
ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

REVIEWS

УДК 576.3::60:577.352.2

ИСКУССТВЕННЫЕ КЛЕТКИ КАК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ УСТРОЙСТВА, ИМИТИРУЮЩИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРИРОДНЫХ КЛЕТОК

Т. А. ГАПЕЕВА¹⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Термин «искусственная клетка» широко используется в научных кругах, однако его трактовка неоднозначна. Первоначальное понятие об искусственной клетке связано с идеей замены функций природных клеток по аналогии с трансплантацией органов, а не воссоздания живой клетки. В настоящее время исходное понятие не охватывает все многообразие объектов синтетической биологии, определяемых как искусственные (синтетические) клетки. Создание искусственных клеток преследует три основные цели, связанные с исследованием вопроса о происхождении жизни, изучением биологии клетки и решением практических задач во многих областях научной и практической деятельности, прежде всего в медицине. В рамках используемого в науке редуccionистского подхода искусственные клетки можно разделить на две основные группы по способу их получения: клетки *bottom-up* (созданы по принципу «от простого к сложному») и клетки *top-down* (созданы по принципу «от сложного к простому»). В данной обзорной статье рассматриваются конструирование и применение таких клеток *bottom-up*, которые можно определить как биотехнологические устройства для имитации параметров природных клеток, используемые прежде всего в многочисленных практических приложениях.

Ключевые слова: искусственная клетка; биотехнология; синтетическая биология; клеточные мембраны; имитация природных клеток.

Образец цитирования:

Гапеева ТА. Искусственные клетки как биотехнологические устройства, имитирующие параметры природных клеток. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;1:4–18. EDN: DVGZAK

For citation:

Gapeeva TA. Artificial cells as biotechnological devices that mimic the parameters of natural cells. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;1:4–18. Russian. EDN: DVGZAK

Автор:

Тамара Александровна Гапеева – кандидат биологических наук, доцент; старший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

Author:

Tamara A. Gapeeva, PhD (biology), docent; senior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cell. tamaralex@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5559-2689>

ARTIFICIAL CELLS AS BIOTECHNOLOGICAL DEVICES THAT MIMIC THE PARAMETERS OF NATURAL CELLS

T. A. GAPEEVA^a

^a*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus*

The term «artificial cell» is widely used in scientific circles, but its understanding is ambiguous. The original concept of an artificial cell related to the idea of replacing the functions of natural cells by analogy with organ transplantation, rather than to recreate a living cell. Currently, the original concept does not encompass the entire variety of synthetic biology objects defined as artificial (synthetic) cells. The creation of artificial cells pursues three main goals related to the research of the question of the origin of life, the study of cell biology and the solution of practical problems in many fields, most notably medicine. Within the framework of reductionist approach used in science, artificial cells can be divided into two groups according to the way they are obtained: bottom-up cells (created according to the principle «from simple to complex») and top-down cells (created according to the principle «from complex to simple»). This review focuses on the bottom-up development and application of such cells, which can be defined as biotechnological devices that mimic the parameters of natural cells for use primarily in numerous practical applications.

Keywords: artificial cell; biotechnology; synthetic biology; cell membranes; natural cells mimicking.

Введение

С момента обнаружения одноклеточных микроорганизмов Р. Гуком в 1665 г. [1] клетки изучаются уже несколько столетий. В соответствии с клеточной теорией, сформулированной М. Я. Шлейденом, Т. Шванном и Р. Вирховым к середине XIX в., живые организмы состоят из одной и более клеток, которые являются их основной структурной и организационной (функциональной) единицей и происходят из ранее существовавших клеток [2]. В настоящее время обсуждение клеточной теории продолжается, так как дискуссия о том, что такое жизнь на биологическом уровне, остается открытой.

Исследования в области искусственных клеток обусловлены необходимостью решения трех классов задач. Первый класс задач, связанный с вопросом о происхождении жизни, был давним стимулом для создания искусственных протоклеток. Второй класс задач предполагает изучение биологии клетки путем проведения исследований на упрощенных моделях. Третий класс задач предусматривает создание биотехнологических устройств, запрограммированных на выполнение полезных функций на клеточном уровне.

Термины «искусственная клетка» и «синтетическая клетка» используются как взаимозаменяемые. Существуют разногласия в трактовке понятия «искусственная (синтетическая) клетка» различными исследовательскими группами. Идея искусственной клетки, предложенная канадским ученым-медиком Т. М. С. Чангом в 1957 г., изначально предполагала создание искусственных клеток для замены природных клеток и была призвана стимулировать конструирование очень простых систем для практического применения на основе имеющихся базовых знаний о природной клетке (прежде всего в медицине), а не воспроизводить природную живую клетку [3]. В 1957 г. Т. М. С. Чанг создал первую искусственную клетку с полимерной мембраной на основе коллодия, которая инкапсулировала гемоглобин и ферменты эритроцитов [4]. Впоследствии Т. М. С. Чанг предложил понимать под термином «искусственная клетка» не конкретный физический объект, а концепцию, позволяющую объединить множество структур, создаваемых в рамках синтетической биологии [5]. По его мнению, искусственными клетками можно считать не только микро- и наноструктуры, но и макроструктуры, а также структуры молекулярных размеров. Каждому размеру соответствует неограниченное количество конфигураций.

Первые искусственные клетки представляли собой контейнеры клеточных размеров, инкапсулирующие биоактивные субстанции (ферменты и генетические последовательности), которые придают капсуле бионические свойства. Инкапсулирование защищало содержимое капсулы от прямого взаимодействия с компонентами внеклеточной среды – лейкоцитами, антителами и триптическими (расщепляющими) ферментами. Мембраны клеток были полунепроницаемыми и обеспечивали возможность поглощать и выделять необходимые субстанции. С применением данного простого подхода были получены искусственные клетки для гемоперфузии, что стимулировало создание более сложных синтетических конструкций, в частности, для лечения диабета и ферментной терапии наследственных заболеваний.

К 2004 г. определились такие направления применения искусственных клеток, как клеточная терапия с использованием микроинкапсулированных природных и генно-модифицированных клеток и доставка лекарств. Если первые искусственные клетки представляли собой микрокапсулы, то позже были сконструированы, например, наноразмерные заменители эритроцитов [6]. Так как при создании каждой конфигурации требовалась новая терминология, то научная область, предметом изучения которой является искусственная клетка, стала весьма запутанной для новичков [7; 8].

Точные атрибуты, в соответствии с которыми конструкция может считаться искусственной клеткой, все еще обсуждаются. Важно отметить, что концепция искусственной клетки Чанга не требует, чтобы создаваемая структура соответствовала природным биологическим клеткам на основе углерода [9]. Некоторые ученые считают искусственными клетками любой набор функциональных биологически значимых молекул, заключенных в капсулы клеточных размеров. Другие исследователи подчеркивают необходимость имитировать клеточное поведение, которое считается отличительной чертой жизни. К числу спорных также относятся вопросы о том, является ли включение геномных компонентов обязательным условием, должны ли искусственные клетки состоять из строительных блоков, полученных биологическим путем, или достаточно морфологического сходства [10]. Набор свойств, которыми должна обладать «живая» искусственная клетка, точно не установлен, однако существует концепция минимальной жизни, определяющая минимальный набор функций клетки, необходимых для выживания. Для описания минимальной жизни часто используется, например, модель хемотона, предложенная венгерским биологом-теоретиком Т. Ганти [11]. Согласно данной модели объект, обладающий химической системой границ, химической информационной системой и самовоспроизводящимся химическим двигателем (метаболизмом), может считаться «живым». Кроме того, для выживания вида необходимы рост и воспроизводство. Наконец, для сохранения жизни в динамичной среде первостепенное значение имеет адаптивность.

Возможно, самые строгие определения – это те определения, которые классифицируют искусственные («живые») клетки только как полностью автономные, автопоэтические, самоподдерживающиеся, воспроизводящиеся и развивающиеся биохимические микросистемы [10]. На пути создания «живых» искусственных клеток стоят трудности компартиментализации, репликации, обеспечения процессов роста и развития, обработки информации и превращения энергии, коммуникации с внешним окружением, построения коммуникативных клеточных сетей, деления, движения, способности к эволюции и др. Дополненная концепция Чанга, как и первоначальная, ориентирована в большей степени на практическое применение искусственных клеток, и поэтому вопрос о том, должна ли быть создаваемая клетка «живой», не является принципиальным. Тем не менее в данной концепции есть место и «живым» искусственным клеткам. Таким образом, понятие об искусственной клетке в рамках концепции Чанга является достаточно универсальным, требующим лишь уточнения конкретного типа клетки, которая создается теми или иными научными группами.

Искусственная клетка выступает объектом бурно развивающейся в настоящее время синтетической биологии. В контексте данного направления искусственная (синтетическая) клетка – это клетка неестественного происхождения, полученная либо путем модификации уже существующей клетки (от сложного к простому, т. е. сверху вниз (*top-down*)), либо путем сборки устройств, имитирующих или дополняющих свойства и функции живой клетки (от простого к сложному, т. е. снизу вверх (*bottom-up*)) [12]. Подход *top-down* изначально предполагает создание «живых» клеток. В рамках подхода *bottom-up* конструируемые клетки могут и не быть «живыми», однако создание «живой» клетки, тесно связанной с понятием «протоклетка», остается важнейшей задачей и для данного подхода. Стремление к получению искусственных клеток, максимально приближенных к природным клеткам по поведению и функциям, стимулировало также появление клеточной бионики, в которой границы между живой и неживой материей размыты за счет соединения подходов *top-down* и *bottom-up* [12].

Искусственные клетки могут определяться как типичные и нетипичные. Типичные искусственные клетки структурно схожи с природными. Они обладают функциями, соответствующими биологическим процессам в живых клетках, включая метаболизм материалов и энергии, самостоятельный рост, репродукцию и даже эволюцию [13–15]. Конструирование нетипичных искусственных клеток не имеет ограничений по соответствию структуре и функциям природных клеток [16]. Предлагается также разделять искусственные и неинкапсулированные генно-модифицированные клетки [17], которые, однако, тоже созданы искусственно [18].

Таким образом, словосочетание «искусственная (синтетическая) клетка» широко используется, но требует уточнения в каждом конкретном случае в связи с неоднозначностью понимания этого термина различными исследовательскими группами. В целом редукционистский подход к концепции искусственной клетки, заключающийся в создании структурно и функционально упрощенных моделей, удобен для решения как исследовательских, так и прикладных задач в области клеточной биологии и инженерии.

