

УДК 541(49+64):547.9

ИНТЕРПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ КАК СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В КЛЕТКУ (обзор)

© 1994 г. А. В. Кабанов, В. А. Кабанов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119899 Москва, Ленинские горы

Поступила в редакцию 16.07.93 г.

В обзоре рассмотрены возможности использования интерполиэлектролитных комплексов (ИПЭК) ДНК с линейными поликатионами для доставки генетического материала в клетку. ИПЭК формируются при смешении растворов ДНК и поликатиона за счет образования кооперативной системы межцепенных электростатических связей. Физико-химические характеристики ИПЭК, в частности его растворимость, размер и поверхностный заряд, существенно зависят от состава ф, т.е. осново-мольного соотношения поликатиона : ДНК в комплексе. Включение в ИПЭК приводит к значительному изменению свойств ДНК, в том числе ее компактизации и стабилизации против расщепления нуклеазами. На примере системы трансформации клеток *B. subtilis* показано, что включение плазмиды в ИПЭК с карбоцепными поликатионами существенно усиливает ее трансформирующую активность. Показана способность таких ИПЭК к связыванию и эндоцитозу в животные клетки. Разработан эффективный метод трансфекции животных клеток, основанный на включении плазмидных ДНК в комплексы с карбоцепными поликатионами и липополиаминами. Конструкции на основе ИПЭК были также использованы для доставки ДНК в клетку по рецептор-опосредованному пути. С этой целью молекулу поликатиона (поли(*L*-лизина)), входящую в состав комплекса, ковалентно соединяют с лигандом, что обеспечивает эндоцитоз ИПЭК и трансфекцию клеток. Аналогичный подход использован для адресной доставки генетического материала к клеткам-мишеням в организме. В этом случае поликатион соединяют с антителами или другими молекулами, способными к селективному взаимодействию с мишенью.

ВВЕДЕНИЕ

Доставка чужеродных нуклеиновых кислот внутрь интактных клеток лежит в основе многих важнейших методов генетической инженерии [1]. В настоящее время разработан целый ряд приемов для введения ДНК в клетки, среди которых наиболее известными являются преципитация фосфатом кальция [2] или ДЕАЕ-декстраном [3], электропорация [4], микроньютекция [5], встраивание ДНК в реконструированные оболочки вирусов [6] или липосомы [7] и др.

Несмотря на значительное разнообразие этих методов, поиск новых путей трансформации животных, растительных и прокариотических клеток продолжается. С одной стороны, это вызвано необходимостью повышения эффективности трансформации по сравнению с достигаемой при использовании традиционных подходов. С другой стороны, традиционные подходы применимы лишь для ограниченного числа клеточных линий [8] и оказываются неэффективными при введении молекул РНК в клетки [9]. Наконец, большинство этих подходов не может быть использовано для генетической трансформации *in vivo* [10].

Недавно был предложен новый подход для повышения эффективности доставки генетического

материала в клетку, основанный на использовании растворимых ИПЭК нуклеиновых кислот с поликатионами [11 - 13] (рис. 1). Интерполиэлектролитные комплексы ДНК с линейными поликатионами формируются при смешении растворов компонентов за счет образования кооперативной системы межцепенных электростатических связей. Физико-химические характеристики ИПЭК, в частности растворимость, размер и поверхностный заряд, сильно зависят от его состава, т.е. осново-мольного соотношения поликатиона : ДНК в комплексе. Включение в ИПЭК приводит к существенному изменению свойств ДНК, в том числе к ее компактизации и повышению стабильности против расщепления нуклеазами.

Включение молекулы ДНК в состав таких ИПЭК способствует усилению ее взаимодействия с клеточной мембраной и повышению трансформирующей активности по отношению как к прокариотическим [12, 14], так и к животным [13, 15] клеткам. Соединяя молекулы поликатиона с лигандом, способным к специальному связыванию и эндоцитозу, можно обеспечить захват ИПЭК в клетку по рецептор-опосредованному пути [8, 11], а также его адресную доставку в организме к клеткам-мишеням [10]. В настоящем обзоре рассмотрены закономерности образования ИПЭК ДНК, а также

возможности их использования для доставки генетического материала в клетку.

ОБРАЗОВАНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИПЭК НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Известные на настоящий момент закономерности образования и свойства ИПЭК нуклеиновых кислот с линейными поликатионами (см. также обзорные работы [16, 17]) в целом соответствуют представлениям, сформировавшимся ранее в ходе исследования комплексов, образованных синтетическими полионами [18, 19]. При смешении водных растворов нуклеиновой кислоты и линейного поликатиона происходит кооперативное связывание противоположно заряженных цепей, т.е. образование ИПЭК. Если хребет основной цепи поликатиона гидрофобен, то "прилипание" поликатиона к нуклеиновой кислоте, сопровождающееся компенсацией зарядов фосфатных групп, должно привести к формированию гидрофобного участка [11]. Протяженность и число таких гидрофобных участков задается степенью полимеризации (длиной) поликатиона и составом поликомплекса ϕ , т.е. отношением числа звеньев поликатиона к числу фосфатных групп нуклеиновой кислоты, входящих в ИПЭК: $\phi = [\text{поликатион (осново-моль)}]/[\text{ДНК (осново-моль)}]$. Поэтому физико-химические свойства ИПЭК существенно зависят от их состава.

При низких значениях ϕ образуются растворимые в воде нестехиометрические ИПЭК. При достижении некоторого критического состава ϕ_c ($\phi_c < 1$) гидрофобность поликомплекса возрастает настолько, что он более не может находиться в растворе. В этих условиях наблюдается диспопорционирование [19], т.е. неравномерное распределение молекул поликатиона между цепями ДНК. В растворе остается ИПЭК, состав которого равен ϕ_c , "избыточные" же молекулы поликатиона включаются в стехиометрический комплекс ($\phi = 1$), который выпадает в осадок или агрегирует. По мере увеличения содержания поликатиона ($\phi_c < [\text{поликатион}] : [\text{ДНК}] < 1$) доля стехиометрического комплекса возрастает, а доля растворимого ($\phi = \phi_c$) понижается. В условиях равенства осново-мольных концентраций ДНК и поликатиона в системе ($[\text{поликатион}] : [\text{ДНК}] = 1$) все цепи нуклеиновой кислоты вовлечены в образование стехиометрического комплекса.

Дальнейшее увеличение содержания поликатиона может приводить к перезарядке комплекса и его растворению [19]. В этих условиях частицы ИПЭК стабилизированы в растворе положительно заряженными петлями и "хвостами" поликатиона, связанными с цепями ДНК. Ниже мы проиллюстрируем эти общие закономерности несколькими конкретными примерами.

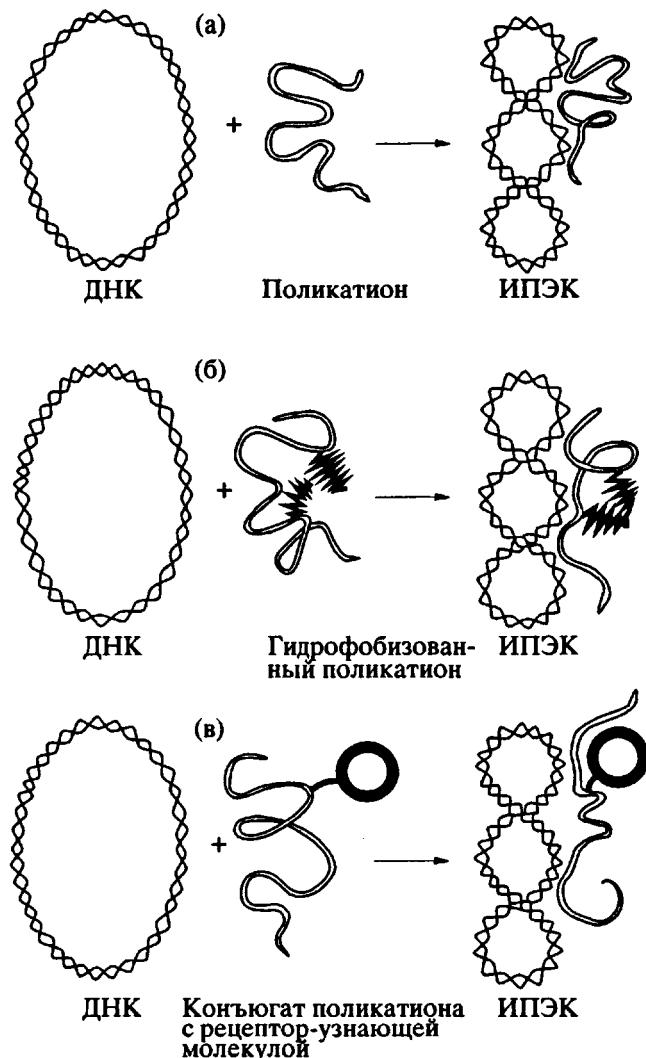


Рис. 1. Образование ИПЭК в результате взаимодействия ДНК с поликатионом (а), поликатионом, дополнительно гидрофобизированным длинноцепочечными углеводородными заместителями (б) и конъюгатом поликатиона с рецептор-узнавающей молекулой (в).

В работах [14, 20, 21] образование ИПЭК нуклеиновых кислот было изучено методом скоростной седиментации на примере комплексов ДНК фага λ [14, 21] и тимусной ДНК теленка [20] с поли(Н-алкил-4-винилпиридинами) (ПВПЭ) [14, 20, 21] и статистическим сополимером N-этил-4-винилпиридиний и N-цетил-4-винилпиридиний бромидов (ПВПЭЦ) [14, 21] (рис. 2). В этих случаях контурная длина ДНК (ММ от 10^7 до 3×10^7) более чем на порядок превышала длину поликатионов ($M = 10^5$).

На седиментограммах образцов, полученных смешением растворов ДНК λ и ПВПЭ, в интервале осново-мольных соотношений [поликатион] : [ДНК] от 0 до 0.5, наблюдалась единственная граница. Соответствующий ей коэффициент седиментации S непрерывно менялся от

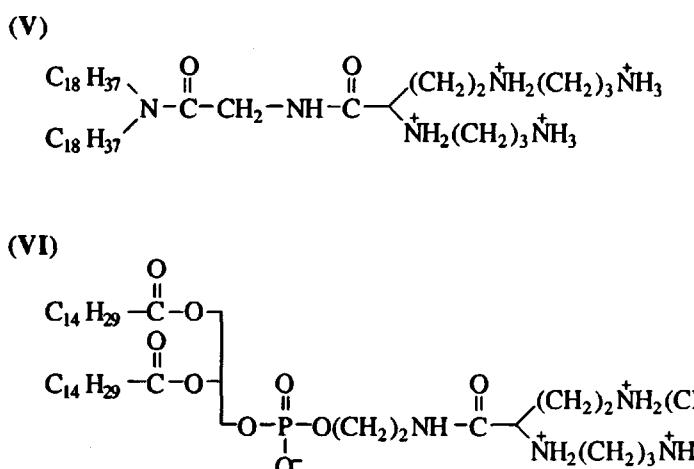
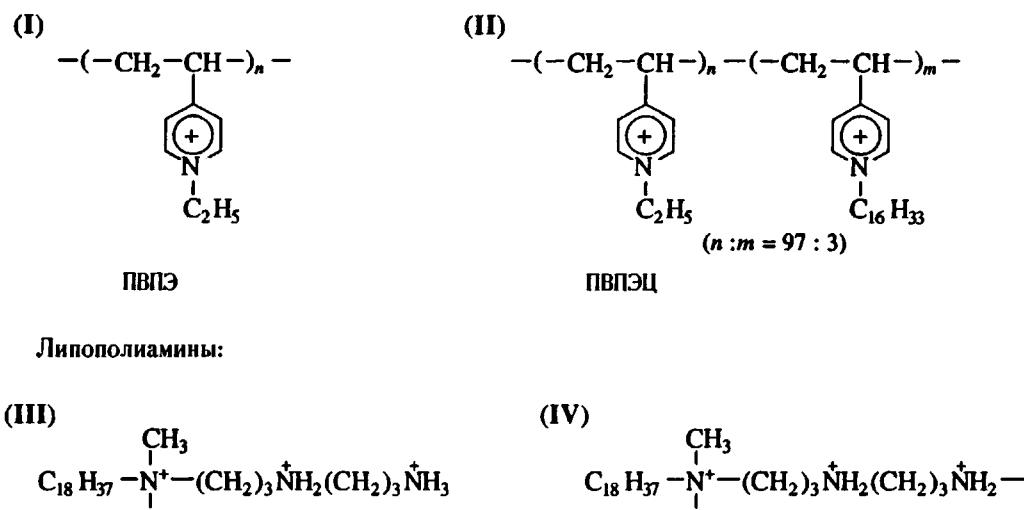


Рис. 2. Некоторые поликатионы и олигокатионные ПАВ, использованные для получения ИПЭК ДНК.

18 ед. Сведберга для свободной ДНК до 24 ед. Сведберга (рис. 3а). Полученные данные [14, 21] свидетельствуют об образовании в таких условиях нестехиометрических ИПЭК, состав которых совпадает с исходным соотношением полимерных компонентов ($0 < \phi < 0.5$). При этом цепи поликатиона, связываясь с цепями ДНК, равномерно распределяются между ними. При дальнейшем увеличении количества добавленного поликатиона наблюдается диспропорционирование: наряду с растворимым ИПЭК ($\phi = 0.5$; $S = 24$ ед. Сведберга) образуется нерастворимый поликомплекс с большим содержанием поликатиона. Закономерности взаимодействия ПВПЭЦ с ДНК λ в целом оказываются аналогичными наблюдаемым для ПВПЭ [14, 21]. Однако в этом случае область образования растворимого ИПЭК соответствует существенно более узкому интервалу осново-мольных соотношений [поликатион] : [ДНК] = 0 - 0.25 (рис. 3а).

Результаты седиментационных экспериментов показывают, что включение молекулы ДНК в состав ИПЭК приводит к ее компактизации. В частности, наблюдаемое при добавлении ПВПЭЦ почти двукратное повышение коэффициента седиментации нуклеиновой кислоты (рис. 3а) не может быть объяснено только увеличением молекулярной массы комплекса (которое не превышает 20%) и, вероятнее всего, свидетельствует о компактизации ДНК, сопровождающейся понижением поверхностного трения. По-видимому, с этим обстоятельством в первую очередь связано и увеличение электрофоретической подвижности ДНК, наблюдаемое при низком содержании поликатиона в ИПЭК ($\phi = 0.2$) (рис. 3б). Непосредственное свидетельство компактизации ДНК при ее взаимодействии с поликатионом было получено методом электронной микроскопии в ходе изучения ИПЭК плазмидной ДНК с поли(*L*-лизином) [22]. В этом случае показано, что в зависимости от состава комплексы представляют

собой либо плотные тороиды со средним диаметром около 80 - 100 нм, либо звездообразные структуры с плотным ядром, окруженным "опушкой" из цепей ДНК.

Образование ИПЭК может быть зарегистрировано с помощью электрофореза в агарозном геле [14]. Как видно из денситограмм, приведенных на рис. 3б, включение плазмидной ДНК ($M = 3 \times 10^6$) в растворимый ИПЭК с ПВПЭ приводит к изменению положения полосы, которая соответствует линейной форме плазмида. Знак смещения указывает на увеличение электрофоретической подвижности несмотря на некоторое (около 20%) уменьшение суммарного отрицательного заряда. Причина состоит в компактизации линейной формы ДНК при связывании с поликатионом в ИПЭК. Однако в случае кольцевой формы такого смещения не наблюдается, что, вероятно, обусловлено существенно меньшей способностью более компактной кольцевой плазмида к дополнительной компактизации при ее взаимодействии с ПВПЭ.

Выраженная способность ПВПЭЦ к неравномерному распределению по цепям ДНК, по-видимому, объясняется стремлением боковых углеводородных заместителей ПВПЭЦ к агрегации и к образованию в частице ИПЭК гидрофобных кластеров. В этом случае гидрофобные взаимодействия углеводородных заместителей служат фактором, стабилизирующим частицы ИПЭК, в состав которых входит несколько молекул поликатиона. Аналогичная ситуация, по-видимому, реализуется и для липополиаминов (III - VI) (рис. 2), которые при взаимодействии с ДНК образуют мицеллы, входящие в состав частиц ИПЭК [13, 23].

В работе [24] образование ИПЭК фрагментов ДНК куриного эмбриона с ПВПЭ, ПВПЭЦ и N-цетилпиридиний бромидом было изучено методами тушения флуоресценции, светорассеяния и микроэлектрофореза. В этом случае в отличие от цитированных выше работ [14, 20, 21] контурная длина ДНК (ММ от 3×10^4 до 7×10^4) была в несколько раз меньше длины поликатионов ($M = 1.5 \times 10^5$). Вместе с тем общие закономерности образования ИПЭК оказываются аналогичными описанным выше.

К фрагментам ДНК ковалентно присоединяли флуоресцентную метку (1-амино-гексаметилен-флуоресцеин) и следили за образованием ИПЭК по тушению ее флуоресценции поликатионами или N-цетилпиридиний бромидом. В данном случае (рис. 4а) флуоресценция меченой ДНК монотонно понижалась с увеличением концентрации поликатиона и достигала постоянной величины (около 30% от исходного значения) при равенстве осново-мольных концентраций поликатиона и ДНК (рис. 4б). Следует, очевидно, допустить, что

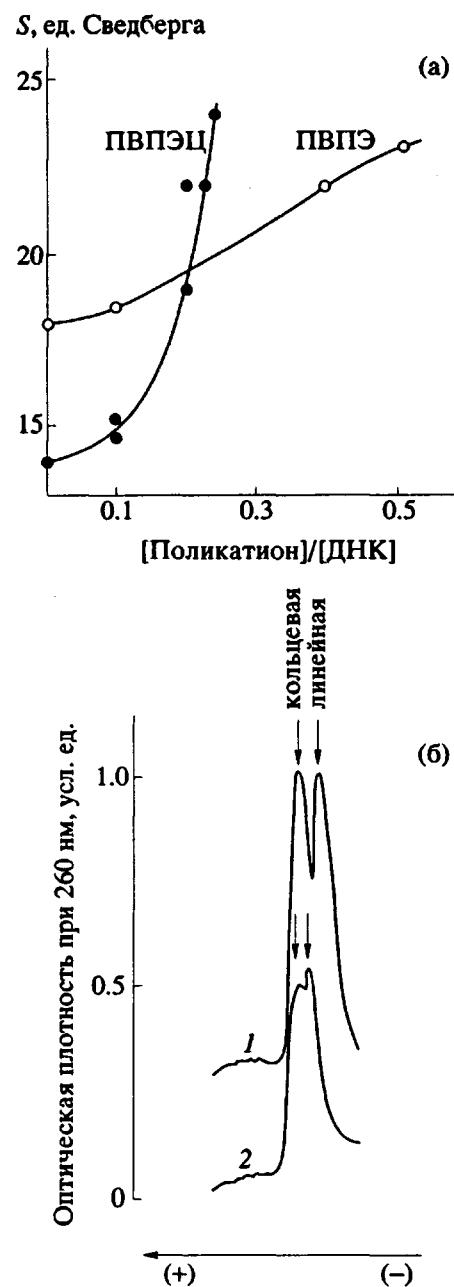


Рис. 3. Зависимость коэффициентов седиментации растворимых ИПЭК ДНК фага λ с ПВПЭ и ПВПЭЦ от отношения осново-мольных концентраций [поликатион]/[ДНК] (а) и профили электрофореза нативной плазмида pBC16 (1) и ее ИПЭК ($\phi = 0.2$) с ПВПЭ (2) (б). Стрелками показаны положения линейной и кольцевой форм плазмида [14].

в этих условиях цепи ДНК оказываются полностью "покрытыми" молекулами поликатиона.

Увеличение содержания поликатиона в системе (в области $\phi > 0.5$) сопровождалось также понижением электрофоретической подвижности ИПЭК, происходящим в результате компенсации отрицательного заряда ДНК (рис. 4б). При

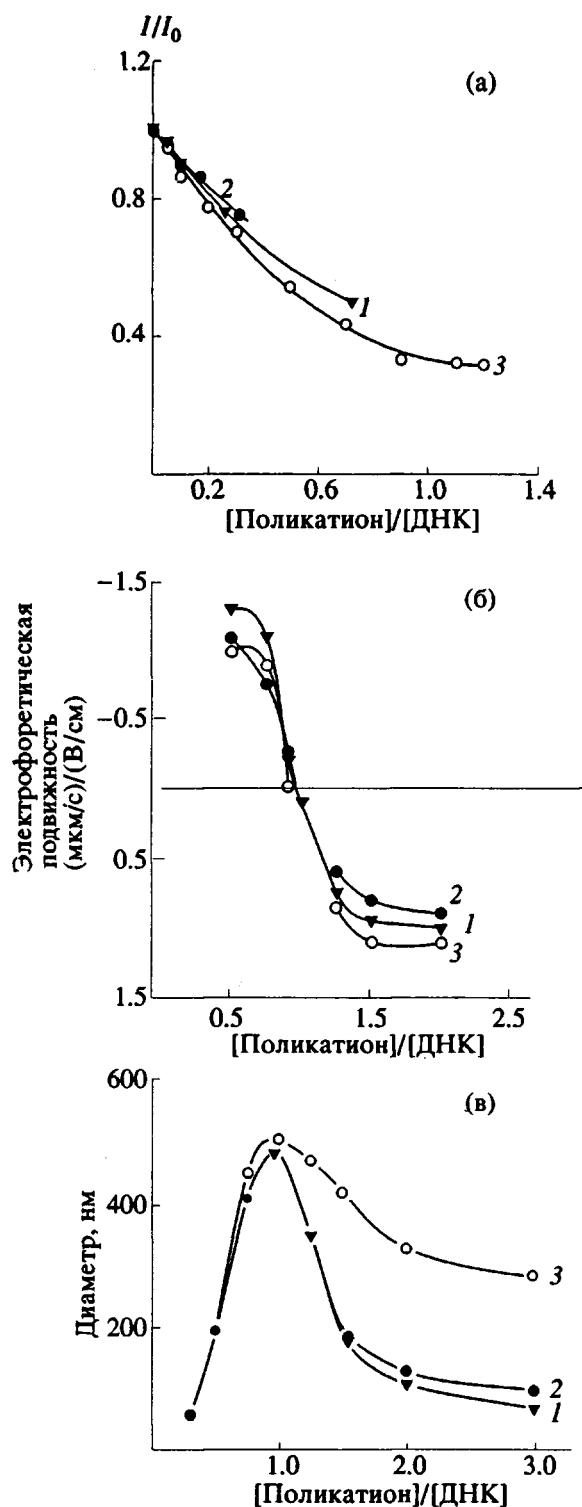


Рис. 4. Тушение флуоресценции ФИТЦ-мечевых фрагментов ДНК куриного эмбриона при их взаимодействии с ПВПЭ (1), ПВПЭЦ (2) и N-цетилпиридиний бромидом (3) (а) и зависимости электрофоретической подвижности (б) и гидродинамического диаметра (в) ИПЭК фрагментов ДНК куриного эмбриона с ПВПЭ (1), ПВПЭЦ (2) и N-цетилпиридиний бромидом (3) от осново-мольного отношения [поликатион]/[ДНК] [23].

равенстве осново-мольных концентраций поликатиона и ДНК частицы ИПЭК оказываются незаряженными, т.е. в данных условиях состав комплекса $\phi = 1$. Дальнейшее повышение концентрации поликатиона приводит к изменению знака заряда ИПЭК, что однозначно свидетельствует о включении в его состав избытка молекул поликатиона ($\phi > 1$).

В области осново-мольных соотношений [поликатион] : [ДНК] > 0.3 методом светорассеяния было зарегистрировано образование крупных агрегатов нерастворимого ИПЭК. Зависимость размера этих агрегатов от соотношения [поликатион] : [ДНК] имеет колоколообразный вид (рис. 4в) – максимальный размер частиц наблюдается в условиях электронейтральности комплекса ($\phi = 1$). Уменьшение размера агрегатов, происходящее при дальнейшем увеличении содержания поликатионов ($\phi > 1$), обусловлено, по-видимому, стабилизацией частиц ИПЭК в растворе за счет избыточного положительного заряда.

Компактизация цепей ДНК в ИПЭК может влиять на их доступность ферментам и другим молекулам, осуществляющим специфическое узнавание и процессинг нуклеиновых кислот в клетках. В этой связи мы изучили процессы ферментативной рестрикции ДНК, входящей в состав ИПЭК.

Оказалось, что при включении ДНК в ИПЭК наблюдается значительное понижение скорости рестрикции [14]. Кинетика рестрикции в этом случае характеризуется наличием двух стадий (рис. 5). На первой стадии происходит быстрое расщепление ДНК в тех участках, которые не покрыты цепями поликатиона. На второй стадии – медленная рестрикция оставшейся ДНК. При этом скорость реакции, по-видимому, лимитируется освобождением участков рестрикции, происходящим в результате перемещения поликатиона с одних цепей ДНК на другие. В частицах стехиометрического ИПЭК ($\phi = 1$) цепи ДНК полностью экранированы цепями поликатиона, и рестрикция ДНК не происходит.

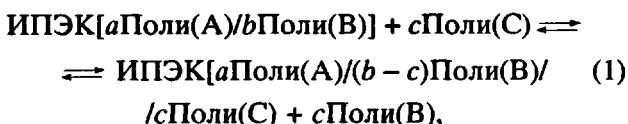
Вместе с тем продукты рестрикции, образующиеся после завершения реакции, оказываются одинаковыми как в случае нативной ДНК, так и ее ИПЭК. Следовательно, поликатион, связанный в комплексе с ДНК при $\phi < 1$, не препятствует ее специфическому узнаванию рестриктазами, но лишь замедляет процесс. Этот факт согласуется с известными динамическими свойствами полионов, входящих в состав ИПЭК [25] (см. также следующий раздел). Цепи поликатиона не фиксированы жестко

на цепях ДНК; они перемещаются с одних участков ДНК на другие, открывая места для рестрикции.

