

Явления самосборки и молекулярного «узнавания» в растворах (био)полиэлектролитных комплексов

В.А.Изумрудов

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет
119991 Москва, Ленинские горы, факс (495) 939–0174

Систематизированы результаты проведенных недавно исследований полиэлектролитных комплексов, построенных как из разноименно заряженных синтетических полиионов, так и из природных полиэлектролитов (белков, ферментов, нуклеиновых кислот). Показано, что свойства таких комплексов и фазовое поведение их растворов подчиняются основным закономерностям, установленным при изучении кооперативного интерполиэлектролитного взаимодействия. Найдены принципы функционирования полиэлектролитных комплексов, лежащие в основе самосборки комплексных частиц и определяющие способность комплексов сохранять устойчивость в заданном широком интервале изменения внешних условий, а затем быстро, обратимо и с высокой чувствительностью реагировать на изменение среды изменением молекулярных характеристик и фазового состояния. Продемонстрирована плодотворность использования результатов фундаментальных исследований (био)полиэлектролитных комплексов для решения актуальных задач биотехнологии, науки о материалах и медицины.

Библиография — 111 ссылок.

Оглавление

I. Введение	401
II. Комплексообразование в растворах противоположно заряженных синтетических полиэлектролитов	402
III. Интерполиэлектролитные реакции в растворах полипепсидов	408
IV. Комплексы глобулярных белков с полиионами	411
V. Заключение	412

I. Введение

Последняя четверть прошлого столетия ознаменовалась бурным развитием физической химии полиэлектролитных комплексов (ПЭК), образующихся в результате кооперативного электростатического взаимодействия поликатионов с полианионами при смешивании водных растворов противоположно заряженных полиэлектролитов. Интерес к таким комплексам во многом обусловлен перспективностью их использования для решения важных практических задач в промышленности, экологии и медицине.¹ Параллельно с изучением ПЭК на основе синтетических полиэлектролитов велись интенсивные исследования белок-полиэлектролитных комплексов (БПК), в которых положительно или отрицательно заряженный глобулярный белок выступает в роли партнера противоположно заряженного полиэлектролита.

В.А.Изумрудов. Доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ. Телефон: (495) 939–3117, e-mail: izumrud@genebee.msu.ru

Область научных интересов: растворы полиэлектролитов, полиэлектролитные комплексы, конкурентные реакции полиионов в растворах и на поверхности раздела фаз.

Дата поступления 26 ноября 2007 г.

Многочисленные данные о реакциях образования и свойствах ПЭК и БПК обобщены в обзорах^{2–9}. Существует глубокая связь между механизмами формирования и разрушения комплексов обоих типов, структурной организацией водорастворимых ПЭК и БПК и изменением фазового состояния их растворов. Общность в поведении комплексов, образованных парами противоположно заряженных синтетических полиионов и полученных с участием природных полиэлектролитов, позволила сформулировать критерии существования таких систем и выявить универсальные принципы их функционирования.

Созданный единый подход к описанию полиэлектролитных комплексов различного происхождения послужил фундаментом для дальнейшего развития этого направления, расширения круга объектов исследования и открытия все новых сфер их практического приложения. Заряженные блок-сополимеры с незаряженными гидрофобными^{10, 11} или гидрофильными⁸ блоками; гидрофильные¹² или гидрофобные¹³ дендримеры различных поколений; полибетