

УДК 616-055.5/7-085

© Коллектив авторов

НЕВИРУСНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ *IN VIVO* В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Е.В. БОГДАНЕНКО, Ю.В. СВИРИДОВ, А.А. МОСКОВЦЕВ
и Р.И. ЖДАНОВ

НИИ биомедицинской химии РАМН, Москва 119832

Рассмотрены литературные данные по использованию *in vivo* искусственных макромолекулярных комплексов для переноса и доставки функциональных генов.

Невирусные методы переноса генов являются наиболее безопасными в генной терапии человека. Для данной цели наиболее подходят катионные липосомы, содержащие холестерин, т.к. они обладают высокой биodeградируемостью и в тоже время устойчивостью в кровотоке. Комплексы ДНК-липосомы должны содержать ДНК в максимально защищенном от воздействия ферментов, состоянии, быть довольно однородными и небольшими (40-80 нм) по размеру. Наиболее эффективно введение комплексов непосредственно в кровеносную систему. Тканеспецифичности, в перспективе, можно достичь подбором специфических лигандов. Для повышения уровня экспрессии генов перспективно связывать липосомы с вирусными пептидами.

Ключевые слова: генная терапия, перенос и доставка генов, невирусные векторы, структура геносом и активность трансфекции, геносомы, тропность геносом *in vivo*.

ВВЕДЕНИЕ. Новая биомедицинская технология – генотерапия [1-4] – ставит своей целью коррекцию нарушений функционирования генома при помощи двух основных подходов: 1) замены дефектного участка генома нормальным (например, с помощью химеропластов – гибридных ДНК/РНК олигонуклеотидов [3,5]) и 2) введения в организм функционально активных генов, продуцирующих необходимые белки или гормоны [3,4], или антисенс-олигодезоксирибонуклеотидов, регулирующих функциональную активность целевых генов [6].

В то время как работы по доставке генов *in vitro* и в экспериментах с культурами эукариотических клеток ведутся уже в течение последних десяти лет,

в результате чего разработан ряд эффективных методик, перенос генов в многоклеточных организмах, особенно таких высокоорганизованных, как млекопитающие, менее изучен. Это связано с тем, что транспорт в целевые клетки в них гораздо более сложен и многоступенчат и включает в себя целый ряд системных физиологических и структурных барьеров. Среди них можно назвать барьеры с разной проницаемостью (например, эндотелий стенки сосудов), иммунный надзор, метаболическую деградацию вводимых веществ. В отличие от большинства фармакологических препаратов с низкой молекулярной массой и, соответственно, низкой иммуногенностью, вводимые генотерапевтические конструкции имеют массу, способную привести к возникновению иммунного ответа. Таким образом, для транспорта макромолекулярных комплексов важны взаимодействия как на молекулярном и клеточном, так и суборганном, органном и организменном уровнях.

Наиболее распространенным в современной генотерапии способом коррекции дефектов генома и других патологий является введение в ткани и клетки терапевтических генов в составе вирусных векторов [3,4,7-10] или искусственных макромолекулярных комплексов невирусной природы [3,11-16].

ВИРУСНЫЕ И НЕВИРУСНЫЕ ВЕКТОРНЫЕ СИСТЕМЫ

Преимуществом вирусных векторов являются их высокая специфичность и эффективность: сродство к определенным тканям (в частности, вектора на основе вируса простого герпеса обладают тропностью к нервной ткани [10]) и наличие ядерного сигнала, обеспечивающего высокий уровень экспрессии вносимых генов [7,8]. Однако у вирусных систем доставки есть и ряд недостатков. В частности, ретровирусы, на основе которых были созданы первые вирусные векторы, потенциально патогенны, поскольку обладают онкогенными последовательностями [8].

Вирусные векторы индуцируют иммунный ответ той или иной силы [17] (что наиболее актуально для аденовирусных конструкций [18], введение которых больным обычно сопровождается симптомами, характерными для ОРВИ). Такие векторы могут иметь и другие нежелательные эффекты, например, встраивание в геном может привести к нарушению регуляторных элементов различных генов (вставочный мутагенез; ретровирусные векторы). Вследствие индукции вирусными векторами иммунного ответа затруднено проведение повторных курсов лечения [17].

Размер генетических конструкций, которые могут быть включены в геном вирусов, ограничен. Кроме того, стоимость "сборки" некоторых вирусных векторов составляет довольно значительные суммы и существенно удорожает стоимость протоколов генотерапии в клинике, которая может составлять в настоящее время до 200 - 500 тысяч долларов. Так, в отличие от дешевых ретровирусных конструкций цена упаковки (10^{13} инфекционных частиц) аденоассоциированного вектора три года назад составляла 5 тысяч долларов [Keystone Symposium, 1997].

В отличие от вирусных, большинство невирусных систем относительно не ограничено в емкости, не обладает мутагенностью и низкотоксично. Существует три используемые в настоящее время основные группы методов переноса функциональных генов без участия вирусов:

1) Использование "голой" нуклеиновой кислоты (naked DNA), при котором плазмидная ДНК может быть непосредственно трансфицирована в

мышечные клетки с помощью прямых инъекций [19] или введена с помощью т.н. "генного пистолета", выстреливающего микрочастицы из золота\вольфрама с нанесенной на них ДНК [20]. Первому подходу - ДНК-иммунизации - сейчас придается большое значение, ею активно занимаются многие лаборатории за рубежом и у нас в стране. В США созданы даже фирмы, специализирующиеся на т.н. "трансдермальной" ДНК-иммунизации - внесении генетических конструкций в организм через кожу с помощью специальных кремов. Простота данного подхода в сочетании со всеми преимуществами невирусной доставки привели к развитию технологии ДНК-вакцин [21]. Они были разработаны для тех патогенов, к которым не существует обычных вакцин, либо они малоэффективны. В ряде случаев, однако, была показана низкая эффективность ДНК-вакцин по сравнению с белковыми вакцинами [22].

2) Применение катионных (фосфо)липидных везикул или липосом. В этом методе ДНК спонтанно связывается с внешней поверхностью катионных липосом, нейтрализуя свой отрицательный заряд, а образующиеся при этом комплексы - геносомы - взаимодействуют с клеточной мембраной [23]. Таким способом - липофекцией - могут быть трансфицированы более 90 % клеточных линий. Включение небольшого количества анионного липида в липосому приводит к ассоциации ДНК с внутренней поверхностью мембраны липосом, что защищает ДНК от ферментативной деградации [24]. Для облегчения эндоцитоза в липосому могут быть включены белки, такие, как анти-МНС антитела [25], трансферрин [26], вируса Sendai или его F-белок, позволяющие плазмидной ДНК попасть из эндосомы в цитоплазму, избежав тем самым деградации [27]. Возможно также включение в липосому генов вируса Epstein - Barr для обеспечения функционирования плазмиды/геносомы как эписомы [24].

3) Использование искусственных макромолекулярных систем, состоящих из синтетических пептидных, катионных или липидных лигандов, в частности, гидрофобных поликатионов. Эффективность переноса и доставки генов *in vivo* с помощью таких систем может быть существенно улучшена по сравнению с получаемой при липофекции. Важными группами таких векторов являются системы, которые содержат специальные сигналы, обеспечивающие транспорт генов в ядро, и системы на основе полисахаридов и углеводных адресных групп, обеспечивающие транспорт генетических конструкций/геносом в специфические ткани. Эти две группы невирусных векторов в данной работе рассматриваться не будут.

ГИДРОФОБНЫЕ ПОЛИКАТИОНЫ

Характеристика катионных липосом и их комплексов с ДНК.

В связи со способностью взаимодействовать электростатически с отрицательно заряженными поверхностями мембран клеток и макромолекулами, а также свойственной им гидрофобностью катионные липиды характеризуются способностью легко проникать в ткани и клетки. Поэтому возможно применять их как транспортные системы для переноса различных субстанций *in vivo*, а также для пролонгирования действия различных веществ. Катионные липосомы являются наиболее реакционноспособными из невирусных средств доставки генов в клетки эукариот, что и определяет их широкое использование [11].

Химическое строение.

Для переноса генов в комплексах с ДНК *in vivo* использовались липосомы DOTMA (N-1(2,3-диолеилокси)пропил-N,N,N-триметиламмонийхлорид) [28],

DLS (смесь 1:1 диоктадециламидоглицилспермидина и диолеилфосфатидилэтанолamina (DOPE)) [29], DOPE в смеси 1:1 с DOTMA и с DOTAP (1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний пропан) [29,30], а также DDAB (диметилдиоктадециламмоний бромид) и DOTAP в смеси 1:1 с холестерином [30,31] и DOPE и DDAB в смеси 1:1 с холестерином (все указанные соотношения - молярные). Указанные соединения применялись чаще других. В табл. 1 приведены коммерческие препараты липидов для получения геносом в целях генной терапии [11].

Достоверно более высокая экспрессия во многих органах обнаруживалась при использовании холестеринсодержащих липосом DODAB (диоктадецилдиаммоний бромид) :Chol (Холестерин), DOIC (1-(2-(олеилокси)-этил)-2-олеил-3-(2-гидроксиэтил) имидазолин хлорид):Chol и DOTAP:Chol по сравнению с другими, в отличие от липосом на основе нейтральных липидов *in vitro* [30,32,33]. Известно, что холестерин способствует увеличению стабильности липосом в кровяном русле. Кроме того, его применение увеличивает последующее биоразрушение липосом и значительно повышает эффективность трансфекции *in vivo* [30].

Сообщалось также о 100-кратном превышении уровня экспрессии гена хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) у мышей в случае, когда он переносился в комплексе с липосомами, приготовленными из GAP-LRIE ((+/-)-N-(3-аминопропил)-N,N-диметил-2,3-бис(додецилокси)-1-пропанамина бромид) и DOPE, по сравнению с использованием "голой" ДНК [34]. Долговременная экспрессия в легких, печени и селезенке мышей наблюдалась и при введении в хвостовую вену геносом на основе диоктадециламидоглицилспермидин-DOPE липосом и гена люциферазы, встроенного в эписомально реплицируемый плазмидный вектор [35].

На модели мышей *nude* с перитонеальными рассеянными опухолями перенос гена тимидин-киназы простого герпеса (HSV-tk) липосомами, содержащими DC-6-14(O,O'-дитетрадеканол-N-(альфа-триметиламмоний-ацетил)диэтанолamинохлорид), DOPE и холестерин в молярных соотношениях 1:0,75:0,75 и 1:1:0,8, с последующим введением ганцикловира, приводил к значительному увеличению продолжительности жизни опытных животных [36].

Наиболее общим положением при использовании катионных липосом может быть вывод, что *in vivo* диолеилсодержащие вещества оказались намного более эффективными, чем самые лучшие для трансфекции *in vitro* димиристоильные производные.

На рис. 1 представлена структура некоторых катионных липидов, используемых для получения геносом.

Структура комплексов катионные липиды-ДНК.

Связь между формой и структурой геносом и их взаимодействием с клетками, а также между эффективностью переноса генов и уровнем экспрессии пока остается неясной [37]. Методом электронной криомикроскопии высокого разрешения было обнаружено несколько форм комплексов. В случае с DOTAP и DOTMA/Chol липосомами наблюдали сферические геносомы с ДНК, конденсированной внутри геносомы, в то время как в случае с DODAB/Chol, DODAB (диоктадецилдиаммонийбромид)/DOPE, DOIC/Chol, DMEPC (димиристоилэтилфосфатидилхолин)/Chol, DMEPC/DOPE, DOTMA/DOPE и

DOTMA/Chol они имели иную структуру [11]. Шагом вперед можно считать липосомальную форму из DOTAP и холестерина 1:1,

Таблица 1. Коммерческие препараты катионных липидов (по данным [11]).

Название	Состав	Концентрация		Производитель	Цена, USD /мг	Молекулярная масса (Да)	Катион/моль	Типы клеток
		мг / мл	мМ					
ЛИПОФЕКТИН	DOTMA: DOPE (1:1)	1	1,45	^а LTI	133	678	0,53	BHK-21, CHO-K1, HeLa
ЛИПОФЕКТАМИН	DOSPA: DOPE (3:1)	2	2,04	LTI	172	977	3,36	BHK-21, HeLa, CHO-K1
ЛИПОФЕКТЕЙС	DODAB: DOPE (1:2,5)	1	1,41	LTI	99	708	0,32	HeLa, BHK-21, CHO-K1
DOTAP	DOTAP	1	1,36	^б В-М	130	732	1	BHK-21, HeLa, COS7
СЕЛЛФЕКТИН	^ж TMTPSp: DOPE (1:1,5)	1	1,12	LTI	149	891	1,12	CHO-K1, COS, BHK-21
ТРАНСФИКТАМ	DOGS	1	1,11	^з PM	295	902	4	HeLa, HepG2, PC12
TFX-50	TDA:DOPE (1:1)	-	2,1	PM	175	891	1	HepG2, 293, COS 7, HeLa
DC-Chol:	DC-Chol: DOPE (3:2)	-	2,0	-	-	606	0,62	A431, A459, 1B HeLa, L929
DOSPER	DOSPER	1	0,92	В-М	-	1089	4	CHO-K1, HepG2, HeLa

^а В приблизительных ценах в USD /мг раствора липосом.

^б Рассчитано для смеси. Некоторые цифры приблизительны, поскольку о точных структурах и counter ионах не сообщается.

^в положительный заряд на моль соединения [e⁺/M].

^г Многие другие клеточные линии, более ста, были трансфицированы с помощью этих китов катионных липосом. Однако эффективность трансфекций отличалась в 1000 раз для различных типов клеток.

^а Life Technologies, Inc. (Gibco). ^б Boeinger – Mannheim. * Тетраметил тетрапальмитил спермин. ^з ProMegaTM.

^ж N,N,N,N - тетраметил-N,N- бис(2-гидроксиэтил) - 2,3-диолеоилокси - 1,4 - бутандиаммоний йодид. Соединение продается в виде сухой липидной пленки, для эксперимента ее гидратируют и используют полученные мультисамеллярные везикулы (от 150 до 350 нм, рекомендовано 2,1 мМ. Используется соотношение моль/моль).^к Используются R-Gene, Университет Питтсбурга. ^л 1,3 - диолеокси - 2 - (6 - карбоксиспермил) - пропиламид.