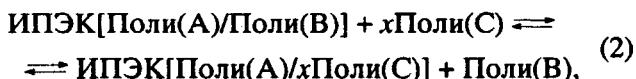
РЕАКЦИИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНОГО ОБМЕНА, ЗАМЕЩЕНИЯ И ВЗАЙМОДЕЙСТВИЕ ИПЭК ДНК С ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫМИ ЛИПОСОМАМИ

Способность вступать в реакции полиэлектролитного замещения и обмена является одним из важнейших свойств ИПЭК. Природа и закономерности этих реакций подробно рассмотрены в обзорах [18, 19, 25] на примере комплексов синтетических полионов.

Под реакциями замещения подразумевают процессы типа



где Поли(A) – полион, заряженный противоположно полионам Поли(B) и Поли(C). Если Поли(B) идентичен Поли(C), то процесс (1) называют реакцией обмена. Ниже для простоты мы рассмотрим реакцию



предположив, что степень полимеризации Поли(A) меньше степени полимеризации Поли(B) ($P_w^A < P_w^B$) (в этом случае молекулу Поли(A) называют “гость”, а Поли(B) – “хозяин”), и реакция не приводит к изменению состава ИПЭК ($\phi = P_w^A/P_w^B = P_w^A/xP_w^C$).

Благодаря кооперативному характеру взаимодействия полимерных противоионов в ИПЭК, обеспечивающему их прочное прилипание друг к другу, реакция (2) не может протекать по диссоциативному механизму. Исследование механизма этой реакции на примере синтетических полиэлектролитов позволило установить [26], что на первой, быстрой ее стадии происходит миграция свободного полиона Поли(C) к частице ИПЭК и образование тройного комплекса ИПЭК[Поли(A)/Поли(B)]...Поли(C). Бимолекулярная константа скорости этого процесса составляет $\sim 10^9$ л/моль с, что соответствует скорости диффузионных столкновений цепей полионов в водном растворе. На второй стадии в присутствии простой соли в тройном комплексе происходит межцепной перенос сегментов противоположно заряженных полионов, приводящий к замещению цепей Поли(B) цепями Поли(C). В отсутствие низкомолекулярного электролита вторая стадия не протекает.

Помимо ионной силы на кинетику процесса влияют природа низкомолекулярных противоио-

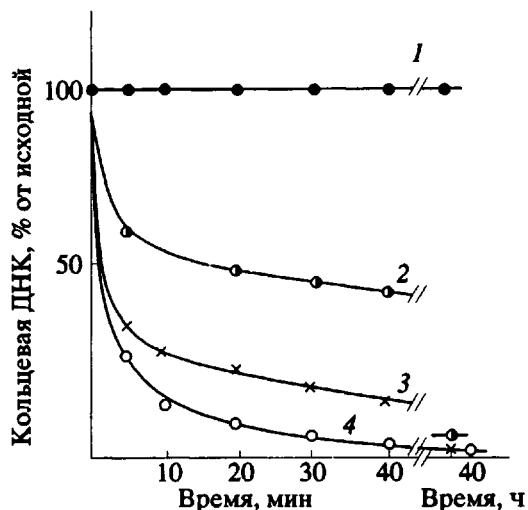


Рис. 5. Кинетика рестрикции кольцевой формы плазиды pTZ19 и ее ИПЭК с ПВПЭ ($P_w = 18$) [14]. Значения ϕ ИПЭК: 1 – 1; 2 – 0.5; 3 – 0.2; 4 – свободная ДНК.

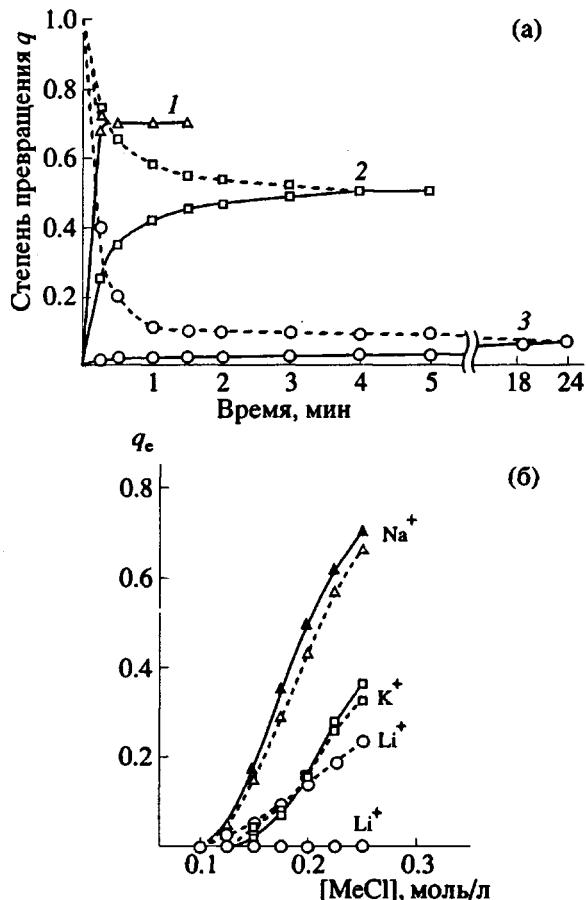


Рис. 6. Кинетика установления равновесия в реакции (3) при $[\text{NaCl}] = 0.25$ (1); 0.20 (2) и 0.125 моль/л (3) (а) и влияние простой соли на положение равновесия (равновесная степень превращения q_e) реакции (3) с участием нативной и денатурированной ДНК [28] (б). Сплошные линии – нативная ДНК, штриховые – денатурированная ДНК.

нов, плотность заряда и структура полионов, участвующих в реакции [25, 26]. Причина этого явления, по-видимому, заключается в том, что от названных факторов зависит прочность межцепных солевых связей в ИПЭК, ослабление которых увеличивает вероятность их перераспределения в комплексе ИПЭК[Поли(А)/Поли(В)]...Поли(С) и, следовательно, ускоряет межцепной перенос полионов [26]. Наконец, скорость переноса цепей Поли(А) в тройном комплексе ИПЭК[Поли(А)/Поли(В)]...Поли(С) возрастает с уменьшением их длины [25].

Не только скорость, но и положение равновесия реакций замещения оказывается чувствительным к структуре и длине полионов, а также природе и концентрации низкомолекулярных противоионов [16, 25]. Для объяснения этих явлений общее изменение свободной энергии ΔG , в ходе реакции (2) целесообразно представить как сумму двух составляющих [27]

$$\Delta G_t = \Delta G_p + \Delta G_c,$$

где ΔG_p соответствует замене межцепных связей A·B на связи A·C, а ΔG_c – разница свободных энергий взаимодействия низкомолекулярного противоиона со свободными цепями Поли(С) и Поли(В), участвующими в реакции замещения. Величину ΔG_p в первом приближении можно представить следующим образом:

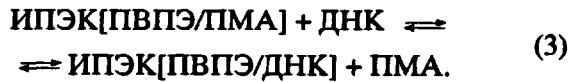
$$\Delta G_p = \dot{P}_A (\Delta H_{A \cdot C} - \Delta H_{A \cdot B}) - T \Delta S_p.$$

Здесь $\Delta H_{A \cdot C} - \Delta H_{A \cdot B}$ – разность энタルпий связей A·C и A·B в расчете на звено, число замещаемых связей равно P_A , а ΔS_p – изменение энтропии свободных цепей Поли(С) и Поли(В) в ходе реакции (без учета вклада противоионов). Очевидно, что благодаря кооперативному характеру взаимодействия полионов в ИПЭК даже небольшие изменения энталпии межцепных связей в расчете на звено должны привести к значительным изменениям ΔG_p и ΔG , в целом. Уменьшение длины Поли(С) в условиях постоянства состава ИПЭК приводит к росту x (т.е. числа частиц, вступающих в реакцию слева), а это должно в свою очередь увеличивать энтропийную составляющую $-T \Delta S_p$ и сдвигать равновесие влево [27]. Что же касается эффектов низкомолекулярных противоионов, то варьирование их природы и концентрации не влияет на величину ΔG_p , однако благодаря изменению ΔG_c оно может привести к изменениям направления процесса (ΔG_t), как это показано ниже на примере реакций с участием ИПЭК ДНК.

На основании данных о равномерном распределении цепей поликатиона (ПВПЭ) между молекулами ДНК уже в ранней работе Миллера и Бах [20] был сделан вывод о возможности протекания реакции обмена в системах, содержащих ИПЭК ДНК. В работах [14, 15] использовали реакцию замещения нуклеиновой кислоты поли(акрилатом натрия) (ПА-Na) и поли(метакрилатом натрия) (ПМА-Na) для разрушения комплексов ДНК/ПВПЭ и

ДНК/ПВПЭЦ в ходе изучения их рестрикции [14] и взаимодействия с животными клетками [15].

