

## НЕВИРУСНАЯ РЕГЕНЕРАТИВНАЯ ГЕНОТЕРАПИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© А. М. Ефремов,<sup>1–3</sup> И. В. Духовлинов,<sup>1</sup> Э. Б. Дижее,<sup>1, 3</sup> С. В. Буров,<sup>4, 5</sup> М. В. Лео,<sup>4, 5</sup>  
Б. Н. Акифьев,<sup>1, 3</sup> Д. А. Могиленко,<sup>1–3</sup> И. А. Иванов,<sup>1</sup> А. П. Перевозчиков,<sup>1–3</sup> С. В. Орлов<sup>1–3, \*</sup>

<sup>1</sup> ООО «Фарма Ген», Санкт-Петербург, <sup>2</sup> С.-Петербургский государственный университет,

<sup>3</sup> НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН,

<sup>4</sup> Институт высокомолекулярных соединений РАН

и <sup>5</sup> ООО «Диафарм», Санкт-Петербург;

\* электронный адрес: serge@iem.sp.ru

Скорость и характер регенерации кожных покровов после ранений, ожогов и других травм зависят в основном от пролиферации клеток в зоне поражения. Ускорение заживления ран путем стимуляции пролиферации клеток и синтеза межклеточного вещества является одной из важнейших задач современной практической медицины. Для лечения ран, как и для лечения многих других заболеваний, используют генотерапевтические подходы. Для этих целей, как правило, применяют генетические конструкции на основе векторов экспрессии митогенных факторов роста. Ключевым моментом, определяющим эффективность генотерапии, является выбор способа переноса ДНК в ткани животного. Невирусные средства переноса лишены многих побочных эффектов и могут применяться для этих целей. Молекулярные конъюгаты на основе поликатионных пептидов эффективны и просты в использовании, а также способны обеспечить направленный перенос за счет введения в состав пептида лиганда к клеточным рецепторам. В данном исследовании мы разработали два молекулярных конъюгата на основе модифицированного сигнала ядерной локализации Т-антигена вируса SV40 (катионная составляющая) и пептидных лигандов к рецептору трансферрина (лигандная составляющая). Эти конъюгаты эффективно связываются с плазмидной ДНК и обеспечивают ее перенос в клетки, экспрессирующие рецепторы трансферрина, с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза. Применение пептидов при доставке плазмидной ДНК с репортерным геном люциферазы в раны животных увеличило эффективность переноса в 100 раз. Обработка ран животных комплексами вектора экспрессии синтетического гена инсулиноподобного фактора роста человека с молекулярным конъюгатом ускорила регенерацию не менее чем в 1.5 раза по сравнению с заживлением ран животных, обработанных свободным вектором экспрессии. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности разработанной системы невирусной регенерационной генотерапии поверхностных повреждений млекопитающих.

**Ключевые слова:** молекулярные конъюгаты, перенос генов, регенеративная генотерапия кожных покровов, трансферриновый рецептор, инсулиноподобный фактор роста 1.

Повреждения поверхностных тканей (ожоги и раны) являются опасными травмами и часто ассоциированы с длительными процессами регенерации, хроническими ранами, многочисленными рубцами и серьезными инфекциями. Регенерация поврежденных тканей зависит в основном от пролиферации клеток различных типов, находящихся в зоне поражения, и их участия в синтезе компонентов межклеточного вещества (Bowler, 2002). Ускорение заживления ран и лечение прочих повреждений путем стимуляции регенерации является одной из важнейших задач практической медицины. Большинство современных методов стимуляции регенерации основано либо на улучшении трофики тканей, окружающих поврежденный участок, либо на повышении скорости пролиферации входящих в их состав клеток (в первую очередь это относится к клеткам соединительной ткани) (Bowler, 2002). Лучше всего себя зарекомендовали препараты, действующим началом которых являются митоген-

ные факторы роста, способные специфически запускать деление клеток-мишеней (Ferguson et al., 2009; Macri, Clark, 2009). Следует отметить короткое время жизни в организме сигнальных молекул, к которым относятся и митогенные ростовые факторы, что предполагает необходимость частых повторных введений препаратов при терапии. В этой связи представляется актуальной разработка генотерапевтических методов стимуляции заживления ран у млекопитающих. В этом случае в ткани, окружающие повреждения, вводится вектор экспрессии, содержащий ген, кодирующий тот или иной фактор, стимулирующий заживление. Экспрессия этого гена позволяет поддерживать постоянный уровень фактора роста в месте повреждения, стимулируя таким образом процесс регенерации (Makinen et al., 2002). Ключевым моментом, определяющим эффективность генотерапии, является выбор способа переноса ДНК в клетки-мишени. Применение с этой целью вирусных векторов имеет существенные огра-

ничения (Molas et al., 2003). В связи с этим актуальной является разработка невирусных методов переноса ДНК. Несмотря на более низкую эффективность однократного применения, невирусные средства лишены ряда принципиальных недостатков вирусных векторов (высоких иммуногенности и токсичности) и могут быть использованы многократно. Наиболее перспективным подходом в этой области является применение молекулярных конъюгатов — катионных носителей — для конденсации ДНК за счет электростатических взаимодействий с последующей доставкой полиэлектролитных комплексов ДНК/носитель в клетки млекопитающих. Специфичность переноса комплексов ДНК/поликатион в клетки-мишени достигается введением в их состав лигандов к клеточным рецепторам, что приводит к рецепторопосредованному эндоцитозу комплексов (Molas et al., 2003). Таким образом, эффективность терапии в значительной степени обуславливается избирательностью использованных при разработке катионных носителей лигандов по отношению к рецепторам клеток-мишеней. В процессе регенерации кожных покровов млекопитающих особую роль играет пролиферация фибробластов кожи в областях, непосредственно прилегающих к ране. Разработка высокоэффективных и специфичных методов переноса ДНК в фибробласты поверхностных тканей млекопитающих будет являться существенным вкладом в развитие методов терапии ран.

При создании молекулярных конъюгатов, способных эффективно и специфично переносить гены «интереса» в фибробласты поверхностных тканей млекопитающих, чрезвычайно важными представляются два фактора — выбор лиганда, имеющего значительные количества рецепторов на поверхности клеток-мишеней, и катионного носителя, обеспечивающего эффективную компактизацию ДНК с формированием полиэлектролитных комплексов, не способных проникать в клетки адсорбционным эндоцитозом (Molas et al., 2003). Последнее обстоятельство важно для специфичности переноса генов. Трансферриновые рецепторы давно привлекают внимание исследователей в качестве мишеней для доставки в клетки фармакологически активных веществ (Thorstensen, Romslo, 1993; Jones, Shusta, 2007). Одним из важных преимуществ трансферриновых рецепторов при разработке систем регенеративной и противоопухолевой генотерапии является корреляция числа рецепторов на поверхности клеток со скоростью пролиферации. Чем активнее пролиферируют клетки, тем большее число рецепторов трансферрина представлено на их поверхности (Inoue et al., 1993; Ponka, Lok, 1999). При переносе генов ростовых факторов, стимулирующих пролиферацию, можно ожидать возникновения положительной обратной связи — ускорение деления клеток приведет к повышению эффективности доставки генов. Существенными недостатками трансферриновых рецепторов в качестве мишеней для переноса генов являются относительно большая молекулярная масса их лиганда трансферрина и зависимость лиганд-рецепторных взаимодействий от насыщенности трансферрина ионами железа (Ponka, Lok, 1999). Известно, что увеличение размеров комплексов ДНК/конъюгат до 100 нм приводит к существенному ухудшению проникновения ДНК в ядра клеток и как следствие к падению уровня экспрессии перенесенного гена (Erbacher et al., 1995). Зависимость эффективности эндоцитоза от насыщенности трансферрина железом создает дополнительные сложности, особенно при переносе генов *in vivo*. Указанные

ограничения молекулярных конъюгатов на основе трансферрина можно обойти, заменив трансферрин на низкомолекулярные пептидные лиганды, обладающие высокой аффинностью к трансферриновым рецепторам. Основываясь на данных Ли и соавторов (Lee et al., 2001), мы сообщаем в настоящей работе о синтезе молекулярных конъюгатов, обеспечивающих эффективную доставку генов «интереса» в пролиферирующие клетки, экспрессирующие значительные количества рецепторов трансферрина, и о создании на основе таких конъюгатов системы регенеративной генотерапии кожных покровов млекопитающих.

## Материал и методика

**Реактивы.** В работе использованы реактивы и производные аминокислот фирм Sigma Chemical Co., Fisher Scientific, Bachem (США), Reanal (Венгрия), Saxon Biochemicals GmbH (Германия), Amersham Bioscience, Roche Applied Science, Invitrogen, Promega, Gibco (США), а также отечественного производства, квалификации х. ч. и ч. д. а.; 4-(2', 4'-диметоксифенил-Гмос-аминометил)-феноксиацетида-норлейциламинометил-полимер (Gl. Biochem., Китай); ферменты для генно-инженерных работ (Fermentas, Литва, и НПО СибЭнзим, Новосибирск). Диметилформамид перед использованием перогоняли в вакууме и хранили над молекулярными ситами 4 Å. Индивидуальность производных аминокислот контролировали методом ТСХ на пластинках Merck F 254 (Германия) в следующих системах растворителей: 1%-ный аммиак-фтор-бутиловый спирт, 1 : 3 (А); хлороформ-метанол, 9 : 2 (Б); хлороформ-метанол-уксусная кислота, 90 : 7 : 3 (В). Визуализацию хроматограмм проводили УФ-облучением при 254 нм и методом обугливания в серной кислоте.

**Животные.** Мыши линии DBA-2 (самцы, 6 нед) получены из питомника РАМН «Рапполово».

**Клеточные культуры.** Линия клеток гепатоцеллюлярной карциномы (гепатомы) человека HepG2 получена из отдела клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят (Биолот, Россия), при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с содержанием CO<sub>2</sub> 5 %.

**Плазмиды.** В работе использовали плазмиду pCMVluc, описанную ранее (Акифьев и др., 2004), представляющую собой вектор экспрессии кДНК-гена люциферазы светляка *Photinus pyralis* (luc) под контролем промотора ранних генов цитомегаловируса (CMV). Плазида pCMVIGF-1s содержит синтетический ген, кодирующий инсулиноподобный фактор роста I типа человека, под контролем промотора CMV, и описана ранее (Иванов, 2007). Плазида pΔIGF-1s отличается от pCMVIGF-1s отсутствием промоторной области. Все работы по получению генетических конструкций выполняли в соответствии с описанными методиками (Маниатис и др., 1984).

**Синтез пептидов.** Катионные пептиды K8, Tat, NLS и NLS-Arg синтезировали твердофазным методом с использованием стратегии Boc/Bzl на полуавтоматическом синтезаторе NPS-4000 (Neosystem Laboratoires, Франция) на 4-метилбензогидроамино-полимере (0.55 мМ/г, 0.25 мМ). По завершении синтеза конечный продукт отщепляли от полимерного носителя с одновременным деблокированием действием 1 М раствора трифторметансульфокислоты в трифторуксусной кислоте в со-

ответствии со стандартным протоколом фирмы-производителя (Applied Biosystems Inc., США). Пептиды очищали с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-15 в 50%-ной уксусной кислоте и последующей высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Delta Pak C18 (Waters Chromatography, США) в системе  $H_2O$ —ацетонитрил—0.01%-ная трифторуксусная кислота. Молекулярные конъюгаты NLS-TSF7 и NLS-TSF12 синтезировали на 4-(2', 4'-диметоксибензил-Фмос-аминометил)-феноксацетиламино-норлейциламино-метил-полимере с содержанием аминокрупп 0.5 мМ/г. Для защиты боковой функции Ser, Thr и Tyr использовали But-группу, для Arg — Pbf, для Lys и Trp — Boc, для His — Trt. В качестве временной N $\alpha$ -защиты служила Фмос-группировка.

Отщепление синтезированных пептидов от полимера с одновременным деблокированием проводили действием смеси TIS :  $H_2O$  : TFA (2.5 : 2.5 : 95; 5 мл на 0.5 г смолы) в течение 2 ч. Дальнейшую очистку проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Анализ полученных пептидов методом ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа System Gold (Beckman, США) на колонках Zorbax 300SB-C18 (4.6×150 мм, 5 мкм) для аналитической хроматографии и Discovery C18 (10×250 мм, 5 мкм) для препаративной хроматографии. Структуру полученных пептидов подтверждали данными аминокислотного анализа и ESI-MS масс-спектрометрии. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Microtechna T339M (Чехословакия) после гидролиза пептидов 6 н. HCl при 100 °C в течение 24 ч. Масс-спектры регистрировали на времяпролетном масс-рефлектроне MX-5303 с источником ионов типа «Электроспрей» (ФИНЭПХФ РАН). Аминокислотные составы и молекулярные массы, вычисленные из данных масс-спектрометрии, соответствовали теоретическим значениям для всех синтезированных пептидов.

Приготовление комплексов плазмидной ДНК с катионными пептидами и молекулярными конъюгатами. Формирование комплексов ДНК с молекулярными конъюгатами проводили в фосфатно-солевом буфере (PBS) при различном соотношении зарядов ДНК и пептида в реакционной среде согласно методике Игнатович и др. (2002). Выявление зависимости устойчивости комплексов ДНК/конъюгат от ионной силы реакционной смеси проводили, вводя в реакцию необходимые количества NaCl. Образование комплексов ДНК/конъюгат контролировали методом гель-ретардации в агарозном геле.

Трансфекция клеток и анализ экспрессии гена-репортера, кодирующего люциферазу. Трансфекцию клеток HepG2 препаратами комплексов K8/pCMVluc, Tat/pCMVluc, NLS/pCMVluc, NLS-Arg/pCMVluc, NLS-TSF7/pCMVluc и NLS-TSF12/pCMVluc выполняли, как описано ранее (Дже и др., 2006). Клетки высевали с плотностью  $10^4$  клеток/см<sup>2</sup> на чашки Петри диаметром 30 мм и выращивали до состояния 60—70 % монослоя в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки телят (Биолот, Россия) при 37 °C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Комплексы ДНК/пептид с разными соотношениями зарядов ДНК и пептида готовили из расчета 12 мкг ДНК на чашку Петри в 500 мкл PBS. При добавлении их к клеткам в среду вводили CaCl<sub>2</sub> до концентрации 4 мМ. После инкубации с комплексами в течение 2 ч клетки отмывали от неинтернализовавшихся комплексов раствором гепарина (58 мкг/мл в PBS) и инкубировали в

среде DMEM с 10%-ной сывороткой в течение 24 ч. Активность люциферазы измеряли с использованием коммерческой системы оценки активности люциферазы Luciferase Assay System (Promega, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Измерения люминесценции производили на люминометре «Turner Biosystem 20/20». Определение концентрации белка в клеточных лизатах проводили по методу Брэдфорд. Активность люциферазы выражали в относительных световых единицах (RLU), представляющих собой число вспышек в 1 мин в расчете на 1 мг тотального белка клеточных экстрактов. Фоновые значения люминесценции не превышали 120 RLU.

Перенос комплексов плазмидной ДНК с молекулярными конъюгатами в поверхностные ткани мышей. Перед нанесением ран кожу экспериментальных животных подготавливали — удаляли волосяной покров. Резаные раны наносили с помощью хирургического скальпеля на глубину 2 мм, захватывая подлежащую мышечную ткань, в области нижней части спины. Колотые раны наносили путем 10 уколов инсулиновым шприцом в нижнюю часть спины. Инъекции экспериментальных препаратов производили инсулиновым шприцом в виде 10 уколов в каждую рану. Плазмидную ДНК и комплексы плазмидной ДНК с молекулярным конъюгатом вводили в количестве 50 мкг ДНК на мышь в 100 мкл PBS, содержащем 4 мМ CaCl<sub>2</sub>. Для измерения люциферазной активности на 3-и сут после переноса мышам плазмиды pCMVluc животных умерщвляли и вырезали участок тканей, включая рану. Для постановки эксперимента использовали 100 мг ткани каждого животного. Образцы гомогенизировали в буфере Reporter Lysis Buffer (Promega, США), замораживали и центрифугировали 3 мин при 10 000 g. Супернатант использовали для измерения люциферазной активности и концентрации белка, как описано выше.

Оценку экспрессии синтетического гена инсулиноподобного фактора роста I типа (IGF-1) проводили на 1, 3 и 7-е сут после переноса мышам pCMVIGF-1s методом RealTime RT-PCR. Образцы тканей получали, как описано выше, и использовали для выделения РНК. В качестве отрицательного контроля использовали мышей, не обработанных pCMVIGF-1s. Выделение РНК из тканей осуществляли с использованием набора TRI Reagent (Sigma, США) по инструкции фирмы-изготовителя. На 100 мкл клеток использовали 2 мл лизирующего раствора TRI Reagent. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически. Выделенная РНК была обработана ДНКазой I. Отсутствие контаминации выделенной РНК плазмидой проверяли методом PCR с использованием праймеров к гену IGF-1s. Синтез кДНК проводили с помощью набора Revert Aid® First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва). Для измерения относительного содержания мРНК применяли метод RT-PCR с использованием SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США). Все образцы нормировали по уровню экспрессии гена «домашнего хозяйства»  $\beta$ -актина. Реакцию проводили с использованием термоциклера IQ5 (Bio-Rad, США), предварительный анализ данных осуществляли с использованием прилагающегося программного обеспечения. Эффективность амплификации определяли по внешней стандартной кривой с использованием серии разведений контрольной плазмиды 5, 10, 30 и 50 нг. Рассчитанная эффективность амплификации для используемых праймеров составила 0.98 усл. ед. В качестве отрицательного контроля использовали реакцию без



добавления ДНК. Нормализацию данных проводили по количеству ткани, концентрации РНК и кДНК. Увеличение количества продукта PCR после  $n$  циклов рассчитывали методом  $\Delta Ct$  по формуле

$$R = (1 + E)^{\Delta Ct},$$

где  $Ct$  — пороговый цикл,  $E$  — эффективность амплификации,  $\Delta Ct = Ct(\text{Mod})_{\text{norm}} - Ct(\text{Nat})_{\text{norm}}$ .

Измерение площади раны на теле экспериментальных животных осуществляли с помощью фотографирования пораженного участка. Анализ фотографического материала выполняли с помощью системы компьютерного анализа изображений ImageTool for Windows 2.0 (США) согласно основным принципам стереологии в морфометрии.

Гистологическое исследование биоптатов. Образцы тканей, полученные, как описано выше, фиксировали 4 сут в 4%-ном формалине, приготавленном на PBS, обезжировали в спиртах возрастающей концентрации и ксилоле. Далее образцы заключали в коммерческий парафин Histomix и делали срезы толщиной 6 мкм. Для последующей работы использовали предметные стекла Superfrost. Парафиновые срезы далее обезжировали в ксилоле и в серии спиртов убывающей концентрации, после чего окрашивали красителем гематоксилин-эозином по стандартной методике. Полученные препараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа Leica DFC500. Митотический индекс каждого животного определяли по препаратам раны, окрашенным гематоксилин-эозином (см. выше), в 10 визуальных полях зрения по трем срезам раны с общим содержанием не менее 1000 ядер.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета Statistica Release 5.0 (StatSoft Inc., США). На диаграммах представлены средние значения из 3—5 повторностей. Плankи погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего. Различия считали достоверными при  $P < 0.05$  в парном тесте Стьюдента с неравными отклонениями.

## Результаты и обсуждение

Молекулярные конъюгаты на основе пептидных лигандов к рецептору трансферрина. В качестве лигандной составляющей для синтеза молекулярных конъюгатов были выбраны два пептида — TSF-7 (His-Ala-Ile-Tyr-Pro-Arg-His) и TSF-12 (Thr-His-Arg-Pro-Pro-Met-Trp-Ser-Pro-Val-Trp-Pro), отобранные ранее методом фагового дисплея по способности связываться с трансферриновыми рецепторами (Lee et al., 2001). Ранее мы показали, что аргинин-богатые и лизин-богатые катионные пептиды формируют полиэлектролитные комплексы с плазмидной ДНК и обеспечивают ее доставку в клетки за счет адсорбционного эндоцитоза (Ignatovich et al., 2003; Диде и др., 2006). При разработке рецепторопосредованной системы доставки следует избегать подобных путей интернализации, так как это приводит к падению специфичности переноса (см. выше). Поэтому выбору катионной составляющей было уделено особое внимание. В качестве кандидатов рассматривали модифицированный сигнал ядерной локализации Т-антигена вируса SV40 (NLS) — Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val — и сигнал ядерной локализации белка Rev вируса HIV1 (NLS-Arg) — Arg-Arg-Asn-Arg-Arg-Arg-Arg. Оба катионных пептида