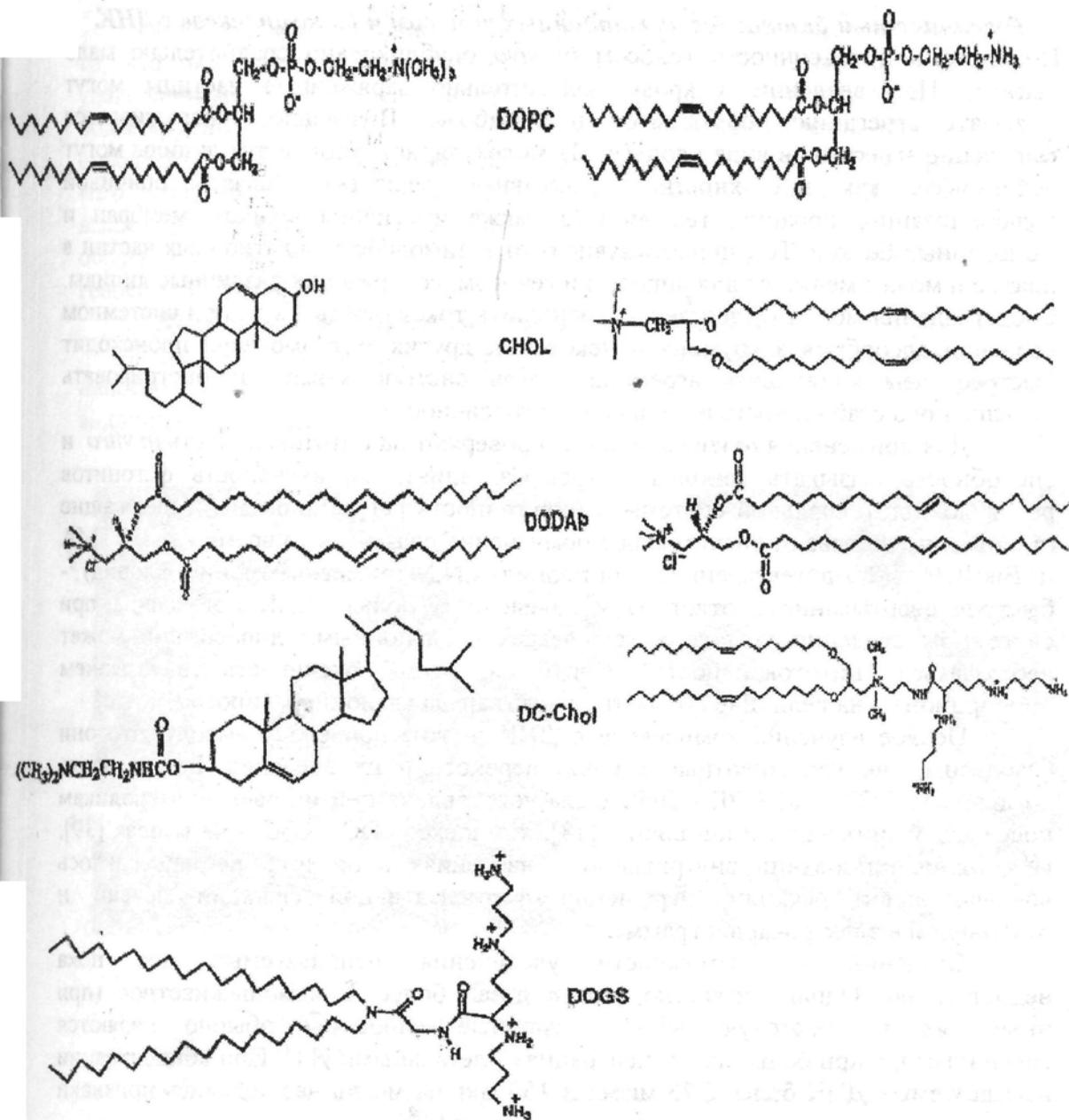


Рисунок 1.

Катионные липиды и поликатионы, используемые для переноса генов *in vivo*.

использованию Templeton et al. [30]. В ней ДНК конденсировалась на внутренней стороне вогнутой липосомы, между двумя липидными бислоями. Так как в данном случае ДНК была надежно защищена от разрушающих воздействий в организме животного, то наблюдался высокий уровень генной экспрессии *in vivo*. Есть сведения о том, что при добавлении к липосомам относительно больших количеств ДНК может происходить агрегация с увеличением размера везикул. формируются мультислойные комплексы, содержащие более 10 слоев [38].

Токсичность и безопасность катионных липосом и их комплексов с ДНК.

По системной токсичности геносом *in vivo* опубликовано сравнительно мало данных. При введении в кровь положительно заряженные частицы могут вызывать агрегацию тромбоцитов и тромбозы. Визуально обнаруживается выпадение агрегатов в виде хлопьев. На молекулярном уровне эти липиды могут действовать как поверхностно - активные вещества, являясь причиной солюбилизации, порации, гемолиза, а также изменения свойств мембран и мембранных белков. Токсичность зависит от взаимодействия катионных частиц в плазме и может меняться для липосом и геносом, содержащих различные липиды. Биодegradация может существенно уменьшить токсичность. Если при системном введении адсорбция альбумина и некоторых других макромолекул происходит быстрее, чем коллоидная агрегация, такая система может демонстрировать повышенную стабильность и уменьшение токсичности.

Для применения *in vivo* липосомы проверяют на цитотоксичность *in vitro* и способность вызывать гемолиз и тромбоз, влиять на активность фагоцитов ретикуло-эндотелиальной системы и пирогенность [11]. Липосомы, содержащие стериламин, вызывают значительное помутнение плазмы, в то время как DOTMA и BisHOP (2,3-дигексадецилоксил-пропил-N,N,N-триметиламмоний хлорид) - быстрое свертывание в ответ на их введение. "Голая" ДНК нетоксична при системном введении, однако в комплексах с катионными липосомами может наблюдаться цитотоксичность. Считается, что токсичность в среднем пропорциональна величине положительного заряда катионных липосом.

Первое изучение комплексов с ДНК *in vivo* привело к выводу, что они безопасны, так как животные хорошо переносили их введение. Безопасность комплексов DOTMA/DOPE - ДНК была установлена при их введении кроликам посредством инъекций и ингаляций [13], комплексов DC - Chol - на мышах [39]. При их использовании внутривенно и введениях в опухоли не наблюдалось воспалительной реакции, нарушений ферментативной функции печени и отклонений в электрокардиограмме.

Сведений о возможности увеличения используемых доз пока недостаточно. Однако известно, что в дозах более 1 мкмоль/животное (при инъекциях в хвостовую вену) катионные липосомы обычно являются токсичными, а при больших концентрациях - летальными [11]. При концентрации используемых ДНК более 0,75 мг/мл и 150 мкг на мышь наблюдались признаки токсичности катионных геносомных комплексов [30].

Зависимость эффективности трансфекции от размера геносом. Практика показала безусловное преимущество однородных по размерам экструдированных липосом по сравнению с получаемыми озвучиванием или детергентным диализом. Экструдированные липосомы, благодаря близости их размеров и малой разнице в скорости осаждения, могут формировать комплексы с более высокой концентрацией коллоидной (суспендированной) ДНК. Геносомы (ДНК-липидные комплексы) для применения *in vivo* обычно готовят смешиванием коллоидных растворов ДНК и липосом с инкубацией от 30 минут и более. Они получают довольно гетерогенными по размерам, форме и плотности. Попытки сделать их более гомогенными основываются на оптимизации условий смешивания и инкубации, выделения различных фракций (в основном центрифугированием по плотности) и специальной обработке.

Необходимым условием для эффективности комплексов *in vivo* является то, что они должны быть достаточно небольшими, плотными и тщательно упакованными. Можно ожидать, что в случае больших липосом комплексы будут более крупными, и наоборот. В зависимости от размеров клеток-мишеней можно определить оптимальный размер геносом от 50 до 300 нм. В экспериментах *in vitro* показано, что чем больше размер комплексов геносом (200-400 нм), тем выше эффективность трансфекции. Для экспериментов *in vivo* имеет место обратная ситуация: эффективность трансфекции выше для небольших частиц геносом (40-80 нм).

Взаимодействие липосом с клетками *in vitro* и *in vivo*.

Рис. 2 иллюстрирует четыре различных пути взаимодействия комплексов липосом с ДНК (геносом) с клеткой. Это липидный обмен, адсорбция, слияние и эндоцитоз.



Рисунок 2.

Механизмы проникновения геносом в клетку и ядро.

