

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1996
УДК 575.2.086

НЕВИРУСНЫЕ МЕТОДЫ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Р.И.ЖДАНОВ, Н.Г.КУЦЕНКО, В.И.ФЕДЧЕНКО

НИИ биомедицинской химии РАМН, Москва, 119832, Россия, факс: (095) 245-0857

В настоящее время предложен и развивается целый ряд вирусных и невирусных систем для переноса генов в целях генной терапии — одной из новейших биомедицинских технологий. В обзоре рассмотрены преимущества и ограничения в применении следующих невирусных методов трансфекции: кальций-фосфатного, баллистического, микроинъекции в ядро, электропорации, рецептор-опосредованного переноса и использования искусственных макромолекулярных комплексов: поликатионов, гидрофобных поликатионов, полимеров, катионных и нейтральных липосом. Отдельно рассмотрены методы липофекции, основанные на применении катионных и нейтральных липосом. Особое внимание уделено направленному переносу генетического материала в клетки с помощью вирусных векторов и искусственных макромолекулярных комплексов.

Ключевые слова: генная терапия, трансфекция, липофекция, направленный транспорт.

Целью генетической (генной) терапии - одной из новейших биомедицинских технологий - является коррективка патологических состояний на генетическом уровне: замена дефектного участка генома нормальным [1, 2] или введение функционально активных генов в организм. Современные технологии введения генов используют методы *ex vivo* или *in vivo*. В случае *ex vivo* терапевтический агент (генетическую конструкцию) вводят в клетки, выделенные из организма (например, клетки крови), и затем возвращают их обратно. В большинство протоколов генной терапии используют именно этот подход. В случае *in vivo* функциональные гены вводят непосредственно в организм. В этом варианте генной терапии часто используют невирусные методы переноса генов, в частности, липофекцию, а в качестве клеток мишеней - миобласты [3,4], кератиноциты [5] и эндотелиальные клетки [6,7].

Хотя во многих работах по генной терапии для переноса генетических конструкций и функциональных генов в клетки и ткани использовались ретро-и адено-вирусы [2,8-10], в ряде исследований показано, что совместное использование вирусов и макромолекулярных комплексов, в частности, липосом, является более эффективным [11,12]. Стабильной экспрессии введенных генов при трансфекции *in vivo* добиться довольно сложно [13-15], однако в ряде случаев длительность экспрессии чужеродного гена может составлять 1 год. Данная работа посвящена общему рассмотрению невирусных методов переноса функциональных генов.

Классификация невирусных методов трансфекции.

В основе всех методов генной терапии лежит трансфекция - процесс переноса и активация в клетке чужеродного генетического материала. С точки зрения генной терапии важными параметрами трансфекции принято считать ее эффективность и стабильность (длительность изменения фенотипа клетки). Стабильность экспрессии генов для разных генов и видов клеток различна. Методы переноса генетического материала в эукариотические клетки делятся на химические, физические, биологические методы; методы, использующие искусственные макромолекулярные комплексы, а также смешанные методы.

Одним из первых методов трансфекции клеток эукариот был химический - **кальций-фосфатный** метод [16], основанный на осаждении ДНК в составе кальций-фосфатного преципитата, образующегося из фосфатного буфера, дестабилизированного хлористым кальцием. Этот метод дает стабильную трансфекцию, а эффективность его для разных клеточных линий составляет от 4 до 30%. Особенностью метода является его крайняя чувствительность к величине pH (оптимальный pH = 7.1 ± 0.01). Однако этот метод не применим в опытах *in vivo* и для суспензионных культур и, кроме того, может приводить к необратимому нарушению клеточных мембран.

К физическим методам трансфекции относятся: баллистический метод, электропорация и прямая инъекция ДНК. Баллистический метод включает микрообстрел монослоя клеток из специального устройства (генной «пушки») с применением в качестве средства доставки генетического материала частиц тяжелого материала (обычно вольфрам или золото) с адсорбированной на них ДНК [17]. Электропорация - образование пор в плазматических мембранах, обеспечивающих проникновение ДНК в клетку, в электрическом поле - нашла широкое применение, в основном, для трансфекции растительных клеток [18]. Для трансфекции крупных клеток может быть применена микроинъекция плазмидной ДНК - введение ДНК под микроскопом непосредственно в ядро клетки с помощью специальной аппаратуры [19]. В ряде случаев оказались возможными и эффективными прямые инъекции ДНК в неглубоко залегающие ткани [20-22]. В частности описана трансфекция тканей молодых и взрослых животных с помощью газового бароинжектора [23,24]. Эффективность такой трансфекции зависит от давления выброса и чистоты ДНК [25].

