F., Maréchal R., Galais M., Adenis A., Salako D., et al. Asparagine synthetase expression and phase I study with L -asparaginase encapsulated in red blood cells in patients with pancreatic adenocarcinoma. Pancreas 2015; 44 (7): 1141–7.
19. Hammel P., Bachet J.-B., Portales F., Mineur L., Metges J.-P., de la Fouchardiere C., et al. 621PDA Phase 2b of eryaspase in combination with gemcitabine or FOLFOX as second-line therapy in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma (NCT02195180). Ann Oncol 2017.
20. Gay F., Aguera K., Sénéchal K., Tainturier A., Berlier W., Maucort-Boulch D., et al. Methionine tumor starvation by erythrocyte-encapsulated methionine gamma-lyase activity controlled with per os vitamin B6. Cancer Med 2017; 6 (6): 1437–52.
21. Sénéchal K., Maubant S., Leblanc M., Ciré S., Gallix F., Andrivon A., et al. Erymethionase (methionine-gamma-lyase encapsulated into red blood cells) potentiates anti-PD-1 therapy in TNBC syngeneic mouse model [abstract]. Proc Am Assoc Cancer Res Annu Meet 2019; 2019 Mar 29–Apr 3; Atlanta, GA Philadelphia AACR. Cancer Res 2019; 79 (13 Suppl): Abstract nr 2258.
22. Gay F., Aguera K., Senechal K., Bes J., Chevrier A.-M., Gallix F., et al. Arginine deiminase loaded in erythrocytes: a promising formulation for L-arginine deprivation therapy in cancers. [abstract]. Proc 107th Annu Meet Am Assoc Cancer Res 2016 Apr 16–20; New Orleans, LA Philadelphia AACR. Cancer Res 2016; 76 (14 Suppl): Abstract nr 4812.
23. Yuan S.H., Ge W.H., Huo J., Wang X.H. Slow release properties and liver-targeting characteristics of methotrexate

erythrocyte carriers. Fundam Clin Pharmacol 2009; 23 (2): 189–96.
24. Rossi L., Castro M., D'Orio F., Damonte G., Serafini S., Bigi L., et al. Low doses of dexamethasone constantly delivered by autologous erythrocytes slow the progression of lung disease in cystic fibrosis patients. Blood Cells Mol Dis 2004; 33 (1): 57–63.
25. Bossa F., Latiano A., Rossi L., Magnani M., Palmieri O., Dallapiccola B., et al. Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with mild-to-moderate ulcerative colitis, refractory to mesalamine: A randomized, controlled study. Am J Gastroenterol 2008; 103 (10): 2509–16.
26. Castro M., Rossi L., Papadatou B., Bracci F., Knafelz D., Ambrosini M., et al. Long-term treatment with autologous red blood cells loaded with dexamethasone 21–phosphate in pediatric patients affected by steroid-dependent Crohn disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007; 44: 423–6.
27. Skorokhod O.A., Kulikova E.V., Galkina N.M., Medvedev P.V., Zybunova E.E., Vitvitsky V.M., et al. Doxorubicin pharmacokinetics in lymphoma patients treated with doxorubicin-loaded eythrocytes. Haematologica 2007; 92 (4): 570–1.
28. Skorokhod O.A., Garmaeva T., Vitvitsky V.M., Isaev V.G., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G., et al. Pharmacokinetics of erythrocyte-bound daunorubicin in patients with acute leukemia. Med Sci Monit 2004; 10 (4): 55–64.
29. Sawyer D.B., Peng X., Chen B., Pentassuglia L., Lim C.C. Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection? Prog Cardiovasc Dis 2010; 53 (2): 105–13.
30. Czock D., Keller F., Rasche F.M., Ulla H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. Clin Pharmacokinet 2005; 44 (1): 61–98.
31. Ataullakhanov F.I., Isaev V.G., Kohno A.V., Kulikova E.V., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G., et al. Pharmacokinetics of doxorubicin in patients with lymphoproliferative disorders after infusion of doxorubicin-loaded erythrocytes. In: Sprandel U., Way J.L. (ed.). Erythrocytes as Drug Carriers in Medicine. Boston, MA: Springer US; 1997. Pp. 137–142.
32. Murciano J., Medinilla S., Eslin D., Atochina E., Cines D.B., Muzykantov V.R. Prophylactic fibrinolysis through selective dissolution of nascent clots by tPA-carrying erythrocytes. Nat Biotechnol 2003; 21 (8): 891–6.
33. Stein S.C., Ganguly K., Belfield C.M., Xu X., Swanson E.W., Chen X.-H., et al. Erythrocyte-bound tissue plasminogen activator is neuroprotective in experimental traumatic brain injury. J Neurotrauma 2009; 26 (9): 1585–92.
34. Armstead W.M., Ganguly K., Riley J., Kiessling W.J., Cines D.B., Higazi A.A.R., et al. Red blood cell-coupled tissue plasminogen activator prevents impairment of cerebral vasodilatory responses through inhibition of c-Jun-N-terminal kinase and potentiation of p38 mitogen-activated protein kinase after cerebral photothrombosis in the newborn. Pediatr Crit Care Med 2011; 12 (6): e369.
35. Muzykantov V.R., Murciano J.C., Taylor R.P., Atochina E.N., Herraez A. Regulation of the complement-mediated elimination of red blood cells modified with biotin and streptavidin. Anal Biochem 1996; 241 (1): 109–19.