В работе [28] исследовали реакцию замещения в комплексах ДНК и ПМА с ПВПЭ



Эта реакция полностью обратима – состояние равновесия достигается независимо от порядка смешения реагентов. Однако скорость реакции и положение равновесия существенно зависят от ионной силы и природы присутствующей в растворе простой соли (рис. 6). Так, изменение концентрации NaCl от 0.125 до 0.25 моль/л приводит к почти полному сдвигу равновесия слева направо (от ИПЭК [ПВПЭ/ПМА] к ИПЭК[ПВПЭ/ДНК]) (рис. 6а). Наряду с этим наблюдается сильное уменьшение времени полупревращения реакции – от десятков минут до нескольких секунд.

На рис. 6б показано влияние концентрации и природы противоионов на положение равновесия реакции (3). При замене простой соли в ряду NaCl > KCl > LiCl равновесие реакции смещается справа налево (от ИПЭК[ПВПЭ/ДНК] к ИПЭК[ПВПЭ/ПМА]). Примечательно, что LiCl в отличие от NaCl и KCl по-разному влияет на направление реакции с участием нативной и денатурированной ДНК. В случае нативной ДНК во всем изученном диапазоне концентраций LiCl равновесие в реакции полностью сдвинуто в сторону ИПЭК[ПВПЭ·ПМА], в то время как в случае денатурированной ДНК с увеличением концентрации LiCl наблюдается существенный сдвиг равновесия вправо. Это явление, по всей видимости, обусловлено различием в энергиях взаимодействия катионов Li^+ с цепями нативной и денатурированной ДНК.

Исследование реакций замещения в системах, содержащих ИПЭК ДНК, представляется важным для понимания особенностей взаимодействия таких ИПЭК с биологическими структурами, в частности с клеточными мембранами. В работе [23] проведено изучение взаимодействия комплексов ДНК/ПВПЭ, и ДНК/N-цетилпиридиний бромид ($\phi = 0.1$) с отрицательно заряженными моноламеллярными липосомами (диаметр около 100 - 150 нм) из смеси фосфатидилхолина и кардиолипина (4 : 1). Несмотря на то, что закономерности образования и строение этих комплексов оказываются схожими (рис. 4), характер их взаимодействия с липосомами сильно отличается.

Так, комплекс ДНК/N-цетилпиридиний бромид при взаимодействии с липосомами разрушается: катионы N-цетилпиридиния встраиваются в мембрану липосом, изменяя их поверхностный заряд, а свободные цепи ДНК остаются в растворе. Этот процесс имеет определенное сходство с реакцией (1) – цепи ДНК в комплексе замещаются со-

вокупностью отрицательно заряженных групп на поверхности липосомной мембраны. Вместе с тем очевидно, что "комплекс" N-цетилпиридиния с липосомами стабилизируется за счет встраивания цетильных заместителей в неполярную часть мембраны. При добавлении избытка ИПЭК происходит перезарядка липосом — количество встроившихся в мембрану катионов N-цетилпиридиния превышает исходное количество анионов кардиолипина. В этом случае присутствующие в системе отрицательно заряженные молекулы ДНК связываются с поверхностью липосом и вызывают их агрегацию.

Совершенно иная картина наблюдается в случае ИПЭК ДНК/ПВПЭ. Этот комплекс с липосомами не взаимодействует. Более того, при добавлении свободных молекул ДНК к липосомам, на поверхности которых предварительно был адсорбирован ПВПЭ, происходит перенос всех цепей поликатиона с поверхности липосом на ДНК. Иными словами, равновесие реакции замещения ДНК между ИПЭК ДНК/ПВПЭ и липосомной мембранный полностью сдвинута влево, т.е. в сторону ИПЭК ДНК/ПВПЭ.

Наконец, комплекс ДНК/ПВПЭЦ прочно связывается с поверхностью липосом, образуя с ними тройной комплекс ДНК/ПВПЭЦ/липосома. Это, по-видимому, происходит благодаря встраиванию в липосомную мембрану боковых цетильных заместителей ПВПЭЦ, выступающих в этом случае в роли "якорей". В то же время межцепные солевые связи ДНК и ПВПЭЦ в образующемся тройном комплексе сохраняются.

Очевидно, что к перенесению данных, получаемых при использовании сравнительно простых модельных систем, на события, происходящие в живой клетке, следует подходить с определенной осторожностью. Вместе с тем мы полагаем, что исследование поведения ИПЭК ДНК в таких системах весьма полезно как для объяснения уже установленных закономерностей их взаимодействия с биологическими структурами (см. ниже), так и для совершенствования систем направленной доставки нуклеиновых кислот на основе ИПЭК.

ТРАНСФОРМАЦИЯ БАЦИЛЛ

Возможность повышения эффективности генетической трансформации прокариотических клеток в результате включения плазмидной ДНК в ИПЭК была впервые показана нами в работе [12] на примере клеток *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). Известно, что трансмембранный перенос ДНК внутрь клетки — лимитирующая стадия трансформации *B. subtilis* [29].

Включение плазмиды pBC16, содержащей ген устойчивости к тетрациклину, в состав ИПЭК с ПВПЭ и ПВПЭЦ приводит к существенному увеличению эффективности трансфор-

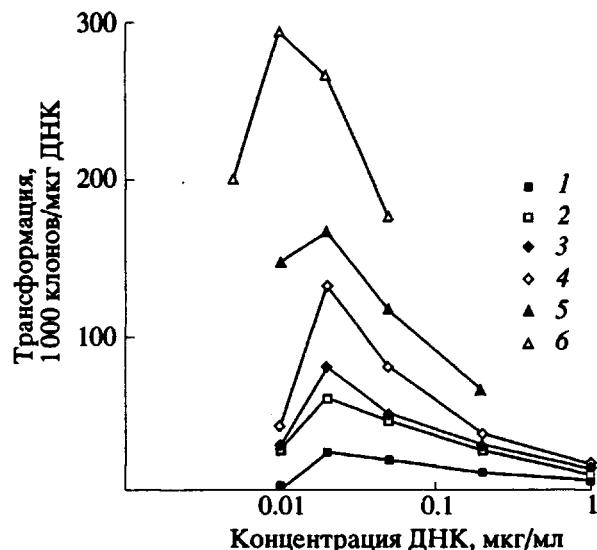


Рис. 7. Трансформация компетентных клеток *B. subtilis* свободной плазмидой (1) pTZ19 и ее ИПЭК с ПВПЭ (2, 4, 5, 6) или ПВПЭЦ (3). Степень полимеризации поликатионов $P_w = 400$ (2, 3, 4), 200 (5) и 18 (6); $\phi = 0.1$ (2) и 0.2 (3 - 6).

мации клеток (рис. 7). Один и тот же уровень трансформации *B. subtilis* под воздействием ИПЭК достигается при гораздо более низких концентрациях ДНК, чем в случае свободной плазмиды. Как видно из рис. 7, значительный выход трансформанта (около 3×10^4 клонов на клетку) в случае ИПЭК наблюдается при концентрации ДНК 0.01 мкг/мл, в условиях, когда трансформация *B. subtilis* под действием свободной плазмиды практически не наблюдается. В случае свободной плазмиды этот выход достигается только при концентрации ДНК 0.2 мкг/мл.

Величина наблюдаемого эффекта зависит от состава ИПЭК, а также от длины поликатиона. В частности, увеличение состава с $\phi = 0.1$ до $\phi = 0.2$, сопровождающееся увеличением гидрофобности ИПЭК, приводит к повышению эффективности трансформации. При постоянном значении ϕ эффективность трансформации можно регулировать, изменяя длину поликатиона: с уменьшением степени полимеризации ПВПЭ выход трансформанта возрастает (рис. 7).