К биологическим методам трансфекции относят перенос генов с помощью сперматозоидов [26] и ретро- или аденовирусов [8-12]. Применение вирусов в целях генной терапии, начато в 80-е годы и является наиболее распространенным в настоящее время. Вирусы, наряду с такими достоинствами, как способность проникать в различные типы клеток и интегрировать в геном, имеют ряд недостатков, самыми существенными из которых являются возможность неспецифической интеграции в геном со сбоем регуляторных механизмов, иммуногенность и потенциальный риск запуска онкогенеза. Последнюю проблему пытаются решить, используя ослабленные вирусы, или их компоненты, в частности, белки оболочек [27-32].

К искусственным макромолекулярным комплексам относятся поликатионы (полилизин, полиэтиленимин, спермины), липосомы (катионные и нейтральные) и системы для рецептор-опосредованного переноса. Последние рассмотрены, в частности, в работах [33-35].

Широко используемыми **поликатионами** являются L-полилизин (3000 - 10000 Да) [36,37], полиэтиленимин (10000 Да) [38] и липоспермин (катионный полипептид сперминов с гидрофобными группировками) [39]. Липоспермин имеет высокую аффинность к ДНК, при этом формируются сходные с липосомами немиецеллярные гидрофобные структуры. Сильное сродство липосперминов к ДНК приводит к тому, что они связываются с хроматином даже в присутствии эндогенных полиаминов, что обуславливает тропизм комплекса к ядру [40]. Эффективность трансфекции с помощью поликатионов зависит от плотности заряда и молекулярной массы полимера [41]. Катионные полипептиды метаболически активны: они могут блокировать ионные каналы [42] и ингибировать проницаемость митохондриальных мембран для ионов кальция и фосфата [43]. Полиэтиленимины обладают сравнительно невысокой цитотоксичностью, что позволило применить их, например, для переноса гена люциферазы в эмбрионы млекопитающих [44]. Комплексы полиэтиленимина (гексамера) с моно-, ди- и трихолестериновыми производными были использованы для переноса плазмиды pSEAP в культуру клеток невриномы Гассерова узла крысы, причем ди- и три-замещенные соединения были эффективнее [45].

Липофекция

Липосомы, препараты фосфолипидных везикул, используемые для трансфекции в целях генной терапии (липофекции), могут различаться по размеру, дисперсности, липидному составу, заряду и способу получения, кроме того они могут быть поли- или монобислойными [46]. Наиболее эффективны для трансфекции малые моно- или олигобислойные липосомы [47,48]. Важными для липофекции свойствами липосом, являются заряд, текучесть мембраны, фьюзогенность (склонность к слиянию с мембранами), способность фосфолипидной компоненты к мицеллообразованию и комплексообразованию с ДНК [49-52]. Заряд везикул определяется наличием полиионов или катионных липидов [53]; текучесть мембраны обратно пропорциональна количеству холестерина и зависит от степени «ненасыщенности» и длины жирнокислотных остатков фосфолипидов. Фьюзогенность является благоприятным фактором при трансфекции *in vitro*, однако может приводить к неспецифической трансфекции *in vivo*. Авторы полагают, что наиболее перспективны для использования в генной терапии мицеллярные структуры. Способность к спонтанному мицеллообразованию тем выше, чем больше гидрофильная часть амфифила и короче гидрофобная, т.е. наличием конусоидной конфигурации липида (ею обладает, например, диолеилтриметиламмоний (DOTMA), что повышает эффективность комплексообразования с ДНК) [54,39].

В качестве катионных липидов наиболее широко используются замещенные третичные амины типа DOTMA и DOTPA [55], а также гидрофобные амины -стериламин [56]. Более перспективными для использования в качестве катионных липидов, по нашему мнению, являются положительно заряженные липиды с простой эфирной связью в глицериновой части [53]. В эту группу входят липиды с различным соотношением гидрофобной и гидрофильных частей в молекуле, а также различным расстоянием между ними, что обеспечивает большое разнообразие структур ДНК-липосомных комплексов. Такие липиды в составе фосфатидилхолиновых липосом, содержащих фьюзоген, были успешно использованы для трансфекции культивируемых трансформированных фибробластов L-929 [57]. В качестве фосфолипидных компонентов липосом обычно используют диолеилфосфатидилхолин (DOPC) и диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE) [58]. Липосомы, содержащие DOPE, более гидратированы, что уменьшает их фьюзогенность [44].