эффективно связывали плазмидную ДНК с образованием полиэлектролитных комплексов (рис. 1, а). На рис. 1, б представлены результаты трансфекции культивируемых клеток гепатомы человека HepG2 вектором экспрессии pCMVluc (содержащим ген-репортер, кодирующий люциферазу, под контролем промотора ранних генов цитомегаловируса человека) в комплексах с различными катионными пептидами. В соответствии с ранее опубликованными данными (Игнатович и др., 2002; Ignatovich et al., 2003; Диде и др., 2006), лизин-богатый пептид K8 и аргинин-богатый фрагмент белка Tat вируса HIV1, а также аргинин-богатый пептид NLS-Arg обеспечивали эффективную трансфекцию клеток HepG2 за счет адсорбционного эндоцитоза. В тех же условиях эксперимента комплексы NLS/pCMVluc оказались трансфекционно неактивными. Способность связывать плазмидную ДНК и низкий уровень адсорбционного эндоцитоза комплексов NLS/ДНК обусловили выбор NLS в качестве катионной составляющей при разработке молекулярных конъюгатов на основе пептидных лигандов трансферринового рецептора. Были синтезированы два конъюгата — NLS-TSF7 (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val- $\beta$ -Ala-His-Ala-Ile-Tyr-Pro-Arg-His-NH<sub>2</sub>) и NLS-TSF12 (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val- $\beta$ -Ala-Thr-His-Arg-Pro-Pro-Met-Trp-Ser-Pro-Val-Trp-Pro-NH<sub>2</sub>). В обоих случаях соединение лигандной и катионной частей конъюгатов обеспечивалось через остаток  $\beta$ -аланина. На рис. 2 представлены результаты изучения связывания молекулярных конъюгатов с плазмидной ДНК pCMVluc. Присоединение пептидных лигандов не повлияло на способность NLS связываться с плазмидной ДНК при изотонических условиях (рис. 2, а). Вместе с тем наблюдалось снижение устойчивости комплексов при высоких значениях ионной силы раствора по сравнению со свободным катионным пептидом NLS (рис. 2, б). Оба комплекса, NLS-TSF7/pCMVluc и NLS-TSF12/pCMVluc, нестабильны при ионной силе раствора, превышающей 300 мМ. В целом комплекс NLS-TSF7/pCMVluc оказался более стабильным, чем NLS-TSF12/pCMVluc, что, по-видимому, объясняется большей плотностью положительного заряда в случае NLS-TSF7 (отношение массы к заряду 304.71) по сравнению с NLS-TSF12 (отношение массы к заряду 404.3).

Трансфекционная активность комплексов pCMVluc с молекулярными конъюгатами NLS-TSF7 и NLS-TSF12. Трансфекционную активность комплексов NLS-TSF7/pCMVluc и NLS-TSF12/pCMVluc оценивали на клетках HepG2, экспрессирующих значительные количества трансферриновых рецепторов. Оба комплекса оказались способными обеспечивать экспрессию перенесенного гена (рис. 3, а). Учитывая практически полное отсутствие адсорбционного эндоцитоза (см. рис. 1, б), можно заключить, что трансфекция обеспечивалась за счет рецепторопосредованного эндоцитоза через трансферриновые рецепторы. Еще одним указанием на роль рецепторопосредованного эндоцитоза в интернализации комплексов молекулярных конъюгатов с ДНК является отсутствие стимулирующего эффекта свободных, не связанных с ДНК конъюгатов на уровень трансфекции клеток (рис. 3, а). Ранее мы показали, что для комплексов плазмидной ДНК с катионными пептидами K8 и Tat (проникают в клетки адсорбционным эндоцитозом) добавление к клеткам при трансфекции избытков свободных пептидов ведет к существенному возрастанию эффективности трансфекции, по-видимому за счет защиты комплексов от разрушения отрицательно заряженными протеогликанами клеточной поверхности (Ignatovich

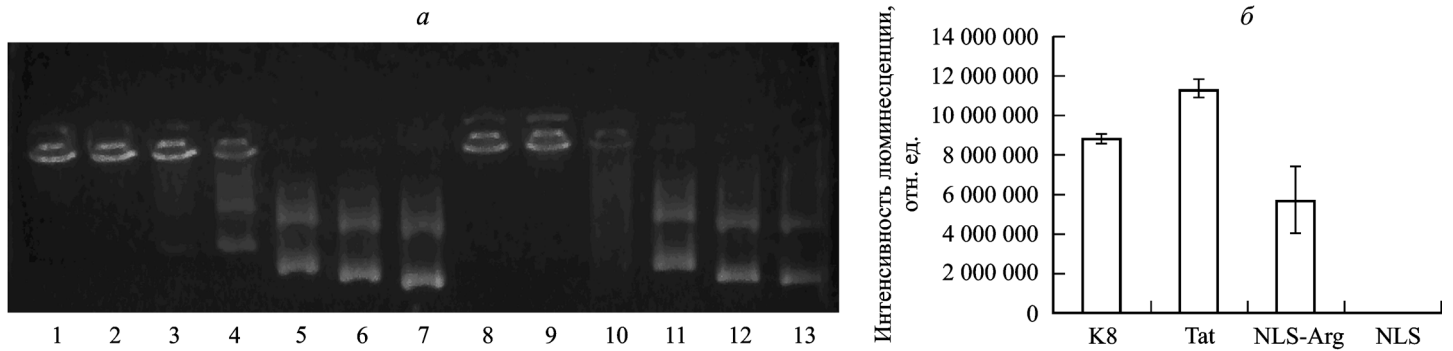


Рис. 1. Комплексы плазмидной ДНК с катионными пептидами NLS и NLS-Arg.

*a* — образование комплексов NLS/pCMVluc и NLS/Arg/pCMVluc при различных соотношениях зарядов ДНК: пептид (гель-ретардация): 1–6 — комплекс pCMVluc/NLS; соотношения зарядов pCMVluc : NLS: 1 — 1 : 2, 2 — 1 : 1.5, 3 — 1 : 1, 4 — 1 : 0.75, 5 — 1 : 0.5, 6 — 1 : 0.25; K — свободная pCMVluc; 7–12 — комплекс pCMVluc/NLS-Arg; соотношения зарядов pCMVluc : NLS-Arg: 7 — 1 : 2, 8 — 1 : 1.5, 9 — 1 : 1, 10 — 1 : 0.75, 11 — 1 : 0.5, 12 — 1 : 0.25. *б* — тестирование трансфекционной активности комплексов pCMVluc с катионными пептидами (люциферазный тест): клетки HepG2 трансфицировали комплексами pCMVluc с катионными пептидами K8, Tat, NLS-Arg и NLS. Приведены средние значения 3 независимых экспериментов. Планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего.

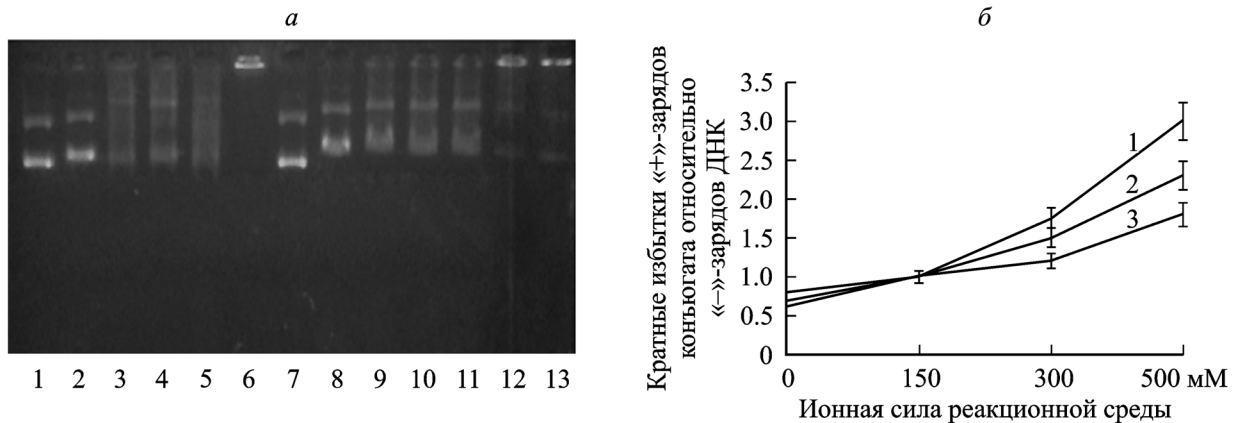


Рис. 2. Тестирование комплексов pCMVluc с молекулярными конъюгатами NLS-TSF7 и NLS-TSF12.