Следует отметить, что в данной работе не рассматривается создание искусственных клеток с использованием методов синтетической геномики [19]. Настоящий обзор посвящен направлению по конструированию клеток *bottom-up*, начало которому было положено Т. М. С. Чангом. Подобные упрощенные модели – имитаторы клеточных параметров представляют собой биотехнологические устройства для решения задач в различных областях, включая прежде всего медицину, клеточную биологию и др.

Конструирование клеток *bottom-up*

В рамках подхода *bottom-up* в большинстве случаев используются искусственные мембранные структуры (в том числе полученные из природных клеточных мембран) [20]. Основными из них являются липосомы, полимеросомы, липидно-полимерные везикулы, неорганические коллойдосомы, металлоорганические каркасы, коацерваты, природные биологические мембраны [17]. Кроме того, при создании каркасов могут применяться структуры из сшитых белков, ДНК-оригами, а также реакции пегилирования, конъюгации и др. [21]. Компонентами искусственных клеток могут быть компартменты, цитозоль, органеллы, магнитные материалы, адсорбенты, серебро, золото, ДНК, мРНК, гормоны, ферменты, гемоглобин, инсулин и другие белки, пептиды, гены, в том числе для генной терапии, вакцины, лекарственные средства химического происхождения, природные клетки, стволовые клетки, генно-модифицированные клетки, микроорганизмы, биотехнологические продукты и т. д. [8].

Липидные везикулы (липосомы) были исторически первым материалом, используемым для получения искусственных клеток [4]. Липосома – это замкнутая полая сфера из липидного бислоя, способная к инкапсуляции водных растворов. Монослойные липидные везикулы подразделяются на гигантские однослойные везикулы (GUVs) с диаметром более 1 мкм, большие однослойные везикулы (LUVs) с диаметром от 100 нм до 1 мкм и небольшие однослойные везикулы (SUVs) с диаметром менее 100 нм. Липосомы используются для имитации разнообразных биологических форм – от эукариотических клеток до бактериальных органелл. Для получения искусственных клеток наиболее часто применяются GUVs из-за их соответствия по размеру природным клеткам. Многослойные липидные везикулы (MLVs) состоят из нескольких слоев липидов или полимеров, окруженных мультивезикулярными частицами (MVVs) [22]. В свою очередь, MVVs состоят из SUVs или LUVs, инкапсулированных в GUVs в качестве органелл, и используются для организации компартментов [23]. Получение GUVs осуществляют с помощью следующих методов [17]: мягкой гидратации и формирования частиц в электрическом поле [24], обращения фаз (переноса между фазами) [25], микрофлюидики (микрогидродинамики) [26; 27]. Для создания LUVs применяют разнообразные методы, в том числе метод впрыска растворителя, метод испарения с обращением фаз, метод сольubilизации детергентами с последующим диализом [17]. Способы получения SUVs включают обработку ультразвуком и экструзию под давлением.

К фосфолипидам липосом могут быть добавлены специфические мембранные белки для исследования соответствующих функций клеток, таких как биологическая активность питательных веществ и отходов [28], внутриклеточная сигнальная трансдукция [29], межклеточные взаимодействия [30; 31], активность генов и эволюционные механизмы [32]. Для стабилизации структуры липидные везикулы обогащаются экстрактами природных мембран, состоящими из липидов, белков, сахаров и других компонентов. Среди достижений в области искусственных клеток с липидными мембранами можно отметить получение в 2019 г. клетки с мембраной из GUVs с включением аденозинтрифосфат-синтазы (АТФ-синтазы) и двух конвертирующих свет белков [33]. Искусственная мембрана инкапсулировала липиды и фотосинтетические органеллы, которые активировались светом, при этом оптический контроль полимеризации актина приводил к изменению морфологии искусственных клеточных везикул. Система успешно осуществляла две АТФ-зависимые реакции – фиксацию углерода и полимеризацию актина.

Наличие таких основных недостатков липидных структур, как низкая стабильность и жесткие условия при проведении химической модификации, стимулировало исследователей к использованию амфифильных блок-сополимеров для сборки полимеросом, в том числе гигантских [34; 35]. Полимеросомы, как и липосомы, формируют бислойную сферическую структуру с жидкостью внутри. Для получения клеточных мембран широко применяются натуральные полимерные материалы (например, хитозан и его производные, глюкоманнан, целлюлоза) и синтетические органические полимеры (например, альгинат-полилизин-альгинат натрия) [36; 37]. К полимерным материалам могут быть добавлены различные типы функциональных белков, такие как ионные каналы и ферменты для имитации функций природных мембран [38–41]. Для более полной реализации преимуществ того или иного материала также используются смешанные липидно-полимерные везикулы, наноконъюгаты белков и полимеров [16; 42–45]. Применение различных типов материалов позволяет регулировать проницаемость мембран, что было продемонстрировано, в частности, при использовании нейлона для обертки клеток [3]. Одним из интересных подходов является применение природных биологических мембран для покрытия синтетических полимерных поверхностей [34].

Липиды и органические полимеры имеют недостатки (нестабильность при тепловых и механических воздействиях, сложности в регуляции проницаемости), ограничивающие практические приложения искусственных мембран из данных материалов. В результате важное место среди материалов для конструирования мембран искусственных клеток заняли неорганические коллоидосомы, которые образуются в основном путем самосборки коллоидных частиц в двухфазной системе вода – масло с использованием микрофлюидики [46–55]. Коллоидосомы представляют собой микрокапсулы, покрытые оболочкой из плотноупакованных однослойных коллоидных частиц, которые могут быть дополнительно соединены между собой для обеспечения переноса коллоидосом в водную фазу [56]. Размер, проницаемость и механическая жесткость коллоидосом тщательно контролируются. Кроме того, неорганические мембраны легко поддаются химической модификации. Первая примитивная неорганическая модель клетки, созданная в 2011 г., имела мембрану из коллоидосом, содержащих области из гидрофобно-гидрофильных силикатных наночастиц размером 20–30 нм [45]. В силикатные коллоидосомы в процессе их сборки могут быть включены различные биологически активные молекулы (белки, нуклеиновые кислоты, ионы металлов и др.). Также обнаружено, что коллоидосомы способны имитировать рост, воспроизводство и фагоцитоз природных клеток [57–59].

В 2019 г. были созданы искусственные клетки из металлоорганических каркасов (MOF) с иммобилизованными на них ферментами, обладающие способностью имитировать разнообразные клеточные функции, включая регуляцию мембранного транспорта, клеточный метаболизм, межклеточную коммуникацию, программируемую деградацию [60]. Металлоорганические каркасы представляют собой гибридные органо-неорганические кристаллические пористые материалы, состоящие из регулярного массива положительно заряженных ионов металлов, окруженных органическими линкерными молекулами. Ионы металлов образуют узлы, которые связывают плечи линкеров, формируя повторяющийся, похожий на клетку состав [17]. Клетки на основе MOF обладают прекрасной стабильностью при воздействии разнообразных физических и химических факторов, а также рядом полезных как для исследований в сфере биологии клетки, так и для медицинской практики свойств: высокой емкостью («грузоподъемностью»), настраиваемым составом и структурой, универсальностью и регулируемым размером пор [61–63]. Из последних достижений в области клеток на основе MOF можно отметить создание в 2022 г. искусственных β -клеток с инкапсулированными MOF-органеллами, обладающими чувствительностью к гипергликемии, что проявляется в запрограммированной транскрипции генов, трансляции белка и секреции инсулина [64].

Клетки с мембранной оболочкой, полученной из природных клеток, позволяют идентифицировать и исследовать мембранные белки, а также являются более безопасной системой доставки лекарств, чем липосомы. Первая подобная искусственная клетка, содержащая функционально активные экзогенные молекулы нуклеиновых кислот, была получена в 2019 г. методом сокультивации клеток линии HeLa и наноматериала – карбоксилированного фуллерена – при облучении белым светом [65].

Все вышеперечисленные искусственные структуры имеют существенные сложности в организации функциональных возможностей в наномасштабе и обеспечении сетевой связи между всеми компонентами, поэтому, в частности, их трудно назвать «живыми». В природной клетке присутствует множество безмембранных структур (например, тельца Кахала и ядрышки), которые образуются в результате коацервации. Коацервация основана на разделении фаз жидкость – жидкость (*liquid – liquid phase separation, LLPS*) [66; 67] и приводит к образованию коллоидных скоплений коацерватов в виде двух жидких слоев или капель. При получении коацерватов, как и при формировании GUVs, может применяться микрофлюидика. В клетке коацерватные структуры (плотные жидкие капли из макромолекул) обычно образуются в результате электростатических взаимодействий между противоположно заряженными полиэлектролитами (полипептидами, полинуклеотидами, полисахаридами) либо мультивалентными небольшими молекулами (например, аденозинтрифосфатом (АТФ) или спермидином). С учетом того что первичный бульон в теории Опарина был коацерватом, можно ожидать, что тип искусственных клеток, полученный в результате коацервации, будет наиболее приближен к «живой» клетке. Действительно, в 2022 г. создана клетка на основе введения в коацерваты компонентов бактерий двух типов [68]. Один тип бактерий был локализован внутри коацерватных капель, а другой – снаружи. После этого бактерии разрушались с выделением клеточных компонентов, вследствие чего образовывались искусственные клетки с мембраной бактериального происхождения, окружающей ядро коацервата, которое содержит активные ферменты, функционально активный аппарат синтеза белков, заполненные водой камеры (вакуоли) и кольцевую плазмидную ДНК. В результате ферментативного расщепления плазмид на короткие нити ДНК конденсировалась в образование, напоминающее ядро. При введении актина его белковые структуры объединялись в нити, обеспечивая рудиментарный цитоскелет. При добавлении живых бактериальных клеток искусственные клетки принимали форму, по морфологии напоминающую амёбу. Хотя сконструированная клетка представляет собой клеточноподобный автомат и живая система пока не создана, работа [68]

является существенным шагом вперед, продемонстрировавшим силу коацерватов. Следующей задачей по преодолению разрыва между искусственной и природной клетками должно стать постепенное создание взаимосвязанных внутриклеточных сетей [69].

Применение клеток *bottom-up*

Клетки *bottom-up* обладают значительным потенциалом для использования в качестве интеллектуальных (реагирующих) биоматериалов (включая биосенсоры), систем адресной доставки персонализированных лекарств, заменителей природных клеток с поврежденными функциями и др. Наиболее полная систематизация достижений в области конструирования клеток с перспективой практического применения представлена в обзоре [17], ее основные аспекты приведены ниже.