Эффективность трансформации зависит также и от химической природы поликатиона. Так, в частности, трансформирующая активность плазмиды в комплексе с ПВПЭЦ несколько ниже, чем ее активность в комплексе с ПВПЭ с той же степенью полимеризации (рис. 7). Таким образом, трансформирующая активность ИПЭК ДНК по отношению к бациллам не является простой "функцией" гидрофобности поликатиона. Вместе с тем включение плазмиды в состав ИПЭК с менее гидрофобным полиг(L-лизином) приводит даже к некоторому понижению эффективности

Взаимодействие свободной и включенной в ИПЭК плазмида pRSV CAT с животными клетками [15]

Клетки*	Изученная система	Температура, °C	Связавшаяся ДНК** (нг/мг клеточного белка)		
			общее связывание	адсорбция	захват
Нормальные мышиные фибробласты 3T3 NIT	Свободная ДНК	37	7(±2)	7(±2)	<1
	Преципитация ДНК фосфатом кальция	37	20(±2)	10(±3)	10(±1)
	ИПЭК	4	70(±8)	64(±10)	6(±2)
	ИПЭК	37	153(±16)	103(±21)	50(±5)
Клетки почек собаки MDCK	Свободная ДНК	37	1.0(±0.5)	1.0(±0.5)	0
	Преципитация ДНК фосфатом кальция	37	25(±4)	9(±7)	16(±3)
	ИПЭК	4	100(±10)	78(±13)	22(±3)
	ИПЭК	37	165(±14)	97(±20)	68(±6)
Клетки Т-лимфомы Jurkat	Свободная ДНК	37	30(±5)	30(±5)	<1
	Преципитация ДНК фосфатом кальция	4	50(±6)	25(±10)	25(±4)
	ИПЭК	4	80(±7)	35(±11)	45(±4)
	ИПЭК	37	360(±32)	228(±44)	132(±12)

* Клетки обрабатывали методом кальций-fosfатной преципитации [2] или инкубировали со свободной ДНК или ИПЭК ДНК/ПВПЭ ($P_w = 500$) ($\phi = 10$). Концентрация ДНК составляла 0.25 мкг/мл (3T3 NIT); 0.1 мкг/мл (MDCK) или 0.2 мкг/мл (Jurkat).

**Общее связывание определяли, измеряя радиоактивность клеточного лизата; количество интернализованной ДНК определяли после обработки клеток ПА-На и ДНКазой I; количество ДНК, адсорбированной на клеточной поверхности, определяли как разницу общего связывания и интернализации.

трансформации по сравнению с уровнем, наблюдаемым в случае свободной ДНК [14]. Этот результат указывает на то, что в рассматриваемых условиях гидрофобность основной цепи, по-видимому, все же необходима для эффективной трансформации клеток.

Механизм описанного явления пока не ясен [14]. Известно, что трансформация клеток *B. subtilis* представляет собой сложный, многоступенчатый процесс. Одна из его важных стадий состоит в адсорбции ДНК на мемbrane частично протопластированной клетки [29, 30]. Показано, что включение ДНК в состав ИПЭК сопровождается повышением эффективности ее адсорбции на мембранах *B. subtilis* [14] из-за взаимодействия образованных поликатионом гидрофобных участков на цепи ДНК с неполярными частями липидных бислоев.

Следующую стадию проникновения ДНК в клетки бацилл обычно связывают с фрагментацией ДНК и ее переходом в однонитевую форму [29, 30]. Результаты экспериментов по рестрикции (рис. 5) указывают на то, что такой специфический ферментативный процессинг ДНК может осуществляться и в связанном с мембраной ИПЭК. Однако нельзя исключать, что механизм переноса ДНК, включенной в ИПЭК, от внешней мембраны внутрь клетки может принципиаль-

ным образом отличаться от механизма, реализующегося в случае нативной ДНК.

Чтобы попавшая в клетку молекула ДНК могла реплицироваться, она, по всей вероятности, должна "освободиться" от связанных с ней цепей поликатиона. Основываясь на данных, приведенных в предыдущем разделе, можно ожидать, что при взаимодействии ИПЭК с отрицательно заряженными компонентами клетки может происходить перемещение поликатиона на эти компоненты и освобождение ДНК в функционально активной форме.

ТРАНСФЕКЦИЯ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

Для генетической трансфекции животных клеток, т.е. включения в их геном нового фрагмента ДНК, Бер и др. [13] применили подход, основанный на гидрофобизации нуклеиновой кислоты путем ее связывания в ИПЭК с липополиаминами V и VI (рис. 2). В работе [13] показано, что включенная в ИПЭК плазмида pSV2 CAT (содержащая ген хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT)) проявляет высокую трансфекционную активность по отношению к широкому кругу различных клеток. Эффективность трансфекции определяется составом ИПЭК; при этом значительный уровень экспрессии CAT в трансфицированных клетках наблюдается лишь при ϕ , близких и больших единицы. В опти-

мальных условиях эффективность предложенного метода более чем в 10 раз превышает эффективность кальций-фосфатной преципитации.

В той же работе [13] показана возможность трансфекции клеток комплексами плазмида с низкомолекулярным катионным ПАВ – диоктадецилдиметиламмоний хлоридом. В этом случае, однако, эффективность трансфекции оказалась заметно ниже, чем при использовании комплексов ДНК с олигокатионными ПАВ V, VI.

Работа [13] не содержит никаких указаний на возможный механизм трансфекции. Однако полученные нами недавно данные [15] свидетельствуют об общем характере явления трансфекции клеток под влиянием ИПЭК нуклеиновых кислот.

Мы изучили взаимодействие ДНК–ДНК/карбокцепные поликатионы (ПВПЭ и ПВПЭЦ) с животными клетками [15]. С этой целью комплексы плазмида, меченной ^{32}P , инкубировали с клетками при 4 или 37°C и измеряли общее количество связавшейся с клеткой ДНК. Эта величина при 37°C складывается из двух составляющих: количества ДНК, адсорбированной на внешней стороне плазматической мембранны, и количества ДНК, захваченной в клетку в результате эндоцитоза. Для раздельного определения этих частей адсорбированную ДНК расщепляли ДНКазой (предварительно разрушая ИПЭК ПА-На) (таблица). При 4°C эндоцитоз не протекает; вся связавшаяся с клеткой ДНК адсорбирована на мемbrane и полностью удаляется при обработке ДНКазой (таблица).

Полученные данные свидетельствуют о том, что включение плазмида в состав ИПЭК усиливает как ее адсорбцию на мемbrane (при 4 и 37°C), так и эндоцитозный захват в клетку (при 37°C). При 37°C эффективность захвата включенной в ИПЭК ДНК почти на порядок превышает величину, достигаемую в ходе кальций-фосфатной преципитации.

Наряду с усилением захвата включение плазмида (pRSV CAT, p β -Gal) в комплекс с ПВПЭ и ПВПЭЦ придает ей способность к трансфекции клеток. Как и в случае ИПЭК ДНК с олигокатионными ПАВ [13], эффективность трансфекции зависит от состава ИПЭК (рис. 8). В оптимальных условиях она на порядок превышает эффективность, достигаемую методом кальций-фосфатной преципитации с использованием тех же количеств ДНК.

В отличие, например, от случая бацилл, описанного в предыдущем разделе, трансфицирующей активностью обладают только положительно заряженные комплексы с $\phi \gg 1$. В этой связи вероятно, что первая стадия трансфекции клеток обусловлена кооперативным взаимодействием входящих в состав ИПЭК положительно заряженных сегментов поликатиона с отрицательно

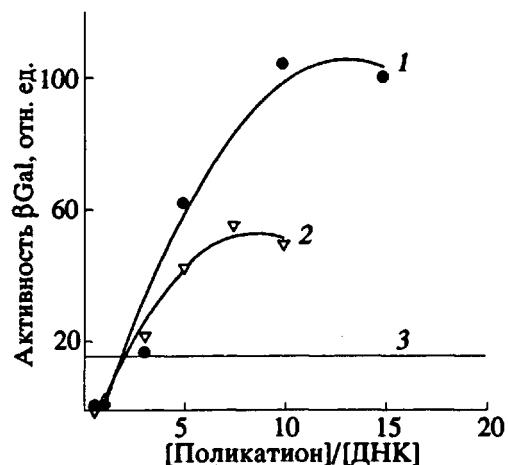


Рис. 8. Трансфекция мышиных фибробластов ЗТЗ НИИ ИПЭК плазмида p β Gal с ПВПЭ (1) и ПВПЭЦ (2). 3 – уровень трансфекции (активности β Gal), наблюдаемый при кальций-фосфатной преципитации с использованием тех же количеств ДНК [15].

заряженными фосфолипидами клеточной мембранны. Именно благодаря такому взаимодействию и происходит усиление адсорбции включенной в ИПЭК ДНК поверхностью клетки.

В то же время известно, что взаимодействие поликатиона с плазматической мембраной может привести к существенным изменениям свойств последней (ее структуры, ионной проницаемости и т.д. [31 - 36]), что в свою очередь может служить "сигналом", индуцирующим эндоцитоз. Явление индуцированного поликатионом эндоцитоза широко представлено в литературе [37 - 40]. Можно предположить, что оно является причиной эффективного эндоцитозного захвата включенной в ИПЭК плазмида. Описанная выше компактизация ДНК в комплексе, вероятно, служит дополнительным фактором, облегчающим захват.

Таким образом, роль поликатиона при трансфекции клеток, по-видимому, заключается в том, что он направляет входящую в состав ИПЭК ДНК в клетку по эндоцитозному пути. Вероятно, что в этих условиях реализуется обычный механизм адсорбционного эндоцитоза, поскольку процесс существенно зависит от температуры.