При приготовлении ДНК-липосомальных комплексов используют не только катионные, но и нейтральные (цвиттерионные) липосомы [59-61]. Показано, что в условиях, разработанных для получения ДНК-липосомальных комплексов [62-64], нативная плазмидная ДНК заключена в фосфолипидный бислой и защищена от действия ДНКаз, топоизомеразы I и флуоресцентных красителей (бромистый этидий и DAPI), что не влияет на ее способность к интернализации и взаимодействию с другими мембранами [39]. С помощью таких комплексов была осуществлена эффективная трансфекция (в частности, pSV2-NEO, pQE-lacZ и pSEAP) в различные линии эукариотических клеток [65-69].

Основным путем интернализации клеткой любых макромолекулярных комплексов в процессе трансфекции является адсорбционный эндоцитоз. В частности, доказано существование белковых рецепторов, участвующих в транспорте олигонуклеотидов в клетку [70]. После эндоцитоза комплекса ДНК с катионными липосомами образуются большие перинуклеарные комплексы, которые часто имеют высокоупорядоченную тубулярную структуру. Дegrадация комплекса ДНК с липосомами является необходимым этапом липофекции и происходит в цитоплазме, причем судьба медиатора липофекции не влияет на ее эффективность [71]. Обнаружено также, что эффективность липофекции не зависит от стадии клеточного цикла [72] но усиливается при использовании не сверхспирализованной, а линейной ДНК [39]. В работе [73] показано, что эффективность липофекции комплекса катионных липосом и гена люциферазы в легкие может быть значительно увеличена добавлением гликохолеата натрия, что согласуется с нашими данными о том, что включение в состав липосом гликолипида (глицирризиновой кислоты) значительно повышает эффективность трансфекции трансформированных фибробластов модельным геном [56]. В настоящее время для липофекции в целях генной терапии используют препарат липофектин («Lipofectm») фирмы «Vical» (США), представляющий собой смесь DOTMA/DOPE (1:1) [74], а также рН-чувствительные и фьюзогенные липосомы, приготавливаемые из DOPE и монохолестерилового эфира янтарной кислоты методом упаривания из обращенной фазы [46]. рН-чувствительные липосомы способны изменять заряд при изменении величины рН и сливаться с мембранами клеточных структур, обеспечивая проникновение ДНК в клетку [76].

Катионные липосомы усиливают эффективность вирусной трансфекции функциональных генов (тимидин киназы [76] и бета-галактозидазы [77]) в культивируемые клетки в 1000 раз, а комплексное применение аденовирусов и полилизина увеличивает эффективность терапии антисенс олигонуклеотидами [78].

В таблице приведены основные характеристики рассмотренных невирусных методов переноса генов в клетки эукариот.

Направленный перенос генетических конструкций

Направленная доставка *in vivo* генетического материала в клетки-мишени является ключевой проблемой генной терапии и обеспечивается наличием адреса и вектора. Самыми известными адресами являются адреса типа лиганд-рецептор, к которым относятся транспортные белки, специфические метаболиты, различные эпитопы клеток иммунной системы и другие. В частности, для направленной трансфекции *in vivo* клеток эритроцитарного ростка в качестве адреса с успехом применен трансферрин (в комплексе поли-L-лизин-трансферрин/аденовирусные частицы) [79]. Конъюгаты с фолатом попадают лишь в клетки с высокой гиперэкспрессией фолатного рецептора, что может быть использовано для терапии некоторых онкологических заболеваний [80].

Таблица

Особенности различных методов переноса генов

Метод/Свойство	Генная пушка	Аденовирусы	Сперматозоид	Микроинъекции ДНК	Липосомы	Липосомы + вирусы
Нуклеиновая кислота	ДНК/РНК	ДНК	ДНК	ДНК	ДНК/РНК	ДНК/РНК
Размер рекомбинантного гена	50 кб	7,5 кб	8 кб	50 кб	50 кб	50 кб
Возможность прим. in vivo	да	да	да	да	да	да
Интеграция в геном	низкая	нет	низкая	низкая	низкая	неизвестно
Эффективность	средняя	очень высокая	высокая		низкая	высокая
Использование для трансфекции в неделящиеся клетки	да	нет	да	да	возможно	да
Ограничения	только для поверхностных тканей	временная коррекция и осложнения: пневмония, др.		Локальное использование	Эффективность	