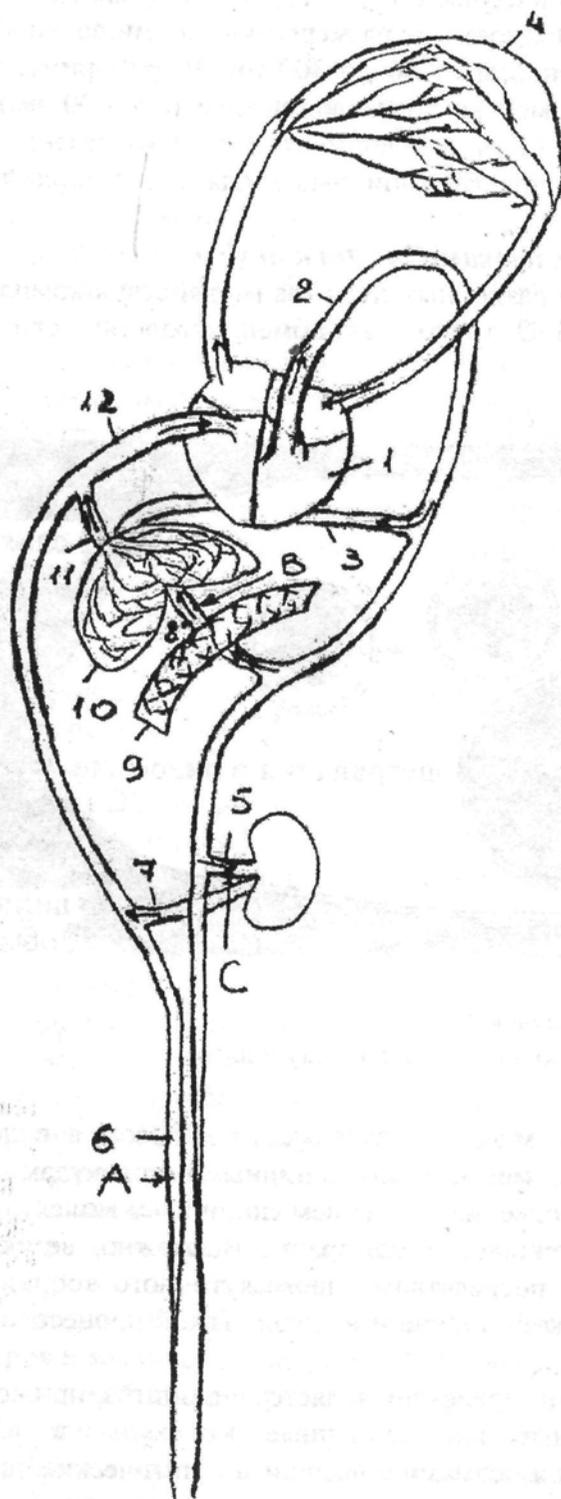
В первом случае, благодаря малой растворимости липосом в воде, они могут обмениваться с клеточными мембранами липидными молекулами, в то время как адсорбция в случае с более мелкими, чем липидные, молекулами, в меньшей степени зависит от изменчивости мембраны. Возможно, везикулы и клеточная мембрана сливаются посредством промежуточного образования инвертированной мицеллы с короткой липидной ножкой. Такой процесс, однако, встречается редко.

Наиболее важным видом взаимодействия является эндоцитоз, при котором клетка заключает адсорбированные или связанные молекулы в вакуоли (эндосомы). После слияния с лизосомами, несущими литические агенты, происходит переваривание липосом, а также, возможно, и переносимого агента.

Результат взаимодействия липосом с тканями организма во многом зависит от способа введения (Рис. 3).

При оральном способе липосомы разрушаются в пищеварительном тракте при низких значениях рН, липазами и детергентным действием желчных солей.

Введение в кровяное русло обычно приводит к их захвату клетками ретикуло-эндотелиальной системы, в основном макрофагами печени и селезенки. Сразу же



- 1- сердце
- 2- аорта
- 3- печеночная артерия
- 4- легочная капиллярная сеть
- 5- почечная артерия
- 6- хвостовая вена
- 7- почечная вена
- 8- воротная вена печени
- 9- кишечник
- 10- капиллярная сеть печени
- 11- печеночная вена
- 12- нижняя полая вена

Способы введения:

- А) внутрибрюшинное,
- В) воротная вена печени,
- С) артерия почек.

Рисунок 3.

Схема внутренних органов и кровеносной системы мыши (крысы) и способов введения геносом.

после инъекции липосомы адсорбируются на ближайшей поверхности или покрываются белками плазмы (вероятно, в основном альбуминами). Они также могут вызывать агрегацию отрицательно заряженных клеток. Необходимо поэтому, чтобы они были стабильны в биологических средах. Действительно, весьма эффективные в переносе генов комплексы с DMEPC/Chol и DOIC/Chol циркулируют в плазме часами без деградации. Нестабильность комплексов может приводить к закупорке капилляров. Кроме того, они должны подвергаться эндоцитозу или сливаться с клетками.

Структурная модель геносом.

Геносомы могут содержать различное число липидных бислоев с адсорбированной ДНК, расположенной на поверхности между двумя бислоями. Небольшие комплексы более пригодны для эндоцитоза, так как ДНК в неконденсированной форме слишком велика, чтобы эффективно интернализироваться в клетку. Комплексы, приготовленные из мелких катионных липосом в растворах малой ионной силы, обычно очень плотные, размером от 200 до 400 нм, содержат от 5 до 15 конденсированных молекул ДНК. Высокая концентрация малых частиц ДНК важна для того, чтобы комплекс был эффективным *in vivo*.

Фармакокинетика и биораспределение.

Несмотря на тот факт, что проведено сравнительно много исследований по переносу генов геносомами *in vivo*, не опубликовано ни одного тщательного исследования по биораспределению комплексов катионных липосом с ДНК. С этой целью в них можно ввести флуоресцентный зонд или ¹⁴C-метку, которые будут взаимодействовать с ДНК, липидными бислоями или с тем и другим. Однако опубликованы лишь работы по исследованию биораспределения и фармакокинетики комплексов, содержавших DC-Chol:DOPE (1:1) липосомы диаметром от 150 до 200 нм [40,41] с использованием радиоактивно меченного ³H - холестероил - гексадецилового эфира. В табл. 2 суммированы основные результаты некоторых работ по экспрессии функциональных генов *in vivo*.

После внутривенного введения катионные липосомы уходят из системы циркуляции за несколько минут [40,41]. Большая часть радиоактивной метки аккумулировалась в легких, но быстро уменьшалась (через 15 мин. - 18% вводимой дозы, через 1 час - 4%, через 1 день - 2,5%); фракция в сердце значительно не менялась (5%), в то время как в селезенке она возрастала (14% через 1 час, 20% через 4 часа и 18% через 1 день); в печени радиоактивность оставалась неизменной во времени от 15 мин. до 1 час. после введения (27%), а затем начинала снижаться (25% через 4 часа и 22% через 1 день) [40,41]. При внутривенном введении комплекса вышеуказанных липосом с ДНК были получены подобные результаты [40,41], что говорит о возможности прогнозирования распределения комплексов до их использования с репортерными генами. Поскольку плазмиды с такими генами весьма дорогие, подобное тестирование липосом для их переноса является актуальной задачей.