Следующая стадия трансфекции клеток должна, очевидно, включать освобождение ДНК из эндоцитозных компартментов в цитоплазму. Если эффективность такого процесса мала, то это, очевидно, создает серьезное препятствие для трансфекции. Поэтому дальнейшие усилия по совершенствованию систем для трансфекции животных клеток должны быть сфокусированы на

поиске средств, позволяющих преодолеть эндосомальный барьер.

Как и в описанном выше случае бацилл, эффективность захвата ДНК и трансфекции животных клеток зависит от структуры поликатиона. В частности, согласно данным работы [24], ИПЭК плазмидной ДНК с поли(*L*-лизином), в отличие от ИПЭК ДНК/ПВПЭ и ДНК/ПВПЭЦ, не проявляет способности трансфицировать животные клетки.

В целом данные работ [13, 15] позволяют надеяться на то, что достаточно простые и эффективные методы трансфекции животных клеток с помощью ИПЭК ДНК найдут применение в лабораторной практике. В отличие от многих других подходов использование этих методов не сопряжено с цитотоксическим действием на трансформируемые клетки.

КОНЬЮГАТЫ РЕЦЕПТОР-УЗНАЮЩИХ МОЛЕКУЛ С ПОЛИКАТИОНАМИ КАК НОСИТЕЛИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ДНК В КЛЕТКУ

Связанный с ДНК поликатион, по-существу, представляет собой "строительный блок", который может быть легко соединен с любой рецептор-узнавающей молекулой (рис. 1). Это обстоятельство было использовано для разработки простого метода рецептор-опосредованной доставки ДНК в клетку [8, 10, 11, 41, 42].

В работе [11] синтезировали коньюгат поли(*L*-лизина) с азиалогликопротеином, способным к рецептор-опосредованному проникновению в гепатоциты, и показали, что этот коньюгат может выступать в роли переносчика, обеспечивающего захват ДНК клетками. Плазмида pSV2 CAT, включенная в ИПЭК с этим коньюгатом, обладает способностью эффективно трансформировать клетки гепатомы Hep G2, имеющие рецептор азиалогликопротеина. По отношению к клеткам, лишенным рецептора, трансформирующая активность такого ИПЭК не проявляется.

Основываясь на работе [11], Вагнер и др. [42] предложили использовать для трансформации эукариотических клеток коньюгаты поли(*L*-лизина) с трансферрином. Как и нативный трансферрин, такие коньюгаты проникают внутрь клеток по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза. Плазмида pRSVL (содержащая ген люциферазы), включенная в ИПЭК с таким коньюгатом, эффективно захватывается во внутриклеточные компартметы кроветворных клеток птицы и обладает способностью трансформировать эти клетки [8, 42]. Существенную роль в эндоцитозе ИПЭК, по-видимому, играет компактизация ДНК, необходимая для ее размещения на определенных участках поверхности клеток и последующего захвата в эндоцитозные викулы (размер около 100 нм) [24]. Процессы

интернализации ДНК и трансформации клеток, очевидно, обусловлены специфическим взаимодействием ИПЭК с рецептором трансферрина. Эффективность этих процессов коррелирует с уровнем трансферриновых рецепторов на клетках [43], а при добавлении избытка свободного трансферрина происходит их ингибирование [8].

Описанный метод трансфекции животных клеток ("трансферринфекция" [8]) оказывается в 50 - 100 раз менее эффективным, чем традиционный метод, основанный на преципитации ДНК диэтиламиноэтилдекстрапаном (ДЕАЕ-декстрапаном) [3]. Однако в отличие от ДЕАЕ-декстрапана коньюгат поли(*L*-лизина) с трансферрином в условиях трансферринфекции не оказывает токсического действия на клетки. Кроме того, этот подход может быть применен не только для трансфекции клеток плазмидными ДНК, но и для рецептор-опосредованной доставки в клетку короткоцепных олигонуклеотидов [44]. В этом случае было показано, что включение антисмыслового олигонуклеотида (комплементарного участку гена с-туб) в ИПЭК с коньюгатом поли(*L*-лизина) и трансферрина увеличивает эффективность эндоцитозного захвата этого олигонуклеотида и придает ему способность специфически ингибировать пролиферацию клеток лейкемии человека (HL-60).

Можно ожидать, что метод трансферринфекции окажется универсальным, поскольку рецепторы, обеспечивающие интернализацию трансферрина, находятся практически на всех клетках. Вместе с тем для рецептор-опосредованного введения в клетку ИПЭК нуклеиновых кислот наряду с трансферрином могут быть использованы и другие лиганды, в частности инсулин. Так, недавно в работе [41] была показана возможность трансформации клеток гепатомы (PCL/PRF/5) комплексами плазмиды pSVRP-8 с коньюгатом поли(*L*-лизина) – инсулин. По-видимому, описанный в настоящем разделе подход может быть широко применен для трансформации самых различных клеток, причем в каждом конкретном случае можно подбирать лиганд, обеспечивающий наиболее эффективную и(или) селективную трансформацию.

АДРЕСНАЯ ДОСТАВКА ДНК В ОРГАНИЗМЕ

Наряду с трансформацией клеток *in vitro* рассматриваемый подход может быть применен и для решения другой важной задачи – адресной доставки нуклеиновых кислот *in vivo*. В этом случае поликатион, образующий ИПЭК, необходимо соединить с молекулой, способной к селективному "узнаванию" клеток-мишеней в организме.

По отношению к клеткам печени в качестве такого "адреса" может быть использован азиалогликопротеин, рецепторы к которому расположены

жены исключительно на гепатоцитах [10]. При инъекции в кровоток крыс раствора ИПЭК, образованного плазмидой pSV2 CAT и конъюгатом поли(*L*-лизина) с азиалогликопротеином, происходит направленный транспорт ДНК к клеткам печени [10]. Через 10 мин после введения ИПЭК в кровоток около 85% включенной в комплекс ДНК обнаруживается в печени, в то время как нативная ДНК в этих условиях находится в основном в крови. Более того, через 24 ч после введения ИПЭК в гомогенате печени обнаруживается активность хлорамфениколацетилтрансферазы, что свидетельствует об экспрессии CAT-гена в гепатоцитах. В других органах (селезенка, почки, легкие) активность этого фермента не регистрируется. Таким образом, включая ДНК в растворимый ИПЭК, содержащий азиалогликопротеиновый вектор, можно провести направленную трансформацию гепатоцитов *in vivo*. Недавно этот подход был применен для частичной коррекции генетической анальбумемии у крыс [45].

Рассматриваемый подход, по-видимому, является универсальным и может быть использован для адресной доставки генетического материала в различные органы. В частности, Трубецкой и др. [46] разработали систему для направленного транспорта нуклеиновых кислот в эндотелиальные клетки легких мыши, основанную на использовании в качестве "переносчиков" ДНК конъюгатов поли(*L*-лизина) с моноклональными антителами к поверхностным антигенам легких.

В плане создания систем для направленной доставки нуклеиновых кислот в организме и генетической трансформации *in vivo* принципиально важным является то обстоятельство, что ИПЭК представляют собой термодинамически устойчивые, самособирающиеся частицы, которые образуются при простом смешении растворов ДНК и поликатиона. Данные экспериментов по рестрикции (рис. 5) свидетельствуют о том, что включение молекулы ДНК в ИПЭК может предотвратить ее расщепление нуклеазами, присутствующими в организме, например, в кровотоке. Таким образом молекула ДНК может избежать разрушения на своем пути к клетке-мишени.

Иными словами, частицы ИПЭК можно рассматривать как модели "искусственных вирусов" с ядром, образованным молекулой ДНК (или РНК?) и оболочкой, содержащей рецептор-узнавающие молекулы. Такие искусственные вирусы способны взаимодействовать с клеточной мембраной и "инффицировать" клетку.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прошло более четверти века с момента появления первых работ [20, 47], посвященных исследованию ИПЭК нуклеиновых кислот с линейными поликатионами. Примечательно, что уже в этих ранних исследованиях были обнаружены та-

кие важнейшие свойства ИПЭК, как способность вступать в реакции интерполиэлектролитного обмена, анализировался кооперативный характер образующих комплекс межцепных солевых связей, описаны явления равномерного распределения поликатиона между молекулами ДНК или диспропорционирование ИПЭК в зависимости от состава комплекса.

Последующие физико-химические исследования ИПЭК были преимущественно сосредоточены на комплексах, образованных синтетическими полионами [18, 19, 25], и лишь недавно комплексы ДНК вновь попали в поле зрения физикохимиков [28]. Для этого, как нам кажется, есть по крайней мере три причины.

Во-первых, изучение закономерностей образования и свойств комплексов нуклеиновых кислот, а также особенностей их взаимодействия со структурными элементами клетки и молекулярными объектами, моделирующими клеточные структуры (например, липосомами), важно для понимания механизмов описанных в настоящем обзоре процессов генетической трансформации клеток с помощью ИПЭК ДНК. Такие данные совершенно необходимы для разработки новых, более эффективных систем направленного транспорта генетического материала.