Рецепторы сахаров (лектины) присутствуют на поверхности многих типов клеток, особенно трансформированных, и могут участвовать в интернализации их лиганда (т.е. опосредовать эндоцитоз гликопротеидов с определенным концевым углеводным остатком) [24,81]. Полилизин, конъюгированный с различными сахарами, может быть использован для направленной доставки генов к определенным клеткам в зависимости от природы углевода. Показано, что комплекс ДНК с лактозилированным полилизином очень эффективен при трансфекции функционального гена в клетки гепатомы человека (HepG2) [82,83], а с маннозилированным полилизином - в макрофагоподобные клетки. Причем трансфекция в этих случаях более эффективна, чем липофекция или использование ДЭАЕ-декстрана [84]. Гликозилированный полилизин использовали и как переносчик антисмысловых олигонуклеотидов. Такие конъюгаты нетоксичны для клеток и увеличивают эффективность переноса олигонуклеотидов в десятки раз [85]. Галактозным сайтом связывания на поверхности клеток опосредован и механизм переноса поликатионных конъюгатов, содержащих рибин [86]. Конъюгаты полиакриламида с различными олигосахаридами были использованы для направленного транспорта противоопухолевых соединений в трансформированные клетки [87]. Олигосахариды, находящиеся на поверхности липосом, содержащих канцеростатики, увеличивают эффективность их связывания с опухолевыми клетками на 50-80 %, что приводит к усилению противоопухолевой активности таких липосом в 2-4 раза [88].

Весьма перспективным и самостоятельным направлением генной терапии является генная терапия таких заболеваний человека, причиной которых являются генетические дефекты митохондрий, геном которых не имеет гистоновой защиты и поэтому менее стабилен, чем ядерный. К таким заболеваниям относятся некоторые миопатии, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и др. [88,89]. Митохондриальная генная терапия не развивалась из-за отсутствия векторов для направленной доставки генетического материала в митохондрии. Впервые трансфекция изолированных митохондрий проведена в 1995 г. с использованием в качестве переносчика короткого митохондриального лидерного пептида, который ковалентно сшивали с ДНК [90]. Такой конъюгат проникал в энергизованные мито-

хондрии печени крыс *in vitro*. Эффективность переноса была достаточно высокой и не зависела от размера ДНК [90].

Направленность трансфекции *in vivo* зависит и от способа введения генетического материала (внутримышечный, внутривенный, интратрахеальный, подкожный, пероральный). Так, при внутривенном введении комплекса катионных липидов с ДНК мышам почти все липосомы задерживаются в ретикулоэндотелиальной системе печени [74]. Повышение эффективности трансфекции в этом случае может быть достигнуто предварительным введением мышам хлорхинолина, который препятствует снижению pH в лизосомах [48].

Адресованность может определяться не только медиаторами трансфекции (лигандами, рецепторами, гликозидами, амфифилами), но и природой и конструкцией экспрессионных векторов. Важным условием создания и экспрессии адресованных векторов является наличие в генетической конструкции специфических генетических элементов (промоторов, регуляторных элементов, усилителей экспрессии), которые обеспечивают управление экспрессией функциональных генов. Длительное функционирование трансгена возможно, если генетическая конструкция содержит область репликации ДНК. В частности, было показано, что управление экспрессией генов ферментов системы детоксикации, например, P-450 1A1 может быть обеспечена использованием регулируемых промоторов [91]. Регуляторный элемент гена лейкосиалина, который кодирует главный сиалогликопротеин мембран лейкоцитов и тромбоцитов человека, является подходящим для экспрессии в растущей культуре клеток, для которых эффективными векторами до настоящего времени были лишь ретровирусы [92]. Для терапии опухолей, особенно солидных, интерес представляет промотор гена глюкозо-связанных белков (GRP). Эти гены - прототип класса генов, регулируемых путями передачи сигнала с эндоплазматического ретикулума к ядру. Продукты их являются своего рода внутриклеточными мусорщиками, связывающими несозревшие белки и недособранные комплексы. Основными индукторами для них являются стресс, низкий уровень глюкозы и кислорода. При снятии стресса GRP посттранскрипционно инактивируются [93].