В лаборатории генной терапии ИБМХ РАМН изучалось распределение комплексов с новой группой перспективных переносчиков - моно-, ди- и трипроизводными сополимера гексаэтилен/пропиленимина (холенимов) при использовании тотальной ДНК, меченой по ¹⁴C-тимидину (рис. 3,4) (данные

Таблица 2. Препараты геносом, использованные в экспериментах *in vivo*

Плазмида-репортер	Промотор	Объект эксперимента	Способ доставки	Тип липосом / геносом	Места экспрессии		Длительность экспрессии	Ссылка
					максимальной	минимальной		
CAT (хлорамфениколацетилтрансфераза)	Вирус опухоли молочной железы мыши Тимидинкиназный вирус герпеса	Клеточные линии: почки африканской зеленой мартышки; гепатомы крысы; пристеночных фибробластов; эмбриональных фибробластов в крысы	Инкубирование клеток с: а) сначала с фрагментом рецептора, затем с промотором; б) сначала с промотором, затем с фрагментом рецептора	DOTMA, N-[1(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламоний-хлорид	-	-	менее 5 ч	[28]
Люцифераза (luc)	Рарова-вирус BKV+ вирус саркомы Рауса (RSV)	Мыши	инъекции: внутривенно внутрибрюшинно подкожно	DLS, смесь 1:1 диоктадециламидоглицилспермидина и фосфатидилэтанолamina	Легкие, селезенка, сердце	Печень	До 3 мес. – легкие, печень, селезенка, сердце	[35]
CAT	CMV (человеческий цитомегало вирус)	Мыши	инъекции в хвостовую вену	DOTMA:DOPE 1:1, 1 мкг ДНК:8 нМ липосомных липидов	Легкие, сердце, лимфатические узлы		До 63 дн. – легкие, сердце, лимфатические узлы	[29]
CAT	CMV	- // -	- // -	- // -	Легкие		До 150 дней – легкие	[29]
CAT		- // -	- // -	DOTAP:Chol DDAB:Chol DDAB:DOPE DOTAP: DOPE 1:1	Легкие, сердце, печень (в 75 раз больше, чем в др. статьях)	Тимус, кожа, хвост, прямая кишка, головной мозг		[29]
CAT	CMV, SV40 тимидинкиназный простого вируса герпеса адено-вирус 2	- // -	- // -	DDAB:Chol 1:1	сердце и мышцы (7% клеток) (легкие не определено)	печень		[29]
CAT	CMV	мыши	Внутрибрюшинное введение	DOTMA: DOPE DODAB: DOPE DOTAP: DOPE	селезенка клетки костного мозга лимфоциты		До 2 недель	[29]

готовятся к публикации совместно с О.В. Подобед). Комплексы вводились внутрибрюшинно, в воротную вену печени или почечную артерию. В первом случае распределение комплексов не отличалось от характерного и для липосом: максимальная их концентрация наблюдалась в селезенке и кишечнике. Однако при введении холенимов в воротную вену максимальная концентрация ДНК на 1 мг органа через 1 сутки после введения наблюдалась в печени и селезенке, а не в легких, как этого можно было бы ожидать. Подобное распределение наблюдалось как при соотношении носителя и ДНК 1:1, так и 1:2 (по массе). Введение в левую почечную артерию производилось с использованием геносом на основе дихоленима. В данном случае наблюдалась зависимость концентрации ДНК в органах от ее соотношения с носителем. Когда доли ДНК и дихоленима были равны, максимум радиоактивности наблюдался в легких, почках и затем в сердце, в то время как при соотношении дихоленима и ДНК 1:2 - в сердце, печени

и почках. Возможно, что при введении комплексов в воротную вену во всех случаях и в почечную артерию с соотношением носителя и ДНК 1:2 они оседают в капиллярной сети органа (вследствие своих размеров), но не причиняют ей заметного вреда. Меньший по размерам комплекс дихоленима и ДНК 1:1 может частично пройти через кровеносную сеть почки и концентрироваться в легких, однако его уровень в почках остается весьма значительным. Вероятно, при введениях в почечную артерию комплекса трихоленима и ДНК в соотношении 1:2 можно ожидать еще большего уровня ^{14}C -ДНК в почках, чем с дихоленимом.



1



2

Рисунок 4.

Тропность геносом на основе препаратов ДИХОЛЕНИМ и ТРИХОЛЕНИМ при внутрибрюшинном введении:

1. Содержание ^{14}C ДНК (кислото-осаждаемая фракция) в органах и тканях мышей (ICR) через 24 часа после введения внутрибрюшинно комплекса ДИХОЛЕНИМ/ ^{14}C ДНК 1:1 (w/w), 15 мкг ДНК (6500 срм/мкг)
2. Содержание ^{14}C ДНК (кислото-осаждаемая фракция) в органах и тканях мышей (ICR) через 24 часа после введения внутрибрюшинно комплекса ТРИХОЛЕНИМ/ ^{14}C ДНК 1:1 (w/w), 15 мкг ДНК (6500 срм/мкг)

ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ГЕНОСОМ *in vivo*

Способы введения геносом. Перенос генов посредством катионных липосом *in vivo* впервые был описан в 1989 г. [42] для мышей. Использовались **внутривенное, интратрахеальное и внутрибрюшинное** введения геносом, содержащих маркерный ген. При использовании соотношения ДНК-липиды 1:5 по массе устойчивая экспрессия гена наблюдалась при внутривенном и интратрахеальном введениях (кроме ретикуло-эндотелиальной системы). В первом случае экспрессия была на 50% выше, чем во втором. Подобные эксперименты были проведены на крысах [43]. Сообщалось также о липофекции эмбрионов *Xenopus* и экспрессии гена люциферазы [44].

В других работах при внутрибрюшинном способе введения геносом максимальная экспрессия наблюдалась в селезенке, что связано с особенностями оттока жидкости из брюшной полости [35]. Введение геносом **в хвостовую вену** приводило к экспрессии генов во многих тканях, в том числе в сердце, селезенке, почках, лимфатических узлах, прямой кишке, головном мозге, в клетках костного мозга и периферической крови, однако максимальная экспрессия была отмечена в эндотелиальных клетках легких: приблизительно в 2-3 раза выше, чем в других тканях с высоким ее уровнем. [29,32,35]. Это явление объясняется "эффектом первого прохода", поскольку легкие являются первой капиллярной сетью, встречающейся комплексу липосомы-ДНК в кровяном русле и имеют самую большую площадь поверхности капилляров. Кроме простого физического захвата геносом, возможны также их адсорбция и быстропроходящая порация клеточной стенки. Следующим органом на пути комплексов является сердце, и поэтому нет ничего удивительного в том, что именно в нем обычно наблюдается второй по величине уровень экспрессии. Относительно низкий ее уровень в органах ретикуло-эндотелиальной системы - печени и селезенке наблюдается вследствие пониженной активности некоторых плазмид в соответствующих клетках, а также увеличенного переваривания ДНК в макрофагах [11,17].

Внутривенное введение мышам комплексов, несущих гены *p53* и *GM-CSF*, уменьшало ангиогенез в опухолях и их метастазирование, причем в первом случае метастазирование в легких уменьшалось на 80%. Не менее эффективным было введение в хвостовую вену и ангиостатина [45].

При **подкожном способе** введения геносом сильной и устойчивой экспрессии не наблюдалось ни в одном органе.

Генный перенос *in vivo* посредством **внутримышечных инъекций или перорально** был показан в работах, где ДНК конденсировалась в конструкции, представляющие собой цилиндры (рулоны) негативно заряженных бислоев, в которых ионы кальция соединяют вместе отрицательно заряженные поверхности. Индукция антиген-специфической пролиферации Т-хелперных спленоцитов наблюдалась не только после внутримышечного, но и после орального введения этих образований [46].

Известны также и инъекции комплексов в орган локально - например, **в воротную вену печени** [30] и **в почечную артерию** [47]. Уровень экспрессии репортерного гена в легких в первом случае уменьшался в 100 раз по сравнению с обычным внутривенным введением и повышался в указанных органах, однако он все равно был ниже, чем в легких.