Реакционные инкапсулирующие сосуды. Опубликовано множество работ по конструированию клеток, инкапсулирующих системы для простых каскадных реакций и внутриклеточных взаимодействий [29; 32; 70–72]. В частности, показано, что стабильность аминокликозидазы, инкапсулированной в MLVs, выше, чем ее стабильность в растворе [73; 74]. Интересен пример конструирования клетки с использованием мембраны естественного происхождения, инкапсулирующей систему сигнальной трансдукции, запускаемую в присутствии АТФ путем открытия управляемых АТФ нанозатворов из ДНК [75]. Для создания системы каскадных реакций и других наборов сложных химических реакций и внутриклеточных взаимодействий наиболее часто применяются мультикомпарментные GUVs, полученные в том числе с использованием микрофлюидики [23]. Подобные системы перспективны для пространственного и временного разделения каскадных биокаталитических реакций. Для конструирования реакционных инкапсулирующих клеточных систем применяются также полимерные и липидно-полимерные структуры, позволяющие, в частности, создавать более сложные наборы химических реакций или регулировать проницаемость мембран.

Экспрессия генов и трансляция белков являются одной из ключевых функций искусственных клеток. Имеются сообщения об инкапсуляции бесклеточной системы экспрессии, экстрагированной из *Escherichia coli*, для синтеза зеленого флуоресцентного белка [28]; системы экспрессии, состоящей из рибосом *E. coli* и фаговой T7-полимеразы, матриц ДНК и РНК, для синтеза специфических белков [76]; системы синтеза специфических мРНК [77]; системы ПЦР [78]; системы комплексного геномного синтеза белков фага Φ29 [79]. В будущем возможно развитие направления по конструированию искусственных клеток в качестве заменителей генно-модифицированных бактериальных клеток-биореакторов. В работе [80] внутри гигантского однослойного пузырька объединены система бесклеточного синтеза белка и небольшие протеолипосомы, которые включают очищенную АТФ-синтазу и бактериородопсин. Фотосинтезируемый АТФ используется в качестве субстрата для транскрипции и в качестве источника энергии для трансляции, что в конечном итоге приводит к синтезу *de novo* бактериородопсина и белковых субъединиц АТФ-синтазы. Фотосинтезируемый *de novo* бактериородопсин и части АТФ-синтазы интегрируются в искусственную фотосинтетическую органеллу и усиливают ее АТФ-фотосинтетическую активность за счет положительной обратной связи продуктов. Сконструированная искусственная фотосинтетическая клеточная система открывает путь к созданию энергетически независимой искусственной клетки, а также к применению искусственной клетки для получения энергии с использованием фотосинтеза [81].

Носители мембран для обмена материалами и информацией. В рамках данного направления конструируются липидные GUVs для исследования слияния мембран в процессе эндоцитоза и экзоцитоза на клеточной мембране [82; 83], слияния органелл, обмена белков и липидов на мембране [84], инфицирования вирусами [85; 86]. Созданные клетки могут имитировать временное образование пор и работу рецепторов [87; 88], ионный транспорт и функционирование ионных каналов [89], межклеточные взаимодействия [30; 31; 90]. Особый интерес представляют искусственные клетки со свойствами биосенсоров, в частности описанные выше клетки, реагирующие на гипергликемию [64]. Существенными достижениями являются также создание двух коллоидосомных клеток, осуществляющих между собой ненаправленную трансдукцию сигналов [91], демонстрация переноса материала и везикул-везикулярной коммуникации с использованием индикации на основе флуоресценции [92], конструирование искусственной системы сигнальной трансдукции сигналов (стимулятор – рецептор) с применением модели на базе GUVs [93]. С использованием химических инструментов созданы полностью синтетические рецепторы и продемонстрирован искусственный сигнальный каскад в липосомах. Каскад реакций обеспечивал трансмембранную активацию ферментов, что является отличительной чертой естественных сигнальных рецепторов [94].

Следует отметить, что, хотя исследования в области взаимодействий искусственных клеток между собой и с природными клетками чрезвычайно важны для синтеза живой ткани, в настоящее время они проводятся гораздо менее интенсивно, чем исследования для природных клеток.

Искусственные клетки для медицины. Искусственные клетки конструируются из искусственных и натуральных материалов с хорошей биосовместимостью, могут частично осуществлять функции природных клеток и обладают потенциалом для применения в медицине. Хотя используемые при получении синтетических клеток натуральные материалы должны соответствовать этическим нормам, в целом благодаря возможности применения большого количества искусственных материалов этические требования к искусственным клеткам могут быть менее строгими, чем к биомедицинским продуктам из природных клеток.

Доставка лекарств. Хорошо зарекомендовавшая себя липосомальная технология доставки лекарств и недавнее внедрение вакцин против SARS-CoV-2 на основе нагруженных РНК липидных наночастиц предполагают возможность использования искусственных клеток как своего рода умных агентов доставки лекарств [95].

Наиболее подходящими материалами для конструирования искусственных клеток, применяемых в качестве систем доставки лекарств, являются липиды, биodeградируемые полимеры, мембраны природных клеток [96]. С того времени, как липосомы впервые были предложены в роли систем доставки лекарств [97], эта стратегия достаточно широко и успешно используется на практике [98]. Исследовательские же работы сфокусированы на получении клеток из биоразлагаемых полимеров. Так, в 1976 г. Т. М. С. Чанг создал клетку из полилактида (биоразлагаемый материал, одобренный Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (*Food and Drug Administration*, FDA) для медицинской имплантации), содержащую ферменты, гормоны и другие биологические агенты [99]. В 2016 г. было продемонстрировано, что искусственные клетки из поли(молочно-гликолевой кислоты) (PLGA), инкапсулирующие доцетаксел, эффективнее самого доцетаксела в лечении таксаностойчивого трижды негативного рака молочной железы [100]. Для адресной доставки в липидные и полимерные мембраны искусственных клеток встраиваются антитела. Также для доставки лекарств широко используются искусственные клетки, включающие магнитные материалы, что позволяет направлять движение клеток или выделять их из смешанных систем [101; 102]. Наибольшей биосовместимостью обладают искусственные клетки с мембранами из природных клеток. Термочувствительные экзосомно-липосомные гибридные клетки, инкапсулирующие гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и доцетаксел для доставки в большие узлы опухоли, приводящей к метастатическому раку брюшины, значительно ингибировали развитие опухоли в сочетании с гипертермической интраперитонеальной химиотерапией [103].

Дизайн и конструирование синтетических терапевтических протоклеток, способных устанавливать родственные каналы химической связи с живыми клетками, являются важной задачей для синтетической биологии и биоинженерии. Методом спонтанной самосборки фрагментов мембран эритроцитов, несущих гемоглобин, на поверхности предварительно сформированных полисахаридно-полинуклеотидных коацерватных микрокапель, которые содержат глюкозооксидазу, были получены гибридные протоклетки. Данные синтетические клетки непрерывно производят NO в присутствии глюкозы и гидроксимочевины, что вызывает вазодилатацию *in vitro* и *in vivo* [90]. Применение подобных клеток представляет собой потенциальную стратегию лечения заболеваний, связанных со стенозом и закупоркой сосудов.

Получены искусственные клетки из фрагментов мембран опухолевых клеток, что позволило осуществлять нацеливание на область патологии. Фрагменты мембран, обволакивая молекулы протопорфирина IX, инкапсулировали комплексы ионов металлов с таниновой кислотой с образованием смешанного органического материала, включающего терапевтическое железо. Сконструированные клетки обладали улучшенной способностью к уничтожению опухолей в комбинации с фототермической и фотодинамической терапией по сравнению с применением только данных видов терапии [104].

Замена функций природных клеток. В 1964 г. Т. М. С. Чанг сообщил о создании искусственных эритроцитов [3]. С того времени исследования в данном направлении стали широко распространены [105–111]. Гемоглобин представляет собой тетрамер и является отличным переносчиком кислорода. Однако в организме он превращается в токсичные димеры ($\alpha 1\beta 1$ и $\alpha 2\beta 2$) и мономеры ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\alpha 2$, $\beta 2$). Для предотвращения этого используются разные подходы, в частности межмолекулярная сшивка, внутримолекулярная сшивка, конъюгация, нанокапсулирование и рекомбинантные методы [7; 112; 113]. Согласно концепции Чанга полимеризованный гемоглобин (PolyHb), получаемый сшивкой глутаровым диальдегидом, также можно отнести к искусственным клеткам, что не исключает применения коацерватной инкапсуляции при создании таких структур [114]. Были проведены и продолжают проводиться многочисленные широкомасштабные клинические испытания различных препаратов на основе PolyHb [107; 111; 115]. Следует отметить, что к настоящему времени ни один подобный препарат не одобрен для применения в трансфузиологии из-за серьезных побочных эффектов, таких как вазоконстрикция, системная гипертензия и поражения сердца, поэтому ведется разработка PolyHb-препаратов

нового поколения [116]. Искусственные клетки, используемые в качестве заменителей гемоглобина, должны имитировать три основные функции красных кровяных телец: транспорт кислорода от легочной ткани по всему организму, удаление вредных активных форм кислорода, транспорт углекислого газа из тканей в легкие для выведения из организма. Т. М. С. Чангом с соавторами разработана искусственная клетка, которая представляет собой нанобиотехнологический комплекс полигемоглобин – каталаза – супероксиддисмутаза – карбоангидраза (PolyHb-CAT-SOD-CA), способный выполнять все три функции природных эритроцитов [117–119]. В испытаниях на животных показано, что по ряду параметров она превосходит природные красные клетки крови [120].

Созданы клетки из плазматической мембраны тромбоцитов человека, инкапсулирующей полимерные наночастицы, заключенные в плазматической мембране тромбоцитов человека. Инкапсулированные наночастицы не вызывают активации системы комплемента в аутологичной плазме человека, а также демонстрируют свойства, имитирующие свойства тромбоцитов, такие как избирательная адгезия к поврежденным сосудам человека и грызунов, усиленное связывание с патогенами, прикрепляющимися к тромбоцитам. Многогранный биоинтерфейс, обеспечиваемый методом маскировки тромбоцитарной мембраной, обуславливает новый подход к разработке функциональных наночастиц для целенаправленной доставки лекарств к очагу заболевания [121]. Имеются сообщения о получении искусственных клеток с использованием полимеров и PLGA-пептидных сополимеров, обладающих гемостатическими свойствами [122; 123].

В 2019 г. сконструированы клетки, имитирующие нейтрофилы [124]. Супернейтрофилы, как их называют авторы, изготавливаются путем встраивания глюкозооксидазы и хлорпероксидазы в MOF (тип ZIF-8) для образования хлорноватистой кислоты (НСlO) посредством ферментативных каскадов, а затем инкапсулируются в природную нейтрофильную мембрану для нацеливания в область воспаления. Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* показали, что эти искусственные нейтрофилы могут генерировать в 7 раз более реактивную HClO, чем естественные нейтрофилы, в области опухолей и инфекций.