Катионные липосомальные вектора были использованы для локальной генной терапии рака простаты. В этом случае был применен промотор, специфичный для эндотелио-специфичной экспрессии использовали векторы, содержащие ген, кодирующий рецепторную гиризинкиназу. Этот ген экспрессируется в эндотелии сосудов в основном в период эмбриогенеза и ангиогенеза. Интересно отметить, что его специфичность *in vivo* может переноситься на гетерологичные гены с помощью относительно небольших фрагментов [95]. Для адресной доставки юна тирозиназы мышей и тирозин-связанного белка (TRP-1) в меланоциты *in vitro* и *in vivo* были использованы промоторные последовательности, экспрессия которых специфична для меланоцитов [96]. При трансфекции гепатоцитов в качестве адреса используют асиалогликопротеин/полилизинный конъюгат [97,98] и глициризиную кислоту [99].

По нашему мнению, перспективными методами направленного переноса генетического материала в клетки эукариот являются также рецептор-опосредованный перенос и использование липидных мицелл (липосом), несущих на поверхности олигосахаридные последовательности.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Anderson W.F. // Science. - 1992. - Vol. 256. - P. 801-813.
- 2 Mulligan R.C. // Science. - 1993. - Vol. 260. - P. 926-932.
- 3 Blau H.M., Dhawan J., Pavlath O.K. // Trends in Genetics. - 1993. - Vol. 9. - N. 8-P.154-162
- 4 Meager A. // Trends in Biotech. - 1994 - Vol. 12.-P. 108-112
- 5 Fenjves E.S., Smith J., Zaradic S., Taichman L. B. // Hum-Gene Therapy - 1994 - Vol. 5. N 10. - P. 1241-1248
- 6 Squinto S.P., Madri J.A., Kennedy S., Springhom J. // In vivo - 1994 - Vol. 8. N. 5. -P. 771-780
- 7 Tseng W.C., Purvis N.B., Haselton F.R., Giorgio T. D. // Biothechnology and Bioengineering - 1996 - Vol. 50. N. 5. - P. 548-554
- 8 Mulligan R.C., Howard B.H., Berg P. // Nature (London) - 1979. - Vol. 277. - P. 108-111.
- 9 Miller A.D. // Nature (London) - 1992 - Vol. 357. - P. 455-460
- 10 Jolly D. // Cancer Gene Ther. - 1994 -Vol. 1. - P. 51-64
- 11 Kaneko Y., Tsukamoto A. //Cancer Letter - 1996 - Vol. 105, N 1. - P. 39-44
- 12 Sakamoto T., Kimura H., Scuric Z., Spec C., Gordon E.M., Hinton D.R., Anderson W.F., Ryan S.J. // Ophthalmology - 1995 - Vol. 102. N 10. - P. 1417-1424
- 13 Welsh N. // BBA - 1990 - Vol. 12.-P. 1157-1164.
- 14 Werner R.G. // Methods in Exp. Clin. Pharmacol - Vol. 16. N. 7.-P. 525-537.