Инъекция в мозг мыши маркерных генов в составе геносом с липофектином приводила к экспрессии этих генов, длившейся от 9 дней до 3 недель. Трансфектам (DOGS – диоктадециламиноглицилспермин) был эффективен при трансфекции клеток мозга новорожденных мышей [48, 49].

Имеются сообщения о **переносе геносом в виде аэрозоля**, содержавшего комплекс из конструкции маркерного гена pCIS-CAT и липосом DOTMA/DOPE (1:1 по массе, 100 нмоль), что приводило к экспрессии, длившейся в течение 3 недель. Иммуноокрашивание внутриклеточного белка CAT показало, что большинство живых эпителиальных и альвеолярных клеток дыхательных путей трансфицировано *in vivo* [50].

Canonica et al. [51] описывает внутривенное и интратрахеальное введение маркерных генов в комплексе с липофектином. В первом случае происходила трансфекция легочного эндотелия, а во втором - альвеолярного эпителия, что указывает на зависимость расположения участка экспрессии от способа введения.

После **интраназального введения** комплекса липосом из GAP-LR1E и DOPE и плазмиды с CAT до 1% альвеолярных эпителиальных клеток экспрессировали ген CAT. При использовании методов гистологической иммунохимии было определено, что экспрессия была максимальной между 1 и 3 днями, а повторное введение комплекса давало быстропроходящий эффект [34].

Экспрессия гена хлорамфениколацетилтрансферазы у плодов и новорожденного потомства наблюдалась после введения 133 мкг плазмиды pSV40-CAT, конденсированной с 400 нмоль DOGS, в хвостовую вену беременным самкам мышей [52]. Экзогенная бета-галактозидазная активность наблюдалась и после инъекций комплексов ДНК-DMR1E-C на 11,5 день беременности [53]. Такие эксперименты открыли новые возможности генно-клеточной терапии. Были получены эмбрионы от крольчих, осемененных спермой, прокультивированной в растворе, содержащем плазмиду с геном *Lac-Z*. Их клетки окрашивались в голубой цвет при проведении качественной реакции с X-gal на β-галактозидазу [54]. Данная работа является примером использования сперматозоидов для переноса функциональных генов. Можно трансформировать стволовые клетки в семенниках, которые будут источником спермиев после дифференцировки, что приведет к получению потомства с измененным генотипом.

Роль промотора в уровне экспрессии функционального гена. Наивысшая эффективность липофекции наблюдалась после использования цитомегаловирусного (CMV immediate early), pSV40 early, герпесного (herpes simplex virus thymidine kinase) и аденовирусного (adenovirus 2 major late) промоторов. Первые два промотора дали более чем 50-кратное превышение уровня экспрессии по сравнению с двумя последними.

Дозы, применяемые при введении, и уровни экспрессии. В литературе имеются данные об уровне экспрессии функциональных генов от нескольких пг/мг до 200 нг/мг белка [29, 30, 32]. В работе Thiery et al. [35] после введения 25 мкМ ДНК с липосомами диоктадециламидоглицилспермидин-DOPE (при $p=1/5,6$) в хвостовую вену мышей в тканях производилось около 100-200 фетаграмм люциферазы на 1 мг белка, а максимальная экспрессия достигала 7,5 пг (в легких при введении 300 мкг плазмиды с ДНК), 1 пг (в селезенке при введении 100 мкг) и 700 фг (в печени при введении 50 мкг).

В серии статей Дебс и соавт. эффективной для экспрессии гена CAT (хлорамфениколацетилтрансферазы) после введения в хвостовую вену оказалась система DOTMA:DOPE, причем зависимость экспрессии от дозы была обнаружена для легких, сердца и печени. Экспрессию CAT, подобную таковой при однократных введениях геносом, наблюдали и после повторного введения [31].

Для интраастиальных инъекций трансфектама (DOGS) при дозе 2 мкг ДНК было найдено оптимальное соотношение 1:1,8. DOPE-содержащие вещества были в 5 раз более эффективными, чем чистые везикулы, состоящие из катионного липида. Дозозависимая экспрессия наблюдалась с оптимумом при 1 мкг. Более высокие концентрации вызывали агрегацию комплексов и снижение активности [48, 49].

Положительно заряженные мультиламеллярные липосомы в комплексе с геном интерферона человека (hIFN-beta) вводили мышам *nude* в место трансплантации клеток человеческой злокачественной глиомы в количествах 500 нг ДНК на 25 нМ липидов в 2 мкл через день пятью инъекциями. После такой процедуры опухоль полностью рассасывалась, и через 120 дней масса, отклонения в поведении, состояние тканей при гистологическом исследовании и смертность подопытных животных не отличались достоверно от контроля [55].

Использование на мышах *nude* с привитым раком легкого человека препарата из катионных липосом DP3 и гена *p53* из расчета 2 или 8 мкг ДНК на дозу на 4, 8, 12, 16 и 20-й дни после инокуляции значительно угнетало формирование опухоли и приблизительно вдвое увеличивало выживаемость животных, несущих мутантный аллель гена *p53* [56].

Длительность экспрессии.

Данный показатель варьирует в различных работах от нескольких дней до нескольких месяцев. Экспрессия люциферазы определялась с помощью ПЦР в печени, легких, селезенке и сердце через 3 месяца после введения комплекса, а в мозге и яичниках - до 1 месяца. [35]. Через 1 месяц после внутрибрюшинных инъекций комплекса гена β -галактозидазы с трихолестериновым производным гексаэтилен/пропиленимина сополимера наблюдалось окрашивание срезов селезенки мышей X-gal [57].

Достижение адресности экспрессии.

Органоспецифичность трансфекции может обеспечиваться при введении препарата в различные участки органов или кровеносной и лимфатической системы, тканеспецифичность - при подборе специальных лигандов. Однако значительного прогресса в достижении адресности экспрессии пока нет, хотя имеются отдельные данные о возможности адресности доставки. Так, при введении комплекса ДНК - носитель с лигандом асиалофетуином, специфично связывающимся с поверхностью клеток печени, экспрессия модельного гена увеличивалась в этом органе 7-кратно [30]. Очевидно, главным направлением в развитии методов адресной доставки и экспрессии генов *in vivo* будет применение тканеспецифичных промоторов [58], а также углеводных векторов (см. статью Г.Г. Кривцова и Р.И. Жданова в этом номере).

ВВЕДЕНИЕ ГЕНОСОМ ЛЮДЯМ. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОТОКОЛЫ

Первой работой по генной терапии *in vivo* у человека с использованием невирусного переноса генов было применение липосом DC-Chol:DOPE с геном *HLA B7* у пациентов с меланомой. Оно оказалось безопасным; у всех пяти больных была обнаружена экспрессия этого гена. [59]. Подобная работа

проводилась с использованием DMRIE/DOPE липосом, которые показали способность создавать более высокие концентрации ДНК (при меньшем размере частиц) и, таким образом, позволяли переносить большие количества плазмиды в опухоль [60].