*a* — подбор молярных соотношений методом гель-ретардации; дорожки: 1–7 — комплекс pCMVluc/NLS-TSF7; соотношения зарядов ДНК : NLS-TSF7: 1 — 1 : 0.25, 2 — 1 : 0.38, 3 — 1 : 0.5, 4 — 1 : 0.63, 5 — 1 : 0.75, 6 — 1 : 1; 7 — свободная pCMVluc; 8–13 — комплекс pCMVluc/NLS-TSF12; соотношения зарядов ДНК : NLS-TSF12: 8 — 1 : 0.25, 9 — 1 : 0.38, 10 — 1 : 0.5, 11 — 1 : 0.63, 12 — 1 : 0.75, 13 — 1 : 1. *б* — зависимость электростатических взаимодействий молекулярных конъюгатов с плазмидной ДНК от ионной силы реакционной среды; 1 — NLS-TSF12, 2 — NLS-TSF7, 3 — NLS.

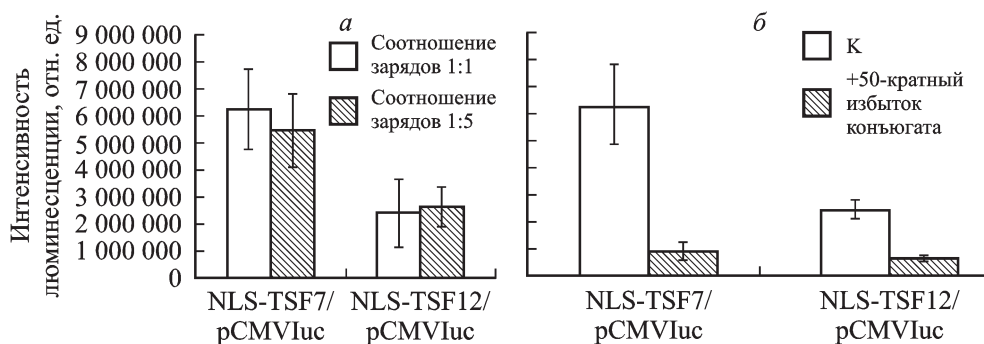


Рис. 3. Трансфекционная активность комплексов pCMVluc с молекулярными конъюгатами NLS-TSF7 и NLS-TSF12.

*a* — зависимость уровня активности люциферазы от присутствия в среде при трансфекции свободных молекулярных конъюгатов; *б* — влияние значительных избытков молекулярных конъюгатов на уровень экспрессии гена люциферазы. Клетки HepG2 трансфицировали комплексами NLS-TSF7/pCMVluc и NLS-TSF12/pCMVluc, приготовленными при соотношении зарядов ДНК : пептид 1 : 1 или 1 : 5 (содержат свободные молекулярные конъюгаты). В конкурентных экспериментах к клеткам при трансфекции добавляли 50-кратный избыток свободных молекулярных конъюгатов. Приведены средние значения 3 независимых экспериментов. Планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего.

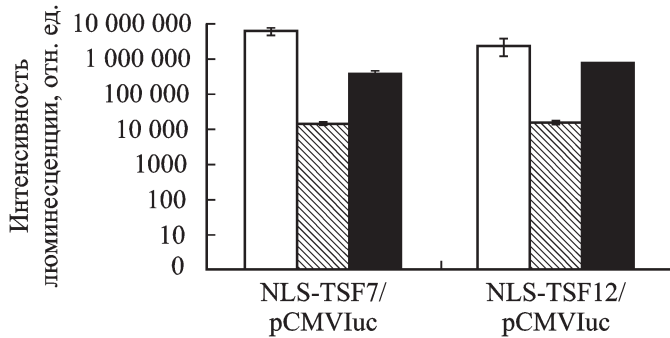


Рис. 4. Факторы, влияющие на эффективность трансфекции клеток HerG2 комплексами NLS-TSF7/pCMVluc и NLS-TSF12/pCMVluc (люциферазный тест).

Белые столбики — трансфекция клеток комплексами NLS-TSF7/pCMVluc и NLS-TSF12/pCMVluc, приготовленными при соотношении зарядов ДНК : пептид 1 : 1; заштрихованные столбики — трансфекция клеток без добавления 4 мМ CaCl<sub>2</sub>; черные столбики — трансфекция клеток с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки телят. Приведены средние значения 3 независимых экспериментов. Планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего.

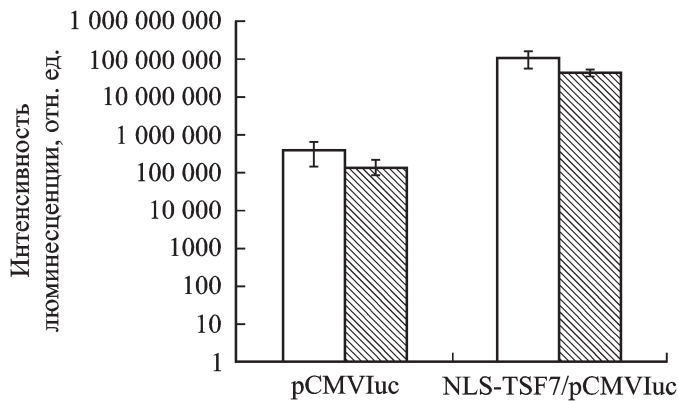


Рис. 5. Перенос плазмиды pCMVluc в поверхностные ткани мышей в комплексе с молекулярным конъюгатом NLS-TSF7 (люциферазный тест).

Белые столбики — здоровые мыши, 10 инъекций свободной pCMVluc (50 мкг на мышь) или комплекса NLS-TSF7/pCMVluc, приготовленного при соотношении зарядов ДНК : пептид 1 : 1 (50 мкг pCMVluc на мышь), вокруг нормального участка кожи в нижней части спины (S~60 мм<sup>2</sup>); заштрихованные столбики — мыши с резаной раной, 10 инъекций приготовленного при соотношении зарядов ДНК : пептид 1 : 1 (50 мкг pCMVluc на мышь), вокруг резаной раны в нижней части спины (S~60 мм<sup>2</sup>). Приведены средние значения 6 независимых экспериментов. Планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего.

et al., 2003). Такая зависимость отсутствует в случае молекулярных конъюгатов на основе аналогов люлиберина, проникающих в клетки при участии соответствующих рецепторов (Буров и др., 2007; Ефремов и др., 2010). Прямые доказательства роли рецепторопосредованного эндцитоза были получены в экспериментах по трансфекции клеток HerG2 в присутствии значительных избытков свободных молекулярных конъюгатов. Добавление к клеткам 50-кратного избытка свободного конъюгата приводило к падению уровня трансфекции клеток как комплексами NLS-TSF7/pCMVluc, так и комплексами NLS-TSF12/pCMVluc (рис. 3, б).