- 15 Schofield J.P., Caskey C.T. // Brit. Mod. Bull. - 1995 - Vol. 51. N.I.-P. 56-71
- 16 Smith J.G., Walzern R.L., German J.B. // BBA - 1993 - Vol. 1154. - P. 327-340
- 17 Johnston S.A., Tang D.C. // Genet. Ing. N-Y - 1993 - Vol. 15. - P. 225-236
- 18 Neil G Zimmermann U.// Methods in Enzymology - 1993 - Vol. 221. - P. 339-361
- 19 Yoneda Y. // In Methods in Enzymology - 1993 - Vol. 221. - P. 306-317
- 20 Capecchi M.R. // Cell - 1980 - Vol.22 - P. 479-488
- 21 Folger K.R., Wong E.A., Wahl G., Capecchi M.R. // Mol.Cell.Biol. - 1982 - Vol. 2. - P. 1372-1387
- 22 Zeienina L.A., Semenova M.L., Shafei R.A., Kolesnikov V.A., Zeienin A.V. // FEBS Lett -1991- Vol. 315-P. 29-32
- 23 Furth P.A., Shamey A., Hennighausen L. // Hybridoma - 1995 - Vol. 4. N. 2.-P. 149-152
- 24 Yang N.S., Sun W. H. // Nat. Med. Sci - 1995 - Vol. 1. N 5.-P. 481-483
- 25 Wadhwa M.S., Rice K.G. J. // Drug. Target. - 1995 - Vol. 3. N 2.-P. 111-127
- 26 Кузнецов А.В., Кузнецова И.В. // Онтогенез. - 1995. -Т. 26, № 4.-С. 300-309.
- 27 Sakamoto T., Kimura H., Scuric Z., Spec C., Gordon E.M., Hinton D.R., Andersen W.F., Ryan S.J.. // Ophthalmology - 1995 - Vol. 102. N 10.-P. 1417-1424
- 28 Shaughnessy E Chatterjee D.Lu, S., Wong KK.// Seminars in Oncology - 1996 - Vol. 23. N 1.-P. 159-171
- 29 Tanaka T., Kanai F., Okabe S., Yoshida Y., Wakimoto H., Hamada H., Shiratori Y., Lan KH., Ishitobi M., Omata M.. // Cancer Research - 1996 - Vol. 56, N 6.-P. 1341-1345
- 30 Merwin JR., Carmichael EP., Noell GS., Derome ME, Thomas WL, Rober N., Spittainy G., Chiou H.C.. // J.Immunol.Methods - 1995 - Vol. 186, N 2.-P. 257-266
- 31 Garciahernandez B., Sanchezgarcia I.. // Molecular Medicine - 1996 - Vol. 2, N 1.- P. 125-133
- 32 Michael S.I., Hong J.S., Curiel D.T., Engler J.A.. // Gene Therapy - 1995 - Vol. 2. N 9. -P. 660-668
- 33 Rosenkranz A. A., Yachmenev S. V., Vans D. A., Serebryakova N. V., Murav'ev V. I., Peters R., Sobolev A. S. // Exper. Cell Research. - 1992 - Vol. 199. - P. 323-329
- 34 Wu G.Y., Wu C.H. // J.Biol.Chem. - 1988 - Vol. 263. - P. 14621-14624
- 35 Wilson J.M., Grossman M., Caberra J.A. // J.Biol.Chem. - 1992 - Vol. 267. - P. 963-967
- 36 Xiaohuai Zhou et al // BBA - 1991 - Vol. 1065. - P. 8-14
- 37 Ledley F.D. // Curr. Opin. Biotechnol. - 1995 - Vol. 5. N 6.-P. 626-636
- 38 Behr J.P. // Bioconjugate Chem. - 1994 - Vol. 5. - P. 382-389