В 2021 г. был изготовлен искусственный макрофаг AM2M из мембраны макрофагов в качестве оболочки и наногеля, приготовленного из желатина и хондроитинсульфата (ХС). Испытания на мышах показали, что макрофаги AM2M более эффективны для лечения остеоартроза, чем макрофаги M2. Искусственная клетка обеспечивала резкое высвобождение содержимого для снижения воспаления во время острых вспышек остеоартроза и устойчивое высвобождение содержимого для восстановления хряща в период низкой воспалительной активности. Кроме того, наблюдались нацеливание макрофагов AM2M в воспаленную область и длительное пребывание в ней, а также блокирование иммунной стимуляции макрофагов ХС [125]. Данная работа представляет собой основу для интенсивной разработки систем доставки лекарств с контролируемым высвобождением.

Ферментная и генная терапия. Ферменты, инкапсулированные в искусственных клетках, действуют на субстраты, проникающие внутрь клетки, что позволяет избегать аллергических реакций и образования антител [3; 126–128]. С 1964 г. группа ученых во главе с Т. М. С. Чангом опубликовала ряд работ по ферментной терапии с использованием искусственных клеток [5; 127–129]. Показана эффективность РЕГ-аспарагиназы при лечении лейкемии [130]. Установлено, что аргиназа, инкапсулированная в мембраны эритроцитов мышей, успешно снижает уровень аргиназы в крови [131]. Биodeградируемые искусственные клетки, которые представляют собой полилактидные нанокапсулы, содержащие нанобиотехнологический комплекс полигемоглобин – тирозиназа, проникали в клетки меланомы и уменьшали количество тирозина, что приводило к ингибированию роста опухоли, подавлению миграции опухолевых клеток и колонизации ими высокозлокачественной клеточной линии В16F10 [132]. Инкапсуляция L-метионин-лиазы в мембраны человеческих эритроцитов позволила элиминировать специфические аминокислоты в межклеточной жидкости, что обеспечило цитотоксический эффект для клеток различных злокачественных опухолей, но не для нормальных клеток [133]. Приведенные выше данные являются серьезным доводом в пользу ферментной терапии злокачественных опухолей.

С использованием искусственных клеток также были созданы лекарственные средства для перорального введения. Проведенные клинические испытания показали, что при пероральном введении искусственные клетки, содержащие уреазу и адсорбент аммония, уменьшают системный уровень мочевины [134], а клетки, содержащие ксантиноксидазу, – системный уровень токсического гипоксантина при синдроме Леша – Найхана у подростков [135]. Имеются сообщения об успешно проведенных на крысах и мышах испытаниях по пероральному введению искусственных клеток, инкапсулирующих L-фенилаланин-аммоний-лиазу, при фенилкетонурии [136; 137]. Клетки из полимера на основе поли(D,L-лактид-кокапролактона) обладали высокой эффективностью инкапсуляции лизоцима и дезоксирибонуклеазы в желудочном и кишечном соке [138].

Проведено значительное количество испытаний по ферментной терапии с использованием искусственных клеток. В частности, искусственные клетки с аспарагиназой показали многообещающие

результаты в третьей фазе клинических испытаний и могут применяться в комбинации с химиотерапией при онкологии. Продолжается вторая фаза клинических испытаний искусственных клеток с тимидин-фосфорилазой для лечения митохондриальной нейрогастроинтестинальной энцефаломиопатии. Клетки с алкогольоксидазой прошли доклинические испытания по снятию алкогольной токсикации [139–141].

Потенциальная стратегия генной терапии с применением клеток *bottom-up* основана на способности данных клеток инкапсулировать ДНК, в том числе большого размера [142]. Имеются сообщения об инкапсуляции экзосомально-липосомальными мембранами плазмиды экспрессии компонентов CRISPR-Cas9, доставке такой плазмиды в мезенхимальные клетки костного мозга [143]. Искусственные клетки из мембран опухолевых клеток, инкапсулирующие ДНК и гистон, показали высокую биосовместимость и способность к трансфекции генов *in vitro* и *in vivo*, обладали свойствами ухода от иммунного ответа и гомологичного нацеливания (таргетинга), характерного для исходных опухолевых клеток, что делает искусственные клетки перспективным средством для применения в генной терапии [144].

Инкапсулирование природных клеток. Эндокринные клетки, инкапсулированные в искусственные клетки, не уничтожаются иммунной системой и эффективно сохраняют гормоны [5]. В 1964 г. Т. М. С. Чанг синтезировал искусственную клетку, инкапсулирующую природные клетки [3]. Стабильные микрокапсулы диаметром от 1 до 100 мкм с полупроницаемыми мембранами были изготовлены путем осаждения полимера вокруг эмульгированных капель воды либо посредством межфазной коацервации, либо посредством межфазной поликонденсации. Данный метод в дальнейшем получил широкое распространение в клеточной терапии [7; 36; 126; 131; 145–147], например, для инкапсуляции островков Лангерганса в целях лечения диабета. В настоящее время значительно улучшены долговременная биосовместимость таких искусственных клеток и методы приготовления биоматериалов [148].

В 1996 г. показано, что пероральное введение инкапсулированных генно-модифицированных клеток *E. coli* снижает уровень мочевины в крови у крыс с почечной недостаточностью [149]. В дальнейшем были проведены обширные исследования по клиническому применению данного метода при метаболическом синдроме [150]. Интраперитонеальная трансплантация инкапсулированных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга полностью восстанавливала печень у крыс после 90 % гепатэктомии [151]. Перспективным направлением также является разработка технологии посева инкапсулированных искусственных клеток для роста в биоразлагаемых каркасах, имитирующих ткани или органы [152].

Иммунотерапия. Потенциальные производительность, надежность и структурная стабильность искусственных клеток стимулируют исследования по их применению в иммунотерапии [34]. Искусственные клетки могут быть спроектированы так, чтобы избежать сигналов ингибирования от клеток иммунной системы организма, при этом они не потребляют кислород и питательные вещества, не подвергаются дифференцировке и длительно циркулируют. Кроме того, искусственные клетки способны маскироваться под клетки организма за счет экспрессии природных пептидных антигенов, что снижает их фагоцитоз и разрушение [153]. Например, искусственные клетки на основе полимера в сочетании с пептидомиметиком для CD47 меньше захватывались макрофагами, дольше циркулировали, обладали повышенной таргентностью к опухолям по сравнению с теми же клетками без пептидомиметика для CD47 [154].

Решающую роль в развитии различных иммунных заболеваний и иммунотерапии играют Т-клетки. Экспансия Т-клеток в некоторые типы Т-клеток может определять эффективность иммунотерапии. В иммунотерапии рака популяции цитотоксических Т-клеток (CD8⁺-Т-клетки) играют незаменимую роль в очистке и уничтожении опухолевых клеток [155; 156]. Искусственные антигенпрезентирующие клетки (aAPCs) могут стимулировать активацию CD8⁺-Т-клеток. Отмечено, что aAPCs из биodeградируемых полимеров и миметиков молекул главного комплекса гистосовместимости с костимуляторными молекулами на поверхности (такими как CD28) [157] взаимодействовали с Т-клетками и пептидными антигенами, имитируя природные антигенпрезентирующие клетки, различая сигналы патогена и передавая их многим эффекторным клеткам вместе с биологическими регуляторными сигналами. Показано, что aAPCs амплифицируют CD8⁺-Т-клетки *in vitro* и *in vivo*, и они направляют иммунную систему против специфических раковых антигенов в мышечных моделях меланомы. В 2019 г. сконструированы эллипсоидные aAPCs из пегелированных сополимерных материалов и CD47 [158], которые значительно стимулировали некроз опухолей CD8⁺-Т-клетками у мышей с меланомой *in vitro* и *in vivo*.

В 2020 г. предложен обобщенный подход к активации CD8⁺-Т-клеток на основе применения в иммунотерапии *in vivo* трансформируемых по размеру aAPCs в сочетании с нанотехнологиями. Разработана нановакцина для антигенспецифической предварительной активации CD8⁺-Т-клеток *in vivo* с последующей дополнительной реактивацией CD8⁺-Т-клеток с помощью наноразмерных aAPCs (naAPCs), способных трансформироваться по размеру. Для этого были сконструированы naAPCs из редокс-чувствительных сополимеров, нагруженных главным комплексом гистосовместимости и CD28 на поверхности, инкапсулирующие интерлейкин-2. Хотя naAPCs имеют лучший профиль безопасности, чем микроразмерные aAPCs (maAPCs), они обычно вызывают более слабый ответ Т-клеток. В опухолевой ткани при встрече

с предварительно активированными CD8⁺-Т-клетками с высоким поверхностным окислительно-восстановительным потенциалом наAPCs преобразовывались в naAPCs. Комбинация naAPCs с нановакциной обладала впечатляющей противоопухолевой эффективностью *in vivo* [159].

В иммунотерапии стимуляция Т-клеток *ex vivo* требует значительных ресурсов и усилий. В работе [156] использовали созданный ранее миметик дендритных клеток, который может стимулировать Т-клетки к пролиферации до CD8⁺-Т-клеток и убивать опухолевые клетки *ex vivo* и *in vivo*. Для имитации дендритных клеток сконструированы искусственные дендритные микроцветки (DM) на основе ДНК, поверхность которых была покрыта полидофамином и дополнительно модифицирована антителами против CD3 и CD28 в целях получения модифицированного антителами DM (DM-A). Пористая структура DM-A позволяла захватывать цитокин, стимулирующий Т-клетки, а также интерлейкин-2 с образованием DM-A, нагруженного интерлейкином-2 (DM-AI). Применение DM-AI в исследованиях на мышцах предотвращало рост отдаленных опухолей и обеспечивало полную выживаемость животных, инокулированных опухолевыми клетками. Эту концепцию можно широко распространить на программирование специфических профилей стимуляции Т-клеток.