Во-вторых, помимо практического эти вопросы представляют значительный фундаментальный интерес. Дело в том, что ИПЭК ДНК с природными поликатионами (полиаминами, гистонами и др.) служат важнейшими структурными элементами упаковки генетического материала как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. Закономерности образования таких элементов, и в первую очередь их превращения (например, деконденсация хроматина при переходе из метафазы в интерфазу), видимо, предмет изучения не только для молекулярных генетиков, но и для физикохимиков. Последние, в свете имеющихся представлений, располагают возможностями использовать хотя и простые, но вполне адекватные модели.

В-третьих, исследование ИПЭК ДНК может стать источником новых плодотворных идей в области поликомплексов. Дело в том, что в отличие от большинства других изученных поликатионов ДНК способна образовывать высокоупорядоченные межмолекулярные (A-, B- и Z-формы) и внутримолекулярные (сверхспирализация) структуры. Особенности взаимодействия таких структур с поликатионами (например, реакции замещения в системах, содержащих линейные и кольцевые плазмиды, нативную и денатурированную ДНК и т.д.) – превосходный предмет для изучения диапазона и механизмов конформаци-

онных превращений компонентов ИПЭК, обусловленных комплексованием.

Все изложенное выше в полной мере относится к комплексам РНК с синтетическими поликатионами, исследование которых, насколько мы знаем, практически еще не началось. В этой связи, возвращаясь к основной теме нашего обзора, мы подчеркнем, что задача доставки РНК в клетку до сих пор не решена. Не исключено, что рассмотренные выше подходы могут оказаться полезными для решения и этой важной задачи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. DNA Cloning. A Practical Approach / Ed by Glover D.M. Oxford: IRL Press, 1985.
2. Graham F., van der Ed A. // Virology. 1973. V. 52. P. 456.
3. Sompayrac L., Danna K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 7575.
4. Potter H., Weir L., Leder P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 7161.
5. Capecchi M.R. // Cell. 1980. V. 22. P. 479.
6. Gitman A.G., Graessmann A., Loyter A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 7309.
7. Wang C.-Y., Huang L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 87. P. 3410.
8. Zenke M., Steinlein P., Wagner E., Cotten M., Beug H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 3655.
9. Malone R.W., Felgner P.L., Verma I.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6077.
10. Wu G.Y., Wu C.H. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 14621.
11. Wu G.Y., Wu C.H. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 887.
12. Кабанов А.В., Киселев В.И., Чикиндас М.Л., Астафьева И.В., Глухов А.И., Гордеев С.А., Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Левашов А.В., Северин Е.С., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 306. С. 226.
13. Behr J.-P., Demeneix B., Loeffler J.-P., Perez-Mutul J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6982.
14. Kabanov A.V., Astafieva I.V., Chikindas V.L., Rosenblat G.F., Kiselev V.I., Severin E.S., Kabanov V.A. // Biopolymers. 1991. V. 31. P. 1437.
15. Kabanov A.V., Astafieva I.V., Maksimova I.V., Lukandin E.M., Georgiev G.P., Kabanov V.A. // Bioconjug. Chem. (in press).
16. Kabanov A.V., Alakhov V.Yu., Chekhonin V.P. // Soviet. Sci. Rev., D. Physicochemical Biology / Ed. by Skulachev V.P. N.Y.: Harwood Academic Publishers, 1992. V. 11. P. 1.
17. Kabanov A.V., Akakhov V.Yu. // J. Contr. Rel. (in press).
18. Изумрудов В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. // Успехи химии. 1991. Т. 60. С. 1570.
19. Kabanov V.A., Zezin A.B. // Soviet. Sci. Rev. B. Chemistry / Ed. by Volpin M.E. N.Y.: Harwood Academic Publishers, 1984. V. 4. P. 207.
20. Miller R., Bach D. // Biopolymers. 1968. V. 6. P. 169.
21. Kabanov V.A., Kabanov A.V., Astafieva I.N. // Polym. Preprints. 1991. V. 32. P. 592.
22. Wagner E., Cotten M., Foisner R., Birnstein M.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 4255.
23. Behr J.-P. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 5861.
24. Сухишвили С.А., Обольский О.Л., Астафьевна И.В., Кабанов А.В., Ярославов А.А. // Высокомолек. соед. А. 1993. Т. 35. № 11. С. 1895.
25. Kabanov V.A. // Polymerization in Organized Media / Ed. by Paleos C.M. Philadelphia: Gordon and Breach Science Publishers, 1992. P. 369.
26. Bakeev K.N., Izumrudov V.A., Kuchanov S.J., Zezin A.B., Kabanov V.A. // Macromolecules. 1992. V. 25. P. 4249.
27. Izumrudov V.A., Bronich T.K., Saburova O.S., Zezin A.B., Kabanov V.A. // Makromol. Chem., Rapid Commun. 1988. V. 9. P. 7.
28. Кабанов В.А., Жирякова С.И., Каргов С.И., Зезин А.Б., Изумрудов В.А. // Докл. РАН. 1993. Т. 329. С. 66.
29. Гринюс Л.П. Транспорт макромолекул у бактерий. М.: Наука, 1986.
30. Прозоров А.А. Генетическая трансформация и трансфекция. М.: Наука, 1980.
31. Petrukhina O.O., Ivanov N.N., Feldstein M.M., Vasilev A.E., Plate N.A., Torchilin V.P. // J. Contr. Release. 1986. V. 3. P. 137.
32. Walter A., Steer C.J., Blumenthal R. // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 861. P. 319.
33. Ohki S., Duax J. // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 861. P. 177.
34. Schroeder U.K.O., Tirrel D.A. // Macromolecules. 1989. V. 22. P. 765.
35. Takahashi H., Matuoka S., Kato S., Okhi K., Hatta I. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1069. P. 229.
36. Brashford C.L., Alder G.M., Menestrina G., Miklem K.L., Murphu J.J., Pasternak C.A. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 9300.
37. Shen W.G., Ryser H.J.-P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 1872.
38. Ryser H.J.-P., Shen W.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 3867.
39. Ryser H.J.-P., Shen W.C. // Targeting of Drugs and Synthetic Systems / Ed. by Gregoriadis G., Senior J., Poste G. New York: Plenum Press, 1986. P. 103.
40. Leonetti J.-P., Degals S., Lebleu B. // Bioconjugate Chemistry. 1990. V. 1. P. 149.
41. Розенкранц А.А., Яченев С.В., Соболев А.С. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 312. С. 493.
42. Wagner E., Zenke M., Cotten M., Beug H., Birnstein M.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 3410.
43. Cotten M., Langle-Rouault F., Kirlappos H., Wagner E., Mechtler R., Zenke M., Beug H., Birnstein M.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 4033.
44. Citro G., Perrotti D., Cucco C., D'Aguano I., Sacchi A., Zupi G., Calabretta B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 7031.
45. Wu G.Y., Wilson J.M., Shalaby F., Grossmann M., Shafritz D.A., Wu C.H. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 14338.
46. Trubetskoy V.S., Torchilin V.H., Kennel S.J., Huang L. // Bioconjugate Chem. 1992. V. 3. P. 323.
47. Bach D., Miller I.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1966. V. 114. P. 311.

Interpolyelectrolyte Complexes of Nucleic Acids as a Means for Targeted Delivery of Genetic Material to the Cell

A. V. Kabanov and V. A. Kabanov

*Moscow State University
Moscow, 119899 Russia*

Abstract – The prospects of using interpolyelectrolyte complexes (IPEC) of DNA with polycations to deliver genetic material to the cell are reviewed. IPEC are formed in solutions of DNA and polycation due to a cooperative system of interchain electrostatic bonds. Physicochemical characteristics of IPEC, including solubility and the size and the surface charge of IPEC particles are controlled by IPEC composition, which is described as the polycation : DNA ratio expressed in base-mole units of each component. Incorporation into IPEC significantly affects the properties of DNA; it becomes more compact and stable to cleavage by nucleases. Transformation of *B. subtilis* is used to illustrate the incorporation of plasmid into IPEC with carbochain polycation, which significantly enhances the transforming activity. These IPEC can bind to animal cells and exhibit endocytosis. An effective procedure for transfection of animal cells is reported, which involves incorporation of plasmid DNA into complexes with carbochain polycations and lipopolyamines. IPEC-based structures are also used to deliver DNA via a receptor-mediated pathway. For this purpose, the molecule of polycation [poly(*L*-lysine)] that enters into the complex is covalently bound to the ligand; this ensures endocytosis of IPEC and transfection of the cells. A similar approach was used for targeted delivery of genetic material to the target cells in the body. In this case, the polycation combines with antibodies or other molecules that can selectively interact with the target.