39. Smith K.T., Iain Doherty B.S. // Q-One Biotech Limited, Technical Bulletin - 1994 - N 19.- P. 1-12.
40. Remy J.S., Sirlin C., Vierling P., Behr J.P. // Bioconjug. Chem. - 1994 - Vol. 5. N 6. - P. 647-654
41. Kabanov A.V., Kabanov V.A. // Bioconjug-Chem. - 1995 - Vol. 6. N 1. - P. 7-20
42. Rink T. et al // Eur-Biophys-J. - 1994 - Vol. 23. N 3. - P. 155-165
43. Rigobello M.P., Bazzon E., Marin O., Bindoli A. // BBRC - 1995 - Vol. 217. N 1. - P. 144-149
44. Abdallah B., Sachs L., Demeneix B. // Biology of the Cell - 1995 - Vol. 85. N 1. - P. 1-7
45. Kutsenko N.G., Vlassov V.V., Kobenets D.V., Podobed O.V., Buneeva O.A., Zhdanov R.I. Congress of Molecular Medicine. Book of Abstracts, Berlin, Germany, 1997
46. G. Gregoriadis, ed. // Liposome Technology, CRC Press - 1985 - Vol. 1. - Ch. 3
47. McDonald R.C., M. Menco B.Ph., Takeshita K., Subbarao N.K. // BBA-1991-Vol. 1061. - P. 297-303
48. Liu Y., Liggitt D., Wendy Zhong, G.Tu., Gaensler K., Debs R. // J. Biol. Chem. - 1995 - Vol. 270. N 42. - P. 24864-24870
49. Zhdanov R. I., Kuvichkin V. V. // in: Developments in Lipid-Protein Interactions and Receptor Function (J.-A. Gustaffson and K. W. A. Wirtz, eds.), N. Y. - London: Plenum Press - 1993 - P. 249-262.
50. Zhdanov R. I., Kaptein R. // Appl. Magn. Reson. - 1994 - Vol. 7. N 1 - ChP. IX-XII.
51. Venanzi F. M., Zhdanov R. I., Petrelli C., Moretti P., Amici A., Petrelli F. // Abstract book of Int. Conference "Liposomes in Drug Delivery. The Nineties and Beyond" - 1993 - London, U.K. - P. 122
52. Zhdanov R. I., Kuvichkin V. V., Fedchenko V. I. // International Conference on DNA Recognition - August 16-21, 1993 - Elsinore, Denmark
53. Константинова И. Д., Ушакова И. П., Серебренникова Г. А. // Биоорг.Химия - 1993 - Т. 19. №8. - С. 844-848
54. Duzgunes N., Feigner P. L. // Meth. Enzymol. - 1993 - Vol. 221. - P. 303-306
55. Feigner J.H., Kumar R., Sridhar C.N., Wheeler C.J., Tsai Y.J., Border R., Ramsey P., Martin M., Feigner P.I. // J. Biol. Chem. - 1994 - Vol. 269. N 4. - P. 2550-2561
56. Жданов Р. И., Лавренева Т. П., Бунеева О. А., Цветкова Т. А., Серебренникова Г. А., Константинова И. Д., Маслов М. А. // Вopr. Мед. химии. - 1996 - Т. 42. - № 4 - С.
57. Feigner P. // PNAS - 1987 - Vol. 84. - P. 7413-7417
58. Caplen N.J., Kinrade E., Sorgi F., Gao X., Gruenert D., Geddes D., Coutelle C., Huang L., EWEW Alton, Williamson R. // Gene Therapy - 1995 - Vol. 2, N. 9 - P. 603-613.
59. Коваленко Д. В., Шафеи Р., Семенова М. Л., Зеленина И. А., Жданов Р. И. // Генетика. - 1996 - Т. 32, № 9. - С. 1299-1302
60. Zhdanov R. I., Volkova L.A., Kuvichkin V.V., Petrov A.I. // Appl. Magn. Reson. - 1994 - Vol. 7, N 1. - P. 115-130
61. Zhdanov R. I., Volkova L.A., Rodin V.V. // Appl. Magn. Reson. - 1994. - Vol. 7, N 1. - P. 131-146
62. Кувичкин В. В., Сухомудренко А. Г. // Биофизика - 1987 - Т. XXXII, вып. 4. - С. 628-633
63. Tarahovskiy Y.S., Khusainova R.S., Gorelov A.V., Nicolaev T.I., Deev A.A., Dawson A.K., Ivanitsky G.R. // FEBS Let. - 1996 - Vol. 390 - P. 133-136
64. Дорофеева О. В., Жданов Р. И., Тихоненко Т. И., Борисенко А. С. // Способ получения комплекса плазмидной ДНК с ионами металлов и фосфолипидными везикулами. Заявка на выдачу патента РФ, № 95116557 от 4.11.95
65. Жданов Р. И., Бунеева О. А., Федченко В. И., Венанци Ф., Амичи А. Петрелли Ф. // Доклады РАН - 1997 - в печати
66. Zhdanov R. I., Podobed O., Buneeva O., Bovin N., Abakumova O. Yu., Lavrenova T. P., Borisenko A. S. // Keystone Symposium on Gene Therapy - 1997 - Abstract book.
67. Жданов Р. И., Бунеева О. А., Лавренева Т. П., Подобед О. В., Абакумова О. Ю. // Доклады РАН - 1997 (в печати)
68. Кувичкин В. В., Кузнецова С. М., Петров А. И., Емельяненко В. И., Акоев В. Р., Шныров В. И., Жданов Р. И. // Биофизика - 1997 (в печати)