36. Muzykantov V.R., Barnathan E.S., Atochina E.N., Kuo A., Danilov S.M., Fisher A.B. Targeting of antibody-conjugated plasminogen activators to the pulmonary vasculature. J Pharmacol Exp Ther. 1996;279(2):1026–34.
37. Pozzi L.-A.M., Maciaszek J.W., Rock K.L. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. J Immunol 2005; 175 (4): 2071–81.
38. Eichler H.G., Gasic S., Bauer K., Korn A., Bacher S. *In vivo* clearance of antibody-sensitized human drug carrier erythrocytes. Drug-carrier erythrocytes. 1986;40(3):300–3. Clin Pharmacol Ther 1986; 40 (3): 300-3. DOI: 10.1038/clpt.1986.180
39. Delaby C., Pilard N., Hetet G., Driss F., Grandchamp B., Beaumont C., Canonne-Hergaux F. A physiological model to study iron recycling in macrophages. Exp Cell Res 2005; 310 (1): 43–53.
40. DeLoach J.R., Tangner C.H., Barton C. Hepatic pharmacokinetics of glutaraldehyde-treated methotrexate-loaded carrier erythrocytes in dogs. Res Exp Med 1983; 183 (3): 167–75.
41. Bratosin D., Mazurier J., Tissier J.P., Slomianny C., Estaquier J., Russo-Marie F., et al. Molecular mechanisms of erythrophagocytosis. Characterization of the senescent erythrocytes that are phagocytized by macrophages. C R Acad Sci III. 1997; 320 (10): 811–8. DOI: 10.1016/s0764-4469(97)85017-2
42. Mishra P.R., Jain N.K. Biotinylated methotrexate loaded erythrocytes for enhanced liver uptake. "A study on the rat". Int J Pharm 2002; 231 (2): 145–53. DOI: 10.1016/s0378-5173(01)00847-x
43. Magnani M., Rossi L., Fraternale A., Casabianca A., Brandi G., Benatti U., De Flora A. Targeting antiviral nucleotide analogues to macrophages. J Leukoc Biol 1997; 62 (1): 133–7.
44. Magnani M., Rossi L., Fraternale A., Silvotti L., Quintavalla F., Piedimonte G., et al. FIV infection of macrophages: in vitro and in vivo inhibition by dideoxycytidine 5'-triphosphate. Vet Immunol Immunopathol 1995; 46 (1): 151–8.
45. Magnani M., Balestra E., Fraternale A., Aquaro S., Paiardini M., Cervasi B., et al. Drug-loaded red blood cell-mediated clearance of HIV-1 macrophage reservoir by selective inhibition of STAT1 expression. J Leukoc Biol 2003; 74 (5): 764–71.
46. Dominici S., Laguardia M.E., Serafini G., Chiarantini L., Fortini C., Tripiciano A., et al. Red blood cell-mediated delivery of recombinant HIV-1 Tat protein in mice induces anti-Tat neutralizing antibodies and CTL. Vaccine. 2003; 21: 2082–90.
47. Franco R., Dufour E., Kosenko E., Bax B.E., Banz A., Skorokhod O.A., et al. International seminar on the red blood cells as vehicles for drugs. Expert Opin Biol Ther 2012; 12 (1): 127–33.
48. Sabatino R., Antonelli A., Battistelli S., Schwendener R., Magnani M., Rossi L. Macrophage depletion by free bisphosphonates and zoledronate-loaded red blood cells. PLoS One 2014; 9 (6): e101260.
49. Mishra P.R., Jain N.K. Surface modified methotrexate loaded erythrocytes for enhanced macrophage uptake. J Drug Target 2000; 8 (4): 217–24.
50. Cremel M., Guérin N., Horand F., Banz A., Godfrin Y. Red blood cells as innovative antigen carrier to induce specific immune tolerance. Int J Pharm 2013; 443 (1–2): 39–49.
51. Magnani M., Chiarantini L., Vittoria E., Mancini U., Rossi L., Fazi A. Red blood cells as an antigen-delivery system. Biotechnol Appl Biochem 1992; 16 (2): 188–94.
52. Chiarantini L., Argnanit R., Zucchinit S., Stevanatot L., Grossi M.P., Magnani M., et al. Red blood cells as delivery system for recombinant HSV-1 glycoprotein B: immunogenicity and protection in mice. Vaccine 1997; 15 (3): 276–80.
53. Banz A., Cremel M., Mouvant A., Guerin N., Horand F., Godfrin Y. Tumor growth control using red blood cells as the antigen delivery system and poly (I: C). J Immunother 2012; 35 (5): 409–17.
54. Banz A., Cremel M., Rembert A., Godfrin Y. *In situ* targeting of dendritic cells by antigen-loaded red blood cells: A novel approach to cancer immunotherapy. Vaccine 2010; 28 (17): 2965–72.
55. Renno T., Lebecque S., Renard N., Saeland S., Vicari A. What's new in the field of cancer vaccines? Cell Mol Life Sci 2003; 60 (7): 1296–310.
56. Pipeline Erytech. [Электронный оесурс]. URL: https://erytech.com/pipeline/ (Дата обращения 28.11.2020)
57. European Medical Agency [Электронный ресурс]. URL: https://www.ema.europa.eu/en. (Дата обращения 28.11.2020)