При разработке систем переноса генов важно учитывать влияние ряда факторов на эффективность доставки. На рис. 4 представлены результаты экспериментов по

изучению влияния ионов Ca<sup>2+</sup> и эмбриональной сыворотки телят (ЭБС) на эффективность трансфекции клеток HerG2 комплексами pCMVluc с молекулярными конъюгатами NLS-TSF7 и NLS-TSF12. При низких концентрациях или отсутствии ионов Ca<sup>2+</sup> (менее 2 мМ) уровень экспрессии перенесенного гена снижался практически до нуля. Полученные результаты хорошо согласуются с представлением о рецепторопосредованном характере проникновения комплексов в клетки, так как в этом процессе ионы Ca<sup>2+</sup> играют существенную роль. Еще одним важным фактором, существенно влияющим на эффективность трансфекции клеток полиэлектролитными комплексами, является присутствие в культуральной среде белков сыворотки крови. Ранее мы показали, что трансфекция клеток комплексами ДНК с катионным пептидом Tat и с молекулярными конъюгатами на основе аналогов люлиберина в присутствии белков сыворотки крови приводит к существенному снижению уровня экспрессии перенесенного гена (Ignatovich et al., 2003; Буров и др., 2007). Это может иметь решающее значение при разработке систем переноса генов in vivo. Аналогичные эксперименты были проведены и с молекулярными конъюгатами NLS-TSF7 и NLS-TSF12. Установлено, что введение при трансфекции клеток в культуральную среду 10 % ЭБС приводило к падению уровня экспрессии перенесенного гена (рис. 4). Интересно отметить, что в присутствии сыворотки уровень трансфекции клеток комплексами ДНК с NLS-TSF12 выше, чем в случае комплексов ДНК с NLS-TSF7, несмотря на то что в отсутствие сыворотки наблюдалась обратная ситуация. Это обстоятельство необходимо учитывать при дальнейшей модернизации невирусных систем переноса генов на основе синтезированных молекулярных конъюгатов. Для решения задач настоящей работы — разработки системы регенератив-

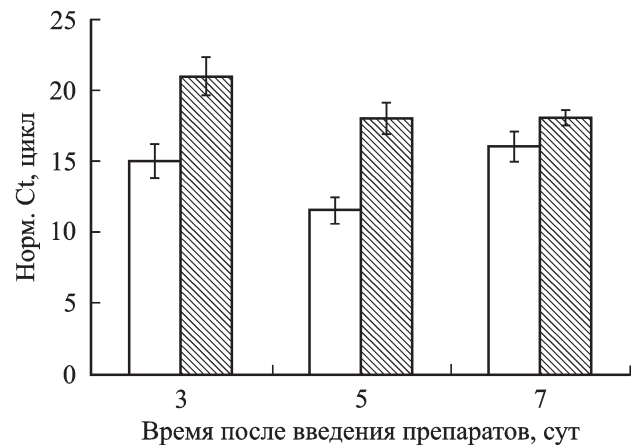


Рис. 6. Анализ экспрессии синтетического гена IGF1 человека методом RT-PCR после переноса в поверхностные ткани мышей вектора экспрессии pCMVIGF-1s с помощью инъекций свободной ДНК (белые столбики) или комплексов NLS-TSF7/pCMVIGF-1s (заштрихованные столбики).

На графике приведены нормированные значения циклов (норм. Ст. цикл), при которых флуоресценция достигает порогового уровня (~10-кратное превышение фона). Белые столбики, соответствующие экспериментам на мышах, инъецированных комплексами pCMVIGF-1s/NLS-TSF7, расположены ниже, так как при увеличении количества транскрибируемой РНК кривая накопления продуктов PCR переходит в логарифмическую фазу раньше. При этом отличие на 1 цикл соответствует разнице концентраций РНК в 2 раза. Приведены средние значения 3 независимых экспериментов. Планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего.



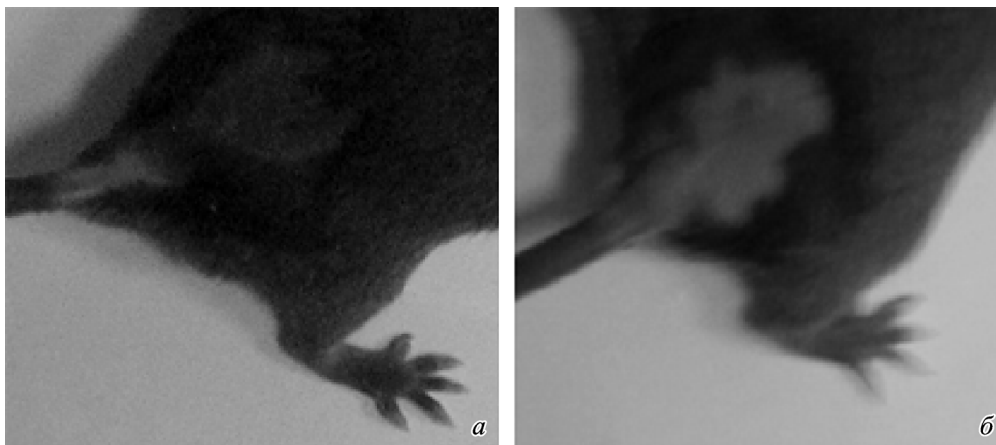


Рис. 7. Состояние резаной раны на 14-е сут после начала эксперимента у мышей, инъецированных свободным молекулярным конъюгатом NLS-TSF7 (а) и комплексами NLS-TSF7/pCMVIGF-1s (б).

У мышей, инъецированных комплексами, наблюдается полное заживление раны.

ной генотерапии поверхностных повреждений тканей млекопитающих — более оптимальным представляется молекулярный конъюгат NLS-TSF7, тогда как в случае работ по переносу генов, требующих системного введения препаратов в кровяное русло, NLS-TSF12 может оказаться предпочтительнее.

Перенос гена-репортера, кодирующего люциферазу, в комплексе с молекулярным конъюгатом NLS-TSF7 в кожные покровы мышей. Проверка способности комплексов ДНК с молекулярным конъюгатом NLS-TSF7 проникать в клетки поверхностных тканей была проведена на мышах линии DBA-2 (самцы, 6 нед). Комплексы NLS-TSF7/pCMVluc (соотношение зарядов 1 : 1) либо вводили в кожу здоровых животных (10 уколов вокруг площади ~60 мм<sup>2</sup>), либо обкалывали рану сходной площади. Количество комплексов соответствовало 50 мкг ДНК на мышь. Контрольной группе мышей проводили инъекции такого же количества свободной плазмиды pCMVluc. Активность люциферазы измеряли в лизатах, полученных из биоптатов поверхностных тканей мышей в области инъекций на 3-и сут после начала эксперимента и выравнивали по содержанию тотального белка в лизатах. Результаты представлены на рис. 5. Использование при инъекциях комплексов NLS-TSF7/pCMVluc приводило к возрастанию люциферазной активности более чем в 100 раз по сравнению с инъекциями свободной ДНК. Существенной разницы в

уровне экспрессии перенесенного гена при инъекциях здоровым животным и животным с резаными ранами отмечено не было (рис. 5). Таким образом, синтезированный молекулярный конъюгат NLS-TSF7 способен эффективно переносить гены в поверхностные ткани млекопитающих. Полученные результаты позволили перейти к разработке системы регенерационной генотерапии поверхностных повреждений млекопитающих.