В целом aAPCs создаются путем интеграции лигандов рецепторов Т-клеток (TCR) (например, пептида главного комплекса гистосовместимости (pMHC) и антител против CD3) и костимулирующих лигандов (например, антител против CD28 и 4-1BBL) на поверхности биосовместимых материалов, включая липосомы, экзосомы, полимеры, магнитные микробусины и микростержни из мезопористого кремния. Недавно были созданы naAPCs на основе двумерных каркасов ДНК-оригами. Костимулирующие лиганды (антитела против CD28 с фиксированной валентностью (три копии)) были закреплены в трех вершинах треугольного каркаса, а лиганды TCR (pMHC) – на трех краях с различной плотностью. Существенно, что созданный каркас из ДНК-оригами позволяет проводить количественный анализ взаимодействий лиганд – рецептор при активации Т-клеток с разрешением в одну частицу, одну молекулу с применением флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (*total internal reflection fluorescence*, TIRF). Установлено, что при увеличении плотности pMHC продолжительность pMHC-TCR-связывания возрастает с 9,9 до 12,1 с, что приводит к функциональным ответам Т-клеток. Показано, что сконструированные naAPCs демонстрируют эффективную способность ингибировать рост модельной меланомы мышей как *in vitro*, так и *in vivo* при адоптивной иммунотерапии [160].

Кроме вышеупомянутых, опубликовано много работ по конструированию и применению искусственных клеток в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, аквакультуре, косметологии, нанолaborаторных и нанокomпьютерных технологиях [161; 162].

Заключение

В последние 20 лет многие оригинальные идеи Т. М. С. Чанга об искусственных клетках как биотехнологических устройствах для имитации и дополнения параметров природных клеток все чаще применяются и расширяются исследователями по всему миру. Существует тенденция к тому, что новое развитие и дополнение понятия «искусственные клетки» скрываются под многочисленными названиями: «наночастицы», «нанотрубочки», «липидные везикулы», «липосомы», «полимерсвязанные липиды», «полимеросомы», «микрокапсулы», «биокапсулы», «нанокapсулы», «наносенсоры», «макроинкапсуляция», «полигемоглобин», «конъюгированный гемоглобин» и т. д. С термином «искусственная клетка» ассоциируются разнообразные направления, такие как наномедицина, биотерапия, создание заменителей крови, доставка лекарств, ферментная и генная терапия, онкотерапия, клеточная терапия, в том числе терапия с применением стволовых клеток, биосорбент-иммуносорбентная гемоперфузия и плазмаферез, регенеративная медицина, капсулирование микробов, нанобиотехнологии, нанотехнологии и др. Более футуристические направления представлены созданием нанороботов, нанокomпьютеров, мультимодальных роботов-доставщиков и др. Исследования в области искусственной клетки являются междисциплинарными, и их объединение может обеспечить прогресс, превосходящий чье-либо воображение [163].

Библиографические ссылки/References

1. Hooke R. *Micrographia: or Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon* [Internet]. London: John Martyn and James Allefry; 1665 [cited 2023 April 17]. 246, [46] p. Available from: <https://collections.nlm.nih.gov/catalog/nlm:nlmuid-2366075R-bk>.
2. Schwann T. *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen* [Internet]. Berlin: Verlag der Sander'schen Buchhandlung (G. E. Reimer); 1839 [cited 2023 April 17]. XVIII, 270 S. Available from: <https://wellcomecollection.org/works/bknnmj2k>. German.
3. Chang TMS. Semipermeable microcapsules. *Science*. 1964;146(3643):524–525. DOI: 10.1126/science.146.3643.524.
4. Chang TMS. *Hemoglobin corpuscles. Report of research project for BSc honours physiology*. Montreal: McGill University; 1957. 25 p.

5. Chang TMS. *Artificial cells* [Internet]. Springfield: Charles C. Thomas; 1972 [cited 2023 April 19]. XIV, 207 p. Available from: <http://www.medicine.mcgill.ca/artcell/1972bookCovercr.pdf>.
6. Chang TMS. Artificial cells for cell and organ replacements. *Artificial Organs*. 2004;28(3):265–270. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2004.47343.x.
7. Chang TMS. 50th anniversary of artificial cells: their role in biotechnology, nanomedicine, regenerative medicine, blood substitutes, bioencapsulation, cell / stem cell therapy and nanorobotics. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 2007;35(6):545–554. DOI: 10.1080/10731190701730172.
8. Chang TMS. The role of artificial cells in the fight against COVID-19: deliver vaccine, hemoperfusion removes toxic cytokines, nanobiotherapeutics lower free radicals and pCO₂ and replenish blood supply. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2022;50(1):240–251. DOI: 10.1080/21691401.2022.2126491.
9. Schwille P. How simple could life be? *Angewandte Chemie International Edition*. 2017;56(37):10998–11002. DOI: 10.1002/anie.201700665.
10. Elani Y. Interfacing living and synthetic cells as an emerging frontier in synthetic biology. *Angewandte Chemie International Edition*. 2021;60(11):5602–5611. DOI: 10.1002/anie.202006941.
11. Gánti T. *The principles of life* [Internet]. Griesemer J, Szathmáry E, editors. Oxford: Oxford University Press; 2003 [cited 2023 April 20]. XVIII, 201 p. Available from: https://www.chemoton.com/images/pdf/GantiTiborEletmu_22.pdf.
12. Göpflich K, Platzman I, Spatz JP. Mastering complexity: towards bottom-up construction of multifunctional eukaryotic synthetic cells. *Trends in Biotechnology*. 2018;36(9):938–951. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.03.008.
13. Pohorille A, Deamer D. Artificial cells: prospects for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2002;20(3):123–128. DOI: 10.1016/S0167-7799(02)01909-1.
14. Szostak JW, Bartel DP, Luisi PL. Synthesizing life. *Nature*. 2001;409(6818):387–390. DOI: 10.1038/35053176.
15. Saraniti M. Designing biomimetic nanomachines. *Nature Nanotechnology*. 2008;3(11):647–648. DOI: 10.1038/nnano.2008.327.
16. Xu C, Hu S, Chen X. Artificial cells: from basic science to applications. *Materials Today*. 2016;19(9):516–532. DOI: 10.1016/j.mattod.2016.02.020.
17. Jiang W, Wu Z, Gao Z, Wan M, Zhou M, Mao C, et al. Artificial cells: past, present and future. *ACS Nano*. 2022;16(10):15705–15733. DOI: 10.1021/acsnano.2c06104.
18. Lindblad P, Lindberg P, Oliveira P, Stensjö K, Heidorn T. Design, engineering, and construction of photosynthetic microbial cell factories for renewable solar fuel production. *Ambio*. 2012;41(supplement 2):163–168. DOI: 10.1007/s13280-012-0274-5.
19. Venter JC, Glass JI, Hutchison CA 3rd, Vashee S. Synthetic chromosomes, genomes, viruses, and cells. *Cell*. 2022;185(15):2708–2724. DOI: 10.1016/j.cell.2022.06.046.
20. Buddingh' BC, van Hest JCM. Artificial cells: synthetic compartments with life-like functionality and adaptivity. *Accounts of Chemical Research*. 2017;50(4):769–777. DOI: 10.1021/acs.accounts.6b00512.
21. Zhao N, Chen Y, Chen G, Xiao Z. Artificial cells based on DNA nanotechnology. *ACS Applied Bio Materials*. 2020;3(7):3928–3934. DOI: 10.1021/acsbam.0c00149.
22. Jelinek R, Kolusheva S. Membrane interactions of host-defense peptides studied in model systems. *Current Protein and Peptide Science*. 2005;6(1):103–114. DOI: 10.2174/1389203053027511.
23. Nuti N, Verboket PE, Dittrich PS. Multivesicular droplets: a cell model system to study compartmentalised biochemical reactions. *Lab on a Chip*. 2017;17(18):3112–3119. DOI: 10.1039/c7lc00710h.
24. Bingham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*. 1964;8(5):660–668. DOI: 10.1016/S0022-2836(64)80115-7.
25. Xu R, Simpson RJ, Greening DW. A protocol for isolation and proteomic characterization of distinct extracellular vesicle subtypes by sequential centrifugal ultrafiltration. In: Hill AF, editor. *Exosomes and microvesicles: methods and protocols*. New York: Humana Press; 2017. p. 91–116 (Walker JM, editor. Methods in molecular biology; volume 1545). DOI: 10.1007/978-1-4939-6728-5_7.
26. Martino C, deMello AJ. Droplet-based microfluidics for artificial cell generation: a brief review. *Interface Focus*. 2016;6(4):20160011. DOI: 10.1098/rsfs.2016.0011.
27. Kamiya K. Development of artificial cell models using microfluidic technology and synthetic biology. *Micromachines*. 2020;11(6):559. DOI: 10.3390/mi11060559.
28. Noireaux V, Libchaber A. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *PNAS*. 2004;101(51):17669–17674. DOI: 10.1073/pnas.0408236101.
29. Elani Y, Law RV, Ces O. Vesicle-based artificial cells as chemical microreactors with spatially segregated reaction pathways. *Nature Communications*. 2014;5:5305. DOI: 10.1038/ncomms6305.
30. Gardner PM, Winzer K, Davis BG. Sugar synthesis in a protocellular model leads to a cell signalling response in bacteria. *Nature Chemistry*. 2009;1(5):377–383. DOI: 10.1038/nchem.296.
31. Lentini R, Perez Santero S, Chizzolini F, Cecchi D, Fontana J, Marchioretto M, et al. Integrating artificial with natural cells to translate chemical messages that direct *E. coli* behaviour. *Nature Communications*. 2014;5:4012. DOI: 10.1038/ncomms5012.
32. Adamala K, Szostak JW. Competition between model protocells driven by an encapsulated catalyst. *Nature Chemistry*. 2013;5(6):495–501. DOI: 10.1038/nchem.1650. Erratum in: *Nature Chemistry*. 2013;5(7):634. DOI: 10.1038/nchem.1700.
33. Lee KY, Park S-J, Lee KA, Kim S-H, Kim H, Meroz Y, et al. Photosynthetic artificial organelles sustain and control ATP-dependent reactions in a protocellular system. *Nature Biotechnology*. 2018;36(6):530–535. DOI: 10.1038/nbt.4140.
34. Green JJ, Elisseff JH. Mimicking biological functionality with polymers for biomedical applications. *Nature*. 2016;540(7633):386–394. DOI: 10.1038/nature21005.
35. Discher DE, Eisenberg A. Polymer vesicles. *Science*. 2002;297(5583):967–973. DOI: 10.1126/science.1074972.
36. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*. 1980;210(4472):908–910. DOI: 10.1126/science.6776628.
37. O'Shea GM, Sun AM. Encapsulation of rat islets of Langerhans prolongs xenograft survival in diabetic mice. *Diabetes*. 1986;35(8):943–946. DOI: 10.2337/diab.35.8.943.
38. Tanner P, Baumann P, Enea R, Onaca O, Palivan C, Meier W. Polymeric vesicles: from drug carriers to nanoreactors and artificial organelles. *Accounts of Chemical Research*. 2011;44(10):1039–1049. DOI: 10.1021/ar200036k.
39. Martino C, Kim S-H, Horsfall L, Abbaspourrad A, Rosser SJ, Cooper J, et al. Protein expression, aggregation, and triggered release from polymersomes as artificial cell-like structures. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012;51(26):6416–6420. DOI: 10.1002/anie.201201443.