69. Buneeva O., Borisenko A.S., Lavrenova T., Zhdanov R. I., Tikhonenko T.I. // Congress of Molecular Medicine, Berlin - 1997 - Abstract book.
70. Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V.V. // PNAS - 1989 - Vol.86 - P. 6454-6458
71. Zabner J. // J.Biol.Chem - 1995 - Vol. 270, N 32. - P. 18997-19007
72. Watanabe Y., Nomoto H., Takezawa R., Miyoshi N., Akaike T. // Biochem. J., Tokyo -1994 - Vol. 116, N 6.-P. 1220-1226
73. Perales J. // PNAS - 1994 - Vol. 91 - P. 4086-4090
74. Freeman D.J., Niven R.W. // Pharmac. Res. - 1996 - Vol. 13, N 2.-P. 202-209
75. Legendre J. // Pharmac.Res. - 1992 - Vol. 9, N 10.-P. 1235-1242
76. Kaneko Y., Tsukamoto A. // Cancer Letter - 1996 - Vol. 105, N 1. - P. 39-44
77. Rajawalia R., Webber J., Naftilan J., Chapman G.D., Naftilan A.J. // Gene Therapy - 1995 -Vol. 2, N 8.-P. 521-530
78. Curiel DT, Miller DM. // Gene Therapy - 1996 - Vol. 3, N 4.-P. 287-297
79. Philips S.C. // Biologicals - 1995 - Vol.23, N 1.- P.13-16
80. Gottschalk S. et al // Gene Therapy - 1994 - Vol. I, N 3.-P. 185-191
81. Batra R.K. // Gene Therapy - 1994 - Vol. I, N 4. - P. 255-260
82. Stahl P.D.//Curr.Opin.Immunol. -1992 -Vol. 4. -P. 49-52
83. Midoux P., Mendes C., Legrand A., Raimond J., Mayor R., Monsigny M., Roche A. C. //Nucleic Acids Res., - 1993 - Vol. 21 - P. 871-878
84. Erbacher P., Roche A. C., Monsigny M., Midoux P. // Bioconjugate Chem. - 1995 - Vol. 6-P. 401-410
85. Roche A.C., Kolen W.J.W., Midoux P., Erbacher P., Monsigny M., Click M.C., Scanlin T.F. // XVI ernes Joumees Mediterraneennes des Glucides, L Isle sur la Sorgue Groupe Francais des Glucides - 1996 - P. AB20-AB29
86. Friede M., von Holt C. // BBA - 1991 - Vol. 1069. - P. 273-280
87. Bovin N.V., Gabius H.J., // Chermical Society Reviews, - 1995 - P. 413-421
88. Vodovosova E., Gayenko G., Rasinkov V., Korchagina E., Bovin N., Molotkovsky J., -1997 - in press
89. Luft R. //PNAS - 1994 - Vol. 91. - P. 8731-8738
90. Chrzanowska-Lightowlers-ZM;Lightowlers-RN;//Tumbull-DMGene-Ther.-1995 Jul; -Vol. 2, N 5.-P. 311-316
91. Smith J.D., Wong E., Ginsberg M.\\ PNAS- Vol. 92, N 25.-P. 11926-11930
92. Kamata H. , Yagisawa H., Takahashi S., Hirata H. // Nucleic Acid Res - 1994 - Vol. 22, N 3.- P.
93. Little E. // Crit. Rev. Eucaryot. Gene Expr. - 1994 - Vol. 4, N 1. - P. 1-18
94. Bau M., Axelrod J.H. // Gene - 1995 - Vol. 161, N 2.-P. 143-150 95, Xu A., Kudo S., Fukuda M. // Gene -1995 - Vol. 160, N 2.-P. 283-286
96. Stewart A.J., Pichon C., Monsigny M., Midoux P., Roche A.C., Erbacher P.. // Hum.Gene Ther. - Vol. 7. - P. 721-729
97. Hart-IR, Vile-RG. //Brit. Mod. Bull. - 1995 - Vol. 51, N 3.-P. 647-655
98. Smith J.D., Wong E., Ginsberg M.. // PNAS USA. - 1995 - Vol. 92, N 25. - P. 11926-11930
99. Osaka S., Tsuji H., Kiwada H. // Biol.Pharm.Bull. - 1994 - Vol. 17, N 7.-P. 940-943
100. Bout A. // Europ. J. Drug Metab. Pharmacokin. - 1996 - Vol.21. N.2 - P. 175-179

NON-VIRAL GENE TRANSFER IN GENE THERAPY

R.I.Zhdanov, N.G.Kutsenko, and V.I.Fedchenko

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical sciences,
Moscow 119832, Russia

A number of viral and non-viral vector systems have been developed nowadays for gene therapy applications. The advantages and shortcomings of the following non-viral methods of transfection are discussed in this review: calcium phosphate technique, ballistic transfection using "gene gun", electroporation, microinjection into the nucleus, receptor-mediated gene transfer, and artificial macromolecular complexes (polycations, hydrophobic polycations, polymers, cationic and neutral liposomes). Special attention is paid to methods of lipofection based on the usage of cationic and neutral liposomes as well as targeted gene delivery with the emphasis on the works which were out in author's laboratories.

Key words: gene therapy, transfection, lipofection, targeted delivery.