Модель регенерационной генотерапии повреждений кожных покровов мышей. При разработке модели регенерационной генотерапии использовали полученный нами ранее синтетический ген, кодирующий инсулиноподобный фактор роста I типа человека (IGF-1). От природного синтетический ген отличается множественными нуклеотидными заменами, не меняющими аминокислотную последовательность кодируемого белка, но удаляющими AU-богатые сайты, отвечающие за дестабилизацию соответствующей мРНК. Подобные замены привели к возрастанию уровня экспрессии гена более чем в 100 раз (Иванов и др., 2007). Мышам с резаными ранами переносили вектор экспрессии pCMVIGF-1s, содержащий синтетический ген IGF-1 под контролем промотора ранних генов цитомегаловируса человека. Для эксперимента использовали мышей линии DBA-2 в возрасте 6 нед. (самцы). В эксперименте были сформированы 4 группы животных по 10 мышей в каждой. Опытные группы инъецировали либо свободной pCMVIGF-1s, либо

#### Динамика регенерации ранений кожных покровов мышей

Обработка ран генетическими конструкциями	Площадь ран (мм <sup>2</sup> ) на разных сроках, сут				
	1	7	10	14	21
pCMVIGF-1s	60.0 ± 13.5	28.5 ± 6.0	12 ± 3	0	0
NLS-TSF7/pCMVIGF-1s	57.0 ± 11.2	24.0 ± 7.5	6 ± 2	0	0
pIGF-1s	66 ± 20	42 ± 9	24.0 ± 5.5	10.5 ± 6.0	0
NLS-TSF7	62.0 ± 13.5	46.5 ± 8.0	28.5 ± 6.0	10.5 ± 4.5	0

Примечание. pCMVIGF-1s — мыши, инъецированные свободным вектором экспрессии инсулиноподобного фактора роста I типа человека; NLS-TSF7/pCMVIGF-1s — мыши, инъецированные комплексами NLS-TSF7/pCMVIGF-1s; pIGF-1s — мыши, инъецированные свободным вектором экспрессии инсулиноподобного фактора роста I типа человека с делетированным промотором; NLS-TSF7 — мыши, инъецированные свободным молекулярным конъюгатом NLS-TSF7.

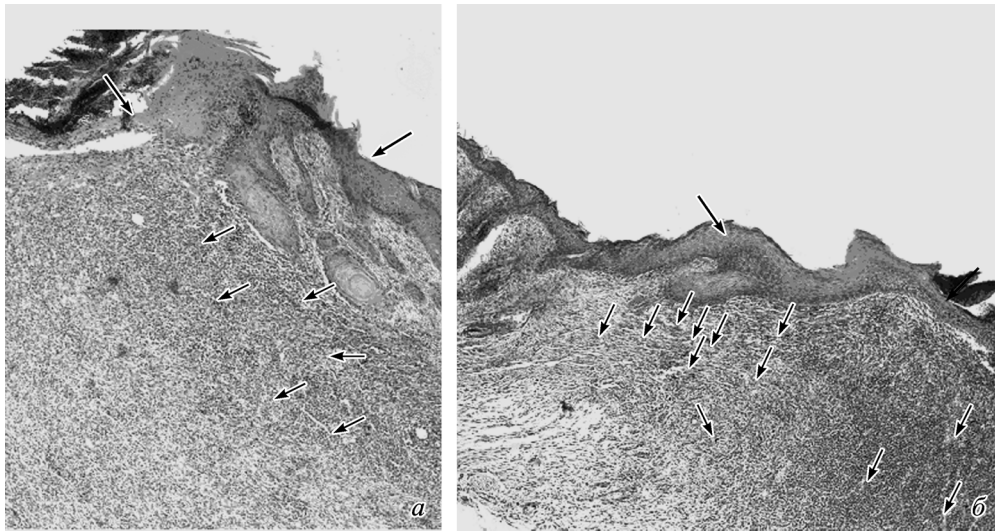


Рис. 8. Препарат раны поверхностных тканей мыши, обработанной комплексом NLS-TSF7/pCMVIGF-1s (а) и свободным NLS-TSF7 (б, отрицательный контроль).

Биоптаты получены на 10-е сут после начала эксперимента. Стрелки указывают на сосуды, двойная стрелка — на участок неповрежденного эпидермиса, головка стрелки — на участок раны. Окраска среза ткани гематоксилин-эозином. 40×.

комплексами NLS-TSF7/pCMVIGF-1s (соотношение зарядов 1 : 1). Инъекции проводили десятикратно в области, окружающие рану. Для инъекций использовали 50 мкг ДНК на мышь в 100 мкл PBS, содержащего 4 mM CaCl<sub>2</sub>. Контрольные группы получали инъекции плазмидной ДНК с делетированным промотором (pΔIGF-1s) или свободного конъюгата NLS-TSF7. На 3, 5 и 7-е сут по 2 мыши из каждой группы умерщвляли и из областей, прилегающих к ране, выделяли РНК, которую использовали для количественной оценки экспрессии IGF-1 методом RT-PCR. Результаты приведены на рис. 6. Уровень экспрессии гена IGF-1 на 3-и и 5-е сут после начала эксперимента был выше в 64—128 раз при инъекциях комплексов NLS-TSF7/pCMVIGF-1s по сравнению с инъекциями свободной pCMVIGF-1s. У контрольных мышей, инъектированных плазмидой с делетированным промотором или свободным молекулярным конъюгатом NLS-TSF7, экспрессии IGF-1 человека зарегистрировано не было. Полученные данные подтверждают результаты, представленные на рис. 5, свидетельствующие о высокой эффективности молекулярного конъюгата NLS-TSF7 при доставке генов в поверхностные ткани млекопитающих.

Оценку скорости регенерации проводили, измеряя площадь ран на 7, 10, 14 и 21-е сут после начала эксперимента (см. раздел «Материал и методика»).

Результаты суммированы в таблице. На рис. 7 приведены фотографии мышей, инъектированных свободным NLS-TSF7 и комплексами NLS-TSF7/pCMVIGF-1s на 14-е сут после начала эксперимента. Инъекции как свободной pCMVIGF-1s, так и комплексов NLS-TSF7/pCMVIGF-1s приводили к существенному ускорению процесса заживления раны по сравнению с заживлением ран в контрольных группах. Через 14 сут после начала эксперимента у мышей, инъектированных комплексами NLS-TSF7/pCMVIGF-1s, происходило полное заживление раны, тогда как в контрольных группах площадь раны составляла около 10 мм<sup>2</sup> (~17% от исходного размера) (рис. 7; см. таблицу). Более того, у мышей, инъектированных комплексами NLS-TSF7/pCMVIGF-1s, на 10-е сут после начала эксперимента размер раны был в 2 раза мень-

ше, чем у мышей, инъектированных свободной плазмидой, и в 4 раза меньше по сравнению с контрольными группами. На 10-е сут после начала эксперимента проводили гистологическое исследование биоптатов ран (рис. 8). Установлено, что у мышей, инъектированных комплексами NLS-TSF7/pCMVIGF-1s, грануляционная ткань более выражена (более толстый слой, большее количество сосудов) по сравнению с контрольной группой животных, инъектированных свободным конъюгатом NLS-TSF7. Кроме того, у мышей, инъектированных комплексом NLS-TSF7/pCMVIGF-1s, больше развит слой эпидермиса на границе раны. Параллельно проводили оценку митотического индекса фибробластов в области раны. Установлено, что перенос мышам pCMVIGF-1s в комплексе с молекулярным конъюгатом NLS-TSF7 приводит к возрастанию числа пролиферирующих фибробластов в 2,6 раза (митотический индекс 1,6) по сравнению с контрольной группой животных, инъектированных свободным конъюгатом NLS-TSF7 (митотический индекс 0,6).

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности разработанной системы невирусной регенерационной генотерапии кожных покровов млекопитающих, основанной на применении молекулярных конъюгатов с высокой тропностью к рецепторам трансферрина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (Государственный контракт 02.512.11.2274).