40. Tamate R, Ueki T, Yoshida R. Self-beating artificial cells: design of cross-linked polymersomes showing self-oscillating motion. *Advanced Materials*. 2015;27(5):837–842. DOI: 10.1002/adma.201404757.
41. Palivan CG, Goers R, Najer A, Zhang X, Car A, Meier W. Bioinspired polymer vesicles and membranes for biological and medical applications. *Chemical Society Reviews*. 2016;45(2):377–411. DOI: 10.1039/c5cs00569h.
42. Le Meins J-F, Schatz C, Lecommandoux S, Sandre O. Hybrid polymer/lipid vesicles: state of the art and future perspectives. *Materials Today*. 2013;16(10):397–402. DOI: 10.1016/j.mattod.2013.09.002. Erratum in: *Materials Today*. 2014;17(2):92–93. DOI: 10.1016/j.mattod.2014.01.003.
43. Chemin M, Brun P-M, Lecommandoux S, Sandre O, Le Meins J-F. Hybrid polymer/lipid vesicles: fine control of the lipid and polymer distribution in the binary membrane. *Soft Matter*. 2012;8(10):2867–2874. DOI: 10.1039/c2sm07188f.
44. Khan S, McCabe J, Hill K, Beales PA. Biodegradable hybrid block copolymer – lipid vesicles as potential drug delivery systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2020;562:418–428. DOI: 10.1016/j.jcis.2019.11.101.
45. Huang X, Li M, Green DC, Williams DS, Patil AJ, Mann S. Interfacial assembly of protein – polymer nano-conjugates into stimulus-responsive biomimetic protocells. *Nature Communications*. 2013;4:2239. DOI: 10.1038/ncomms3239.
46. Li M, Green DC, Anderson JLR, Binks BP, Mann S. *In vitro* gene expression and enzyme catalysis in bio-inorganic protocells. *Chemical Science*. 2011;2(9):1739–1745. DOI: 10.1039/c1sc00183c.
47. Dinsmore AD, Hsu MF, Nikolaidis MG, Marquez M, Bausch AR, Weitz DA. Colloidosomes: selectively permeable capsules composed of colloidal particles. *Science*. 2002;298(5595):1006–1009. DOI: 10.1126/science.1074868.
48. Binks BP, Murakami R. Phase inversion of particle-stabilized materials from foams to dry water. *Nature Materials*. 2006;5(11):865–869. DOI: 10.1038/nmat1757.
49. Subramaniam AB, Wan J, Gopinath A, Stone HA. Semi-permeable vesicles composed of natural clay. *Soft Matter*. 2011;7(6):2600–2612. DOI: 10.1039/c0sm01354d.
50. Wang C, Liu H, Gao Q, Liu X, Tong Z. Facile fabrication of hybrid colloidosomes with alginate gel cores and shells of porous CaCO₃ microparticles. *ChemPhysChem*. 2007;8(8):1157–1160. DOI: 10.1002/cphc.200700147.
51. He Y, Wu F, Sun X, Li R, Guo Y, Li C, et al. Factors that affect Pickering emulsions stabilized by graphene oxide. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2013;5(11):4843–4855. DOI: 10.1021/am400582n.
52. Bachinger A, Kickelbick G. Pickering emulsions stabilized by anatase nanoparticles. *Monatshfte für Chemie – Chemical Monthly*. 2010;141(6):685–690. DOI: 10.1007/s00706-010-0273-9.
53. Zhou J, Wang L, Qiao X, Binks BP, Sun K. Pickering emulsions stabilized by surface-modified Fe₃O₄ nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012;367(1):213–224. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.11.001.
54. He J, Liu Y, Babu T, Wei Z, Nie Z. Self-assembly of inorganic nanoparticle vesicles and tubules driven by tethered linear block copolymers. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(28):11342–11345. DOI: 10.1021/ja3032295.
55. Fasciano S, Wang S. Recent advances of droplet-based microfluidics for engineering artificial cells. *SLAS Technology*. Forthcoming 2024. DOI: 10.1016/j.slast.2023.05.002.
56. Huo C, Li M, Huang X, Yang H, Mann S. Membrane engineering of colloidosome microcompartments using partially hydrophobic mesoporous silica nanoparticles. *Langmuir*. 2014;30(50):15047–15052. DOI: 10.1021/la503958d.
57. Tamate R, Ueki T, Yoshida R. Evolved colloidosomes undergoing cell-like autonomous shape oscillations with buckling. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016;55(17):5179–5183. DOI: 10.1002/anie.201511871.
58. Li M, Huang X, Mann S. Spontaneous growth and division in self-reproducing inorganic colloidosomes. *Small*. 2014;10(16):3291–3298. DOI: 10.1002/smlf.201400639.
59. Rodríguez-Arco L, Li M, Mann S. Phagocytosis-inspired behaviour in synthetic protocell communities of compartmentalized colloidal objects. *Nature Materials*. 2017;16(8):857–863. DOI: 10.1038/nmat4916.
60. Liu J, Guo Z, Liang K. Biocatalytic metal-organic framework-based artificial cells. *Advanced Functional Materials*. 2019;29(45):1905321. DOI: 10.1002/adfm.201905321.
61. Furukawa H, Ko N, Go YB, Aratani N, Choi SB, Choi E, et al. Ultrahigh porosity in metal-organic frameworks. *Science*. 2010;329(5990):424–428. DOI: 10.1126/science.1192160.
62. Furukawa H, Cordova KE, O’Keeffe M, Yaghi OM. The chemistry and applications of metal-organic frameworks. *Science*. 2013;341(6149):1230444. DOI: 10.1126/science.1230444.
63. Zuo Q, Liu T, Chen C, Ji Y, Gong X, Mai Y, et al. Ultrathin metal – organic framework nanosheets with ultrahigh loading of single Pt atoms for efficient visible-light-driven photocatalytic H₂ evolution. *Angewandte Chemie International Edition*. 2019;58(30):10198–10203. DOI: 10.1002/anie.201904058.
64. Liu J, Xue J, Fu L, Xu J, Lord MS, Liang K. Genetically encoded synthetic beta cells for insulin biosynthesis and release under hyperglycemic conditions. *Advanced Functional Materials*. 2022;32(18):2111271. DOI: 10.1002/adfm.202111271.
65. Liu Q, Bi C, Li J, Liu X, Peng R, Jin C, et al. Generating giant membrane vesicles from live cells with preserved cellular properties. *Research*. 2019;2019:6523970. DOI: 10.34133/2019/6523970.
66. Brangwynne CP. Phase transitions and size scaling of membrane-less organelles. *Journal of Cell Biology*. 2013;203(6):875–881. DOI: 10.1083/jcb.201308087.
67. Banani SF, Lee HO, Hyman AA, Rosen MK. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2017;18(5):285–298. DOI: 10.1038/nrm.2017.7.
68. Xu C, Martin N, Li M, Mann S. Living material assembly of bacteriogenic protocells. *Nature*. 2022;609(7929):1029–1037. DOI: 10.1038/s41586-022-05223-w.
69. Yewdall NA. Life brought to artificial cells. *Nature*. 2022;609(7929):900–901. DOI: 10.1038/d41586-022-02231-8.
70. Hindley JW, Elani Y, McGilvery CM, Ali S, Bevan CL, Law RV, et al. Light-triggered enzymatic reactions in nested vesicle reactors. *Nature Communications*. 2018;9:1093. DOI: 10.1038/s41467-018-03491-7.
71. Einfalt T, Witzigmann D, Edlinger C, Sieber S, Goers R, Najer A, et al. Biomimetic artificial organelles with *in vitro* and *in vivo* activity triggered by reduction in microenvironment. *Nature Communications*. 2018;9:1127. DOI: 10.1038/s41467-018-03560-x.
72. van Roekel HWH, Rosier BJHM, Meijer LHH, Hilbers PAJ, Markvoort AJ, Huck WTS, et al. Programmable chemical reaction networks: emulating regulatory functions in living cells using a bottom-up approach. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(21):7465–7483. DOI: 10.1039/C5CS00361J.
73. Küchler A, Yoshimoto M, Luginbühl S, Mavelli F, Walde P. Enzymatic reactions in confined environments. *Nature Nanotechnology*. 2016;11(5):409–420. DOI: 10.1038/nnano.2016.54.