В Лондонском Королевском Бромптонском Госпитале при переносе генов использовали спрей (плазида pSV-CTR: DC-Chol/DOPE 5:1 по массе) для лечения 15 больных с муковисцидозом. У большинства пациентов на 4-й день после введения наблюдалось наличие мРНК и ДНК плазмидного происхождения, однако только у тех пациентов, которые получили ДНК CFTR, наблюдалось улучшение секреции хлорид-ионов. [61]

Особенно важны коррекция и модификация генома при выявлении нарушения гена у развивающегося зародыша, так как они могут предотвратить закладку патологического фенотипа организма; наиболее эффективны они на доимплантационной стадии развития эмбриона. Один из пионеров генной терапии Френч Андерсон, (Университет Южной Калифорнии, Лос-Анжелос), планирует использование методов генной терапии на плоде – фетальную генную терапию. Лечение должны подвергнуться гомозиготы по гену α -талассемии (дефект в структуре гемоглобина) и плоды с иммунодефицитом, вызванным недостатком фермента аденозиндезаминазы. При этом будет использован аденовирусный вектор, эффективность которого на данный момент несравненно выше, чем у катионных липосом. Хотя может существовать риск встраивания конструкции в половые клетки плодов и передача чужеродного гена потомству, американский ученый считает такую возможность маловероятной [62]. Однако, в связи с недавним летальным исходом (18-летний пациент Джесси Гельзингер умер в сентябре 1999 г. в результате введения аденовирусного вектора, содержащего ген орнитинкарбамоилтрансферазы) [5], Френч Андерсон приостанавливает свой протокол фетальной генной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В последние годы достигнут значительный прогресс в понимании того, какими должны быть геносомы и их физико-химические свойства, биологическая безопасность и размеры, с тем чтобы их можно было использовать для обеспечения эффективной экспрессии целевых генов у людей (и у животных). Однако до сих пор нет ясности в некоторых этапах механизма их интернализации и высвобождения из эндосом. Мало данных о механизме проникновения комплексов в ядро. Эффективная пассивная адресная доставка маловероятна, поскольку неизвестно, является ли конденсированная ДНК предпочтительной для активного входа в ядро. Ничего не известно не только об активном транспорте в цитоплазму, но и о месте деконденсации ДНК. Нет прямых экспериментальных доказательств того, что ДНК деконденсируется в цитоплазме.

Следует заметить, что дозы генов, применяемые в терапевтических целях *in vivo*, для получения видимого результата должны быть увеличены от 3 до 10 раз, если это возможно, а стандартный контроль должен составлять не менее четырех животных при определении уровня экспрессии по меньшей мере на 1, 3 и 7-й дни [11].

В то же время следует опасаться таких артефактов, как введение слишком больших объемов комплексов в единицу времени (20-25% объема крови менее чем за 1 сек.), что может привести к повреждению капилляров вследствие их растяжения. Появление локальной трансфекции возможно вследствие

повреждения закупоренной области большими комплексами (воспаления). При осторожном применении максимально возможный вводимый объем должен составлять при внутривенном введении 0,2 мл для мышей и 0,6-1 мл для крыс. Для интратрахеального способа эти цифры должны составлять 0,1 и 0,3-0,6 мл соответственно [11].

Хотя липосомальный способ трансфекции существенно уступает по эффективности вирус-опосредованному, его эффективность может быть значительно повышена путем композиции липосом с вирусными белками, например, вируса Sendai [27,63,64]. Кроме липосом - катионных и цвиттерионных (нейтральных) - требованиям, предъявляемым к веществам-носителям, могут отвечать некоторые органические поликатионы, используемые в мицеллярной форме, например, олигопептиды, олигоэтиленимины и их холестеринные производные [12-15]. Предлагается использовать в качестве переносчиков также катионные частицы, получаемые смешиванием спиртового раствора монокатионного биodeградебельного липида YKS-220 и DOPE (молярное соотношение 1:5) в водной среде [65].

Недостаток всех невирусных методов переноса генов – непродолжительное время экспрессии, ограниченное эндосомно-лизосомальной деградацией, а также отсутствие специфичности. В настоящее время практически все лучшее из арсенала технологий переноса и доставки генов находит свое применение в клинике. Особенно часто применялась доставка генетических конструкций в клетки и ткани с помощью ретро- и аденовирусов [66,9]. Большие надежды возлагаются в США на новую технологию собственно генетической терапии - химеропластию, позволяющую заменять поврежденные участки генома на нормальные с помощью РНК\ДНК гибридов в сочетании с их адресованной доставкой поликатионами, несущими углеводные остатки.

Работа поддержана грантом подпрограммы «Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении», направление 05. Генодиагностика и генотерапия (1999-2000) и грантом РФФИ №98-04-49042.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Anderson W.F. et al.* (1992) *Science*, **256**, 801-813.
2. *Mulligan R.C.* (1993) *Science*, **260**, 926-932.
3. *Strauss M., Barranger J.A.* (1997) *Concepts in Gene Therapy*. DeGruyter, Berlin, 553 pp.
4. *Xanthopoulos K.G., ed.* (1998) *Gene Therapy*. NATO ASI Series: H: Cell Biology, Springer, Berlin-Heidelberg, 238 pp.
5. *Smaglik P.* (1999) *The Scientist*, **13**, N22, 9
6. *Schlingensiepen R., Brysch K.-Schlingensiepen H.* (1997) *Antisense – From Technology to Therapy*, Blackwell Science, Berlin; Vienna.
7. *Berns K.I., Giraud C.* (1996) *Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Gene Therapy*, Springer, Berlin, Heidelberg.
8. *Hodgson C.P.* (1996) *Retroviral Vectors for Human Gene Therapy*, Springer, Berlin; Heidelberg.

9. *Jolli D.* (1994) *Cancer Gene Ther.* **1**, 51-64
10. *Kaplitt M.G., Loewy D.A.* (1995) *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Application*, New York, 486
11. *Lasic D.D.* (1997) *Liposomes in Gene Delivery*, CRC Press, Boca Raton.
12. *Жданов Р.И., Бунеева О.А., Подобед О.В. и др.* (1997) *Вопр. мед. химии.* **43**, No 4, 212 – 216.
13. *Жданов Р.И., Куценко Н.Г., Подобед О.В., Бунеева О.А., Цветкова Т.А., Коневец Д.Н., Власов В.В.* (1998) *Докл. РАН.* **361**, No 5, 695 – 699.
14. *Жданов Р.И., Куценко Н.Г., Федченко В.И.* (1997) *Вопр. мед. химии.* **43**, No 1, 3 – 11.
15. *Жданов Р.И., Подобед О.В., Куценко Н.Г., Бунеева О.А., Цветкова Т.А., Коневец Д.Н., Власов В.В.* (1998). *Докл. РАН*, **362**, No 4, 557 – 560.
16. *Коваленко Д.В., Шафеев Р.А., Зеленина И.А и др.* (1996) *Генетика*, **32**, No 9, 1299 – 1301.
17. *Maurer N., Mori A., Palmer L., Monck M.A., Mok K.W., Mui B., Akhong Q.F., Cullis P.R.* (1999). *Mol. Membr. Biol.* **16**, No 1, 129 – 140
18. *Smaglik P.* (1999) *The Scientist.* **13**, No 21, 1-2.
19. *Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner P. L.* (1990) *Science* **247**, 1465-1468.
20. *Cheng, L., Ziegelhoffer, P. R. and Yang, N. S.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 4455-4459.
21. *Koprowski H., Weiner D.B.* (1998) *DNA Vaccination/ Genetic Vaccination.* - Berlin; Heidelberg.
22. *Macklin, M. D., McCabe, D., McGregor, M. W., Neumann, V., Meyer, T., Callan, R., Hinshaw, V. S. and Swain, W. S.* (1998) *Journal of Virology*, **72**, 1491-1496.
23. *Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J., Tasi, Y. J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M. and Felgner, P. L.* (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2550-2561.
24. *Alio, S. F.* (1997) *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 9-13.
25. *Wang, C., and Huang, L.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7851-7855.
26. *Stavridis, J. C., Deliconstantinos, G., Psallidopoulos, M. C., Armenakas, N. S., Hadjiminias, D. J. and Hadjiminias J.* (1986) *Exp. Cell Res.*, **164**, 568-572.
27. *Dzau, J. V., Mann, M. J, Morishita, R. and Kaneda, Y.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11421-11425.
28. *Debs R.J., Freedman L.P., Edmunds S., Gaensler K.L., Duzgunes N., Yamamoto K.R.* (1994) *J. Biol. Chem.* **265**, No 18., 10189 – 10192
29. *Zhu J., Liggitt D., Liu Y., Debs R.* (1993) *Science.* **261**, 209 - 211
30. *Templeton N.S., Lasic D.D., Frederik P.M., Strey H.H., Roberts D.D., Pavlakis G.N.* (1997) *Nature Biotechnology.* **15**, 647 - 652
31. *Liu Y., Liggitt D., Zhong W., Tu G., Gaensler K., Debs R.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 24864 - 24870
32. *Solodin I., Brown C.S., Bruno M.S., Chow C.Y., Jang E.H., Debs R.J., Heath T.D.* (1995) *Biochemistry* **34**, 13537 – 13544
33. *Bennett M.J., Nantz M.H., Balasubramanian R.P., Gruenert D.C., Malone R.W.* (1995) *Biosci. Rep.*, 47 – 53.
34. *Wheeler C.J., Sukhu L., Yang G., Tsai Y., Bustamante C., Felgner P., Norman J., Manthorpe M., et al.* (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1280**, 1 – 11