#### Список литературы

- Акифьев Б. Н., Дижэ Э. Б., Ефремов А. М., Могиленко Д. А., Олейникова Г. Н., Лапиков И. А., Жданова О. А., Кидготко О. В., Орлов С. В., Перевозчиков А. П. 2004. Перенос гена человеческого аполипопротеина А-I мышам методом гидродинамических инъекций: факторы, влияющие на эффективность и продолжительность экспрессии гена в печени животного. Молекуляр. биол. 38 (6) : 1076—1084.
- Буров С. В., Яблокова Т. В., Орлов С. В., Перевозчиков А. П. 2007. Молекулярный конъюгат на основе синтетических анало-



гов люлиберина и его применение в качестве средства доставки ДНК в клетки гормон-чувствительных опухолей (варианты). Заявка на изобретение 2007148383/04 от 27.12.2007.

Дижэ Э. Б., Игнатович И. А., Буров С. В., Похвоицева А. В., Акифьев Б. Н., Перевозчиков А. П., Орлов С. В. 2006. Комплексы ДНК с катионными пептидами: условия формирования и факторы, влияющие на их проникновение в клетки млекопитающих. Биохимия. 71 (12) : 1659—1667.

Ефремов А. М., Буглаева А. О., Орлов С. В., Буров С. В., Игнатович И. А., Дижэ Э. Б., Шавва В. С., Перевозчиков А. П. 2010. Перенос генетических конструкций через трансплацентарный барьер в зародыши мыши. Онтогенез. 41 (1) : 28—34.

Иванов И. А. 2007. Фармацевтическая композиция для генной терапии заболеваний, требующих стимуляции регенераторных процессов, включая повреждения тканей человека различной этиологии, на основе синтетического модифицированного гена инсулиноподобного фактора роста человека первого типа (ИФР-1, IGF-1). Заявка на изобретение 2007124538/15 от 02.07.2007.

Игнатович И. А., Дижэ Э. Б., Акифьев Б. Н., Буров С. В., Боярчук Е. А., Перевозчиков А. П. 2002. Доставка «супцидного» гена тимидинкиназы вируса герпеса в комплексе с катионным пептидом в клетки гепатомы человека *in vitro*. Цитология. 44 (12) : 455—462.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 479 с.

Bowler P. G. 2002. Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. *Ann. Med.* 34 : 419—427.

Erbacher P., Roche A. C., Monsigny M., Midoux P. 1995. Glycosylated polylysine/DNA complexes: gene transfer efficiency in relation with the size and the sugar substitution level of glycosylated polylysines and with the plasmid size. *Bioconj. Chem.* 6 : 401—410.

Ferguson M. W. J., Duncan J., Bond J., Bush J., Durani P., So K., Taylor L., Chantrey J., Mason T., James G., Laverty H., Occleston N. L., Sattar A., Ludlow A., O'Kane S. 2009. Prophylactic ad-

ministration of avotermin for improvement of skin scarring: three double-blind, placebo-controlled, phase I/II studies. *Lancet.* 373 : 1264—1274.

Ignatovich I. A., Dizhe E. B., Pavlotskaya A. V., Akifiev B. N., Burov S. V., Orlov S. V., Perevozchikov A. P. 2003. Complexes of plasmid DNA with basic domain 47—57 of the HIV Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways. *J. Biol. Chem.* 278 : 42 625—42 636.

Inoue T., Cavanaugh P. G., Steck P. A., Brunner N., Nicolson G. L. 1993. Differences in transferrin response and numbers of transferrin receptors in rat and human mammary carcinoma lines of different metastatic potentials. *J. Cell. Physiol.* 156 : 212—217.

Jones A. R., Shusta E. V. 2007. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm. Res.* 24 : 1759—1771.

Lee J. H., Engler J. A., Collawn J. F., Moore B. A. 2001. Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor. *Eur. J. Biochem.* 268 : 2004—2012.

Macri L., Clark R. A. 2009. Tissue engineering for cutaneous wounds: selecting the proper time and space for growth factors, cells and the extracellular matrix. *Skin Pharmacol. Physiol.* 22 : 83—93.

Makinen K., Manninen H., Hedman M., Matsi P., Mussalo H., Alhava E., Yla-Herttuala S. 2002. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol. Ther.* 6 : 127—133.

Molas M., Gómez-Valadés A. G., Vidal-Alabré A., Miguel-Turru M., Bermudez J., Bartrons R., Perales J. C. 2003. Receptor-mediated gene transfer vectors: progress towards genetic pharmaceuticals. *Curr. Gene Ther.* 3 : 468—485.

Ponka P., Lok C. N. 1999. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 : 1111—1137.

Thorstensen K., Romslo I. 1993. The transferrin receptor: its diagnostic value and its potential as therapeutic target. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 53 : 113—120.

Поступила 3 VIII 2009

#### NON-VIRAL GENE THERAPY APPROACH FOR REGENERATIVE RECOVERY OF SKIN WOUNDS IN MAMMALS

A. M. Efremov,<sup>1—3</sup> I. V. Duhovlinov,<sup>1</sup> E. B. Dizhe,<sup>1,3</sup> S. V. Burov,<sup>4,5</sup> M. V. Leko,<sup>4,5</sup> B. N. Akifiev,<sup>1,3</sup> D. A. Mogilenko,<sup>1—3</sup> I. A. Ivanov,<sup>1</sup> A. P. Perevozchikov,<sup>1—3</sup> S. V. Orlov<sup>1—3,\*</sup>

<sup>1</sup> Pharma Gen Ltd. St. Petersburg, <sup>2</sup> St. Petersburg State University, <sup>3</sup> Institute of Experimental Medicine RAMS,

<sup>4</sup> Institute of Macromolecular Compounds RAS and <sup>5</sup> Diapharm Ltd., St. Petersburg;

\* mail: serge@iem.sp.ru

The rate and character of skin tissue regeneration after wounds, burns and other traumas depend on the cell proliferation within damaged area. Acceleration of healing by stimulation of cell proliferation and extracellular matrix synthesis is one of the most important tasks of modern medicine. There are gene therapy approaches to wound treatment consisting in the transfer of genes encoding mitogenic growth factors to wound area. The most important step in the development of gene therapy approaches is the design of gene delivery tools. In spite of high efficacy of viral vectors, the non-viral means have some preferences (low toxicity, low immunogenicity, safety and the absence of backside effects). Among non-viral gene delivery tools, molecular conjugates are the most popular because of their efficacy, simplicity, and the capacity to the targeted gene transfer. In the present work we have developed two molecular conjugates — NLS-TSF7 and NLS-TSF12 consisting of the modified signal of nuclear localization of T-antigen of SV40 virus (cationic part) and the peptide ligands of mammalian transferrin receptor (ligand part). These conjugates bind to plasmid DNA with formation of polyelectrolytic complexes and are capable to deliver plasmid DNA into cells expressing transferrin receptors by receptor-mediated endocytosis. Transfer of the expression vector of luciferase gene in the complex with molecular conjugate NLS-TSF7 to murine surface tissues led to about 100 fold increasing of luciferase activity in comparison with the transfer of free expression vector. Treatment of slash wounds in mice with the complexes of expression vector of synthetic human gene encoding insulin-like growth factor 1 with molecular conjugates NLS-TSF7 led to acceleration of healing in comparison with mice treated with free expression vector. The results obtained confirm the high efficiency of the developed regenerative gene therapy approach for the treatment of damaged skin tissues in mammals.

Key words: molecular conjugates, gene transfer, regenerative gene therapy, transferrin receptor, insulin-like growth factor 1.