74. Yoshimoto M. Stabilization of enzymes through encapsulation in liposomes. In: Minter SD, editor. *Enzyme stabilization and immobilization: methods and protocols*. New York: Humana Press; 2011. p. 9–18 (Walker JM, editor. *Methods in molecular biology*; volume 679). DOI: 10.1007/978-1-60761-895-9_2.
75. Peng R, Xu L, Wang H, Lyu Y, Wang D, Bi C, et al. DNA-based artificial molecular signaling system that mimics basic elements of reception and response. *Nature Communications*. 2020;11:978. DOI: 10.1038/s41467-020-14739-6.
76. Nourian Z, Roelofsen W, Danelon C. Triggered gene expression in fed-vesicle microreactors with a multifunctional membrane. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012;51(13):3114–3118. DOI: 10.1002/anie.201107123.
77. Fischer A, Franco A, Oberholzer T. Giant vesicles as microreactors for enzymatic mRNA synthesis. *ChemBioChem*. 2002;3(5):409–417. DOI: 10.1002/1439-7633(20020503)3:5<409::AID-CBIC409>3.0.CO;2-P.
78. Kurihara K, Tamura M, Shohda K, Toyota T, Suzuki K, Sugawara T. Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA. *Nature Chemistry*. 2011;3(10):775–781. DOI: 10.1038/nchem.1127.
79. van Nies P, Westerlaken I, Blanken D, Salas M, Mencia M, Danelon C. Self-replication of DNA by its encoded proteins in liposome-based synthetic cells. *Nature Communications*. 2018;9:1583. DOI: 10.1038/s41467-018-03926-1.
80. Berhanu S, Ueda T, Kuruma Y. Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis. *Nature Communications*. 2019;10:1325. DOI: 10.1038/s41467-019-09147-4.
81. Albanese P, Mavelli F, Altamura E. Light energy transduction in liposome-based artificial cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;11:1161730. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1161730.
82. Robson Marsden H, Elbers NA, Bomans PHH, Sommerdijk NAJM, Kros A. A reduced SNARE model for membrane fusion. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009;48(13):2330–2333. DOI: 10.1002/anie.200804493.
83. Chan YM, van Lengerich B, Boxer SG. Effects of linker sequences on vesicle fusion mediated by lipid-anchored DNA oligonucleotides. *PNAS*. 2009;106(4):979–984. DOI: 10.1073/pnas.0812356106.
84. Li-Beisson Y, Neunzig J, Lee Y, Philippar K. Plant membrane-protein mediated intracellular traffic of fatty acids and acyl lipids. *Current Opinion in Plant Biology*. 2017;40:138–146. DOI: 10.1016/j.pbi.2017.09.006.
85. Buzon V, Natrajan G, Schibli D, Campelo F, Kozlov MM, Weissenhorn W. Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. *PLoS Pathogens*. 2010;6(5):e1000880. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000880.
86. Harrison SC. Viral membrane fusion. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2008;15(7):690–698. DOI: 10.1038/nsmb.1456.
87. Di Iorio D, Lu Y, Meulman J, Huskens J. Recruitment of receptors at supported lipid bilayers promoted by the multivalent binding of ligand-modified unilamellar vesicles. *Chemical Science*. 2020;11(12):3307–3315. DOI: 10.1039/d0sc00518e.
88. Lu Y, Huskens J, Pang W, Duan X. Hypersonic poration of supported lipid bilayers. *Materials Chemistry Frontiers*. 2019;3(5):782–790. DOI: 10.1039/c8qm00589c.
89. Xu Z, Hueckel T, Irvine WTM, Sacanna S. Transmembrane transport in inorganic colloidal cell-mimics. *Nature*. 2021;597(7875):220–224. DOI: 10.1038/s41586-021-03774-y.
90. Liu S, Zhang Y, Li M, Xiong L, Zhang Z, Yang X, et al. Enzyme-mediated nitric oxide production in vasoactive erythrocyte membrane-enclosed coacervate protocells. *Nature Chemistry*. 2020;12(12):1165–1173. DOI: 10.1038/s41557-020-00585-y.
91. Sun S, Li M, Dong F, Wang S, Tian L, Mann S. Chemical signaling and functional activation in colloidosome-based protocells. *Small*. 2016;12(14):1920–1927. DOI: 10.1002/sml.201600243.
92. Bolognesi G, Friddin MS, Salehi-Reyhani A, Barlow NE, Brooks NJ, Ces O, et al. Sculpting and fusing biomimetic vesicle networks using optical tweezers. *Nature Communications*. 2018;9:1882. DOI: 10.1038/s41467-018-04282-w.
93. Yang Q, Guo Z, Liu H, Peng R, Xu L, Bi C, et al. A cascade signaling network between artificial cells switching activity of synthetic transmembrane channels. *Journal of the American Chemical Society*. 2021;143(1):232–240. DOI: 10.1021/jacs.0c09558.
94. Sogaard AB, Pedersen AB, Løvschall KB, Monge P, Jakobsen JH, Džabbarova L, et al. Transmembrane signaling by a synthetic receptor in artificial cells. *Nature Communications*. 2023;14:1646. DOI: 10.1038/s41467-023-37393-0.
95. Stano P. A four-track perspective for bottom-up synthetic cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:1029446. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1029446.
96. Diltemiz SE, Ertas YN, Contag CH, Ashammakhi N. Drug delivery by artificial cells. *The Journal of Craniofacial Surgery*. 2023;34(1):9–10. DOI: 10.1097/scs.00000000000008897.
97. Gregoriadis G, editor. *Drug carriers in biology and medicine*. London: Academic Press; 1979. XVIII, 363 p.
98. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2005;4(2):145–160. DOI: 10.1038/nrd1632.
99. Chang TMS. Biodegradable semipermeable microcapsules containing enzymes, hormones, vaccines, and other biologicals. *Journal of Bioengineering*. 1976;1(1):25–32. PMID: 1052520.
100. McDaid WJ, Lissin N, Pollheimer E, Greene M, Leach A, Smyth P, et al. Enhanced target-specific delivery of docetaxel-loaded nanoparticles using engineered T cell receptors. *Nanoscale*. 2021;13(35):15010–15020. DOI: 10.1039/d1nr04001d.
101. Chang TMS. Semipermeable aqueous microcapsules («artificial cells»): with emphasis on experiments in an extracorporeal shunt system. *Transactions – American Society for Artificial Internal Organs*. 1966;12:13–19.
102. Fathi Karkan S, Mohammadhosseini M, Panahi Y, Milani M, Zarghami N, Akbarzadeh A, et al. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis and treatment: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2017;45(1):1–5. DOI: 10.3109/21691401.2016.1153483.
103. Lv Q, Cheng L, Lu Y, Zhang X, Wang Y, Deng J, et al. Thermosensitive exosome – liposome hybrid nanoparticle-mediated chemoimmunotherapy for improved treatment of metastatic peritoneal cancer. *Advanced Science*. 2020;7(18):2000515. DOI: 10.1002/adv.202000515.
104. Qiao B, Luo Y, Cheng H-B, Ren J, Cao J, Yang C, et al. Artificial nanotargeted cells with stable photothermal performance for multimodal imaging-guided tumor-specific therapy. *ACS Nano*. 2020;14(10):12652–12667. DOI: 10.1021/acsnano.0c00771.
105. Chang TMS. Red blood cell replacement, or nanobiotherapeutics with enhanced red blood cell functions? *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2015;43(3):145–147. DOI: 10.3109/21691401.2015.1047557.
106. Winslow RM, editor. *Blood substitutes*. Amsterdam: Academic Press; 2006. XX, 548 p. DOI: 10.1016/b978-0-12-759760-7.x5000-8.
107. Moore EE, Moore FA, Fabian TC, Bernard AC, Fulda GJ, Hoyt DB, et al. Human polymerized hemoglobin for the treatment of hemorrhagic shock when blood is unavailable: the USA multicenter trial. *Journal of the American College of Surgeons*. 2009;208(1):1–13. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2008.09.023.

108. Wang L, Liu F, Yan K, Pan W, Xu L, Liu H, et al. Effects of resuscitation with polymerized porcine hemoglobin (pPolyHb) on hemodynamic stability and oxygen delivery in a rat model of hemorrhagic shock. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2017;45(1):51–57. DOI: 10.1080/21691401.2016.1185728.
109. Li Y, Yan D, Hao S, Li S, Zhou W, Wang H, et al. Polymerized human placenta hemoglobin improves resuscitative efficacy of hydroxyethyl starch in a rat model of hemorrhagic shock. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2015;43(3):174–179. DOI: 10.3109/21691401.2015.1024846.
110. Kim HW, Greenburg AG, editors. *Hemoglobin-based oxygen carriers as red cell substitutes and oxygen therapeutics*. Heidelberg: Springer; 2013. XXIII, 746 p. DOI: 10.1007/978-3-642-40717-8.
111. Mer M, Hodgson E, Wallis L, Jacobson B, Levien L, Snyman J, et al. Hemoglobin glutamer-250 (bovine) in South Africa: consensus usage guidelines from clinician experts who have treated patients. *Transfusion*. 2016;56(10):2631–2636. DOI: 10.1111/trf.13726.
112. Chang TMS, Bülow L, Jahr J, Sakai H, Yang C, editors. *Nanobiotherapeutic based blood substitutes*. Singapore: World Scientific; 2022. XXXI, 1010 p. (Chang TMS, editor. Regenerative medicine, artificial cells and nanomedicine; volume 6). DOI: 10.1142/12054.
113. Bian Y, Chang TMS. Nanobiotechnological basis of an oxygen carrier with enhanced carbonic anhydrase for CO₂ transport and enhanced catalase and superoxide dismutase for antioxidant function. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;11:1188399. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1188399.
114. Chang TMS. Stabilisation of enzymes by microencapsulation with a concentrated protein solution or by microencapsulation followed by cross-linking with glutaraldehyde. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1971;44(6):1531–1536. DOI: 10.1016/s0006-291x(71)80260-7.
115. Muller CR, Williams AT, Walser C, Eaker AM, Sandoval JL, Cuddington CT, et al. Safety and efficacy of human polymerized hemoglobin on guinea pig resuscitation from hemorrhagic shock. *Scientific Reports*. 2022;12:20480. DOI: 10.1038/s41598-022-23926-y.
116. Muller CR, Williams AT, Munoz CJ, Eaker AM, Breton AN, Palmer AF, et al. Safety profile of high molecular weight polymerized hemoglobins. *Transfusion*. 2021;61(1):212–224. DOI: 10.1111/trf.16157.
117. Bian Y, Chang TMS. A novel nanobiotherapeutic poly-[hemoglobin – superoxide dismutase – catalase – carbonic anhydrase] with no cardiac toxicity for the resuscitation of a rat model with 90 minutes of sustained severe hemorrhagic shock with loss of 2/3 blood volume. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2015;43(1):1–9. DOI: 10.3109/21691401.2014.964554.
118. Guo C, Gynn M, Chang TMS. Extraction of superoxide dismutase, catalase, and carbonic anhydrase from stroma-free red blood cell hemolysate for the preparation of the nanobiotechnological complex of polyhemoglobin – superoxide dismutase – catalase – carbonic anhydrase. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2015;43(3):157–162. DOI: 10.3109/21691401.2015.1035479.
119. Guo C, Chang TMS. Long term safety and immunological effects of a nanobiotherapeutic, bovine poly-[hemoglobin – catalase – superoxide dismutase – carbonic anhydrase], after four weekly 5 % blood volume top-loading followed by a challenge of 30 % exchange transfusion. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2018;46(7):1349–1363. DOI: 10.1080/21691401.2018.1476375.
120. Bian YZ, Guo C, Chang TMS. Temperature stability of poly-[hemoglobin – superoxide dismutase – catalase – carbonic anhydrase] in the form of a solution or in the lyophilized form during storage at –80 °C, 4 °C, 25 °C and 37 °C or pasteurization at 70 °C. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2016;44(1):41–47. DOI: 10.3109/21691401.2015.1110871.
121. Hu CMJ, Fang RH, Wang K-C, Luk BT, Thamphiwatana S, Dehaini D, et al. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature*. 2015;526(7571):118–121. DOI: 10.1038/nature15373.
122. Anselmo AC, Modery-Pawlowski CL, Menegatti S, Kumar S, Vogus DR, Tian LL, et al. Platelet-like nanoparticles: mimicking shape, flexibility, and surface biology of platelets to target vascular injuries. *ACS Nano*. 2014;8(11):11243–11253. DOI: 10.1021/nn503732m.
123. Lashof-Sullivan MM, Shoffstall E, Atkins KT, Keane N, Bir C, VandeVord P, et al. Intravenously administered nanoparticles increase survival following blast trauma. *PNAS*. 2014;111(28):10293–10298. DOI: 10.1073/pnas.1406979111.
124. Zhang C, Zhang L, Wu W, Gao F, Li R-Q, Song W, et al. Artificial super neutrophils for inflammation targeting and HClO generation against tumors and infections. *Advanced Materials*. 2019;31(19):1901179. DOI: 10.1002/adma.201901179.
125. Ma Y, Yang H, Zong X, Wu J, Ji X, Liu W, et al. Artificial M2 macrophages for disease-modifying osteoarthritis therapeutics. *Biomaterials*. 2021;274:120865. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.120865.
126. Chang TMS. Therapeutic applications of polymeric artificial cells. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2005;4(3):221–235. DOI: 10.1038/nrd1659.
127. Chang TMS, Poznansky MJ. Semipermeable microcapsules containing catalase for enzyme replacement in acatalasaemic mice. *Nature*. 1968;218(5138):243–245. DOI: 10.1038/218243a0.
128. Chang TMS. The *in vivo* effects of semipermeable microcapsules containing L-asparaginase on 6C3HED lymphosarcoma. *Nature*. 1971;229(5280):117–118. DOI: 10.1038/229117a0.
129. Poznansky MJ, Chang TMS. Comparison of the enzyme kinetics and immunological properties of catalase immobilized by microencapsulation and catalase in free solution for enzyme replacement. *Biochimica et Biophysica Acta – Enzymology*. 1974;334(1):103–115. DOI: 10.1016/0005-2744(74)90154-5.
130. Wetzler M, Sanford BL, Kurtzberg J, DeOliveira D, Frankel SR, Powell BL, et al. Effective asparagine depletion with pegylated asparaginase results in improved outcomes in adult acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 9511. *Blood*. 2007;109(10):4164–4167. DOI: 10.1182/blood-2006-09-045351.
131. Kaminsky YuG, Kosenko EA. Argocytes containing enzyme nanoparticles reduce toxic concentrations of arginine in the blood. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012;153(3):406–408. DOI: 10.1007/s10517-012-1727-3.
132. Wang Y, Chang TMS. Biodegradable nanocapsules containing a nanobiotechnological complex for the *in vitro* suppression of a melanoma cell line B16F10. *Journal of Nanosciences: Current Research*. 2016;1(1):1000102. DOI: 10.4172/2572-0813.1000102.
133. Machover D, Rossi L, Hamelin J, Desterke C, Goldschmidt E, Chadeaux-Vekemans B, et al. Effects in cancer cells of the recombinant L-methionine gamma-lyase from *Brevibacterium aurantiacum*. Encapsulation in human erythrocytes for sustained L-methionine elimination. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2019;369(3):489–502. DOI: 10.1124/jpet.119.256537.
134. Kjellstrand C, Borges H, Pru C, Gardner D, Fink D. On the clinical use of microencapsulated zirconium phosphate-urease for the treatment of chronic uremia. *Transactions – American Society for Artificial Internal Organs*. 1981;27:24–30.
135. Palmour RM, Goodyer P, Reade T, Chang TMS. Microencapsulated xanthine oxidase as experimental therapy in Lesch – Nyhan disease. *The Lancet*. 1989;334(8664):687–688. DOI: 10.1016/s0140-6736(89)90939-2.