35. *Thierry A.R. et.al.* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 9742 - 9746.
36. *Kikuchi A., Aoki Y., Sugaya S., Serikawa T., Takakuwa K., Tanaka K., Suzuki N., Kikuchi H.* (1999) Hum. Gene Ther. **10**, 947 - 955
37. *de Lima M.C., Simoes S., Pires P., Gaspar R., Slepushkin V., Duzgunes N.* (1999) Mol. Membr. Biol. **16**, 103 - 109
38. *Huebner S., Battersby B.J., Grimm R., Cevc G.* (1999) Biophys. J. **76**, 3158 - 3166
39. *Stewart M.K., Plautz G., Buono L., Yang Z., Xu L., Gao X., Huang L., Nabel E.G., Nabel G.J.* (1992) Hum. Gene Ther. **3**, 267 - 275
40. *Rosengarten O., Horowitz A.T., Tzemach D., Huang L., Gabizon A.* (1994) Cancer Gene Ther. **1**, 301-336
41. *Goren D., Horowitz A.T., Zalipsky S., Woodle M.C., Yarden Y., Gabizon A.* (1996) Br. J. Cancer. **74**, 1749 -1756
42. *Brigham K.L., Meyrick B., Christman B., Magnuson M., King G., Berry L.* (1989) Am. J. Med. Sci. ,**298**, 278 – 281
43. *Hazinski T.A., Ladd P.A., DeMateo C.A.* (1991) Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. - No 2, 206 – 209
44. *Malone R.W., Felgner P., Verma I.M.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 6077 – 6081
45. *Liu Y., Thor A., Shtivelman E., Cao Y., Tu G., Heath T.D., Debs R.J.* (1999) J. Biol. Chem., **274**, 13338- 13344
46. *Zhang F., Feketeota E., Gould – Fogerite, Mannino R.J.* (1995) In Artificial Self-Assembling Systems for Gene Transfer, Book of Abstracts, CHI, Boston.
47. *Boletta A., Benigni A., Lutz J., Remuzzi G., Soria M., Monaco L.* (1997) Human Gene Therapy. No 8, 1243 - 1251
48. *Ono T., Fujimo J.T., Tschiya T., Tsuda M.* (1990) Neurosci. Lett. **117**, 259 – 263
49. *Roessler B.J., Davidson B.L.* (1994) Neurosci. Lett. **167**, 5 - 10
50. *Stribling R., Brunette E., Liggitt D., Gaensler K., Debs R.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **89(23)**, 11277 - 11281
51. *Canonico A.E., Plitman J.D., Conary T.J., Meyrick B.E., Brigham K.L.* (1994) J. Appl. Physiol. **77**, 415 - 419
52. *Tsukamoto M., Ochiya T., Yoshida S., Sugimura T., Terada M.* (1995) Nature Genet. No 9, 243 - 248
53. *Ochiya T., Takahama Y., Baba-Toriyama H., Tsukamoto M., Yasuda Y., Kikuchi H., Terada M.* (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. No 10, 358 – 365
54. *Кузнецов А.В., Кузнецова И.В.* (1995) Онтогенез. No 4, 300 – 309
55. *Yagi K, Ohishi N., Hamada A., Shamoto M., Ohbayashi M., Ishida N., Nagata A , Kanazawa S., Nishikimi M.* (1999) Hum. Gene Ther. **10**, 1975-1982
56. *Zou Y., Zong G., Ling Y.H., Hao M.M., Lozano G., Hong W.K., Perez-Soler R.* (1998) J. Natl. Cancer Inst. **90**, 1130 - 1137
57. *Sviridov Yu. V., Bohdanenko O. V., Pogorelov A. G., Duzgunes N., Vlassov V. V, Zhdanov R. I.* (1998) Book of abstracts of 6th Symposium on Gene therapy. MDC, Berlin, 94
58. *Hart I. R.* (1996) Semin. Oncol. No 1, 154.- 158
59. *Nabel G.J., Nabel E.G., Yang Z.-Y., Fox B.A., Plautz G.E., Gao X., Huang L., Shu S., Gordon D., Chang A.E.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. **90**, 11307 - 11311

60. San H., Yang Z., Pompili V., Jaffe M., Plautz G., Xu L., Felgner J., Wheeler C., Felgner P., Gao X., Huang L., Gordon D., Nabel G., Nabel E.G. (1993) Hum. Gene Ther. **4**, 781 – 788.
61. Caplen N.J., Gao X., Hayes P., Elaswarapu R., Fisher G., Kinrade E., Chakera A., Schorr J., Hughhes B., Dorin J.R., Porteous D.J., Alton E.W., Geddes D.M., Coutelle C., Williamson R., Huang L., Gilchrist C. (1994) Gene Ther. No1., 139 - 147
62. Couzin J. (1998) Science. **282**, 27
63. Kaneda Y. (1999) Mol. Membr. Biol., **16**, 119- 122
64. Wagner J., Madry H., Reszka R. (1995) Nephrol. Dial. Transpl. No10, 1801-1807
65. Yu W., Shimoyama A., Uneda T., Obika S., Miyashita K., Doi T., Imanishi T. (1999) J. Biochem. (Tokyo), **125**, 1034 - 1038
66. Miller A. D. (1992) Nature **357**, 455-460

Поступила 9.02.00.

NON-VIRAL GENE DELIVERY *IN VIVO* FOR GENE THERAPY

E.V.BOGDANENKO, YU.V.SVIRIDOV, A.A.MOSKOVTSSEV AND R.I.ZHDANOV

Research Institute for Biomedical Chemistry, RAMS, Moscow 119832

Recent findings connected with *in vivo* use of artificial macromolecular complexes (genosomes) for functional gene transfer and delivery are discussed in the paper. Non-viral methods are the most safe for the purpose of human gene delivery. The cationic liposomes containing cholesterol are the most suitable for this purpose, because they possess high biodegradability and stability in blood stream. The DNA-liposome complexes should: (i) contain DNA in the condition at most protected from environmental influence, (ii) be rather homogeneous and of small size (40-80 nm). Injections of complexes into blood are the most effective; in a respect of organospecificity may be achieved by appropriate ligand selection. It is the most perspective to increase the expression level by combining liposomes with viral peptides.

Key words: gene therapy, gene transfer and delivery, non-viral vectors, genome structure and transfection efficiency, tropicity of genosomes *in vivo*.