136. Bourget L, Chang TMS. Phenylalanine ammonia-lyase immobilized in microcapsules for the depletion of phenylalanine in plasma in phenylketonuric rat model. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*. 1986;883(3):432–438. DOI: 10.1016/0304-4165(86)90281-3.
137. Sarkissian CN, Kang TS, Gámez A, Scriver CR, Stevens RC. Evaluation of orally administered PEGylated phenylalanine ammonia lyase in mice for the treatment of phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2011;104(3):249–254. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.06.016.
138. Abu Abed OS, Chaw C, Williams L, Elkordy AA. Lysozyme and DNase I loaded poly(D, L-lactide-co-caprolactone) nanocapsules as an oral delivery system. *Scientific Reports*. 2018;8:13158. DOI: 10.1038/s41598-018-31303-x.
139. Rossi L, Pierigè F, Aliano MP, Magnani M. Ongoing developments and clinical progress in drug-loaded red blood cell technologies. *BioDrugs*. 2020;34(3):265–272. DOI: 10.1007/s40259-020-00415-0.
140. Rossi L, Pierigè F, Bregalda A, Magnani M. Preclinical developments of enzyme-loaded red blood cells. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2021;18(1):43–54. DOI: 10.1080/17425247.2020.1822320.
141. de la Fuente M, Lombardero L, Gómez-González A, Solari C, Angulo-Barturen I, Acera A, et al. Enzyme therapy: current challenges and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(17):9181. DOI: 10.3390/ijms22179181.
142. Sato YT, Umezaki K, Sawada S, Mukai S, Sasaki Y, Harada N, et al. Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Scientific Reports*. 2016;6:21933. DOI: 10.1038/srep21933.
143. Gee P, Lung MSY, Okuzaki Y, Sasakawa N, Iguchi T, Makita Y, et al. Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nature Communications*. 2020;11:1334. DOI: 10.1038/s41467-020-14957-y.
144. Zhao X, Tang D, Wu Y, Chen S, Wang C. An artificial cell system for biocompatible gene delivery in cancer therapy. *Nanoscale*. 2020;12(18):10189–10195. DOI: 10.1039/c9nr09131a.
145. Wong H, Chang TMS. Bioartificial liver: implanted artificial cells microencapsulated living hepatocytes increases survival of liver failure rats. *The International Journal of Artificial Organs*. 1986;9(5):335–336. DOI: 10.1177/039139888600900515.
146. Hunkeler D, Rajotte R, Grey D, Morel P, Skjak-Break G, Korbitt G, et al. Bioartificial organ grafts: a view at the beginning of the third millennium. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 2003;31(4):365–382. DOI: 10.1081/bio-120025408.
147. Rokstad AM, Lacík I, de Vos P, Strand BL. Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014;67–68:111–130. DOI: 10.1016/j.addr.2013.07.010.
148. Chang TMS, editor. *Selected topics in nanomedicine*. Singapore: World Scientific; 2014. VIII, 590 p. (Chang TMS, editor. Regenerative medicine, artificial cells and nanomedicine; volume 3). DOI: 10.1142/8776.
149. Prakash S, Chang TMS. Microencapsulated genetically engineered live *E. coli* DH5 cells administered orally to maintain normal plasma urea level in uremic rats. *Nature Medicine*. 1996;2(8):883–887. DOI: 10.1038/nm0896-883.
150. Iqbal UH, Westfall S, Prakash S. Novel microencapsulated probiotic blend for use in metabolic syndrome: design and *in vivo* analysis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2018;46(supplement 3):116–124. DOI: 10.1080/21691401.2018.1489270.
151. Liu ZC, Chang TMS. Artificial cell microencapsulated stem cells in regenerative medicine, tissue engineering and cell therapy. In: Pedraz JL, Orive G, editors. *Therapeutic applications of cell microencapsulation*. New York: Springer Science + Business Media; 2010. p. 68–79 (Back N, Cohen IR, Lajtha A, Lambris JD, Paoletti R, editors. Advances in experimental medicine and biology; volume 670). Co-published by the Landes Bioscience. DOI: 10.1007/978-1-4419-5786-3_7.
152. Grant R, Hay D, Callanan A. From scaffold to structure: the synthetic production of cell derived extracellular matrix for liver tissue engineering. *Biomedical Physics and Engineering Express*. 2018;4(6):065015. DOI: 10.1088/2057-1976/aacbe1.
153. Tsai RK, Rodriguez PL, Discher DE. Self inhibition of phagocytosis: the affinity of «marker of self» CD47 for SIRPα dictates potency of inhibition but only at low expression levels. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2010;45(1):67–74. DOI: 10.1016/j.bcmd.2010.02.016.
154. Rodriguez PL, Harada T, Christian DA, Pantano DA, Tsai RK, Discher DE. Minimal «self» peptides that inhibit phagocytic clearance and enhance delivery of nanoparticles. *Science*. 2013;339(6122):971–975. DOI: 10.1126/science.1229568.
155. Zhang M, Gao S, Yang D, Fang Y, Lin X, Jin X, et al. Influencing factors and strategies of enhancing nanoparticles into tumors *in vivo*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(8):2265–2285. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.03.033.
156. Le Q-V, Lee J, Byun J, Shim G, Oh Y-K. DNA-based artificial dendritic cells for *in situ* cytotoxic T cell stimulation and immunotherapy. *Bioactive Materials*. 2022;15:160–172. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.12.001.
157. Sunshine JC, Perica K, Schneck JP, Green JJ. Particle shape dependence of CD8⁺ T cell activation by artificial antigen presenting cells. *Biomaterials*. 2014;35(1):269–277. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.050.
158. Song S, Jin X, Zhang L, Zhao C, Ding Y, Ang Q, et al. PEGylated and CD47-conjugated nanoellipsoidal artificial antigen-presenting cells minimize phagocytosis and augment anti-tumor T cell responses. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14:2465–2483. DOI: 10.2147/ijn.s195828.
159. Yang W, Deng H, Zhu S, Lau J, Tian R, Wang S, et al. Size-transformable antigen-presenting cell-mimicking nanovesicles potentiate effective cancer immunotherapy. *Science Advances*. 2020;6(50):eabd1631. DOI: 10.1126/sciadv.abd1631.
160. Sun Y, Sun J, Xiao M, Lai W, Li L, Fan C, et al. DNA origami-based artificial antigen-presenting cells for adoptive T cell therapy. *Science Advances*. 2022;8(48):eadd1106. DOI: 10.1126/sciadv.add1106.
161. Dutt Y, Pandey RP, Dutt M, Gupta A, Vibhuti A, Vidic J, et al. Therapeutic applications of nanobiotechnology. *Journal of Nanobiotechnology*. 2023;21:148. DOI: 10.1186/s12951-023-01909-z.
162. Bedau MA, McCaskill JS, Packard NH, Rasmussen S. Living technology: exploiting life's principles in technology. *Artificial Life*. 2010;16(1):89–97. DOI: 10.1162/artl.2009.16.1.16103.
163. Chang TMS. Artificial cell evolves into nanomedicine, biotherapeutics, blood substitutes, drug delivery, enzyme/gene therapy, cancer therapy, cell / stem cell therapy, nanoparticles, liposomes, bioencapsulation, replicating synthetic cells, cell encapsulation/scaffold, biosorbent/immunosorbent haemoperfusion/plasmapheresis, regenerative medicine, encapsulated microbe, nanobiotechnology, nanotechnology. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2019;47(1):997–1013. DOI: 10.1080/21691401.2019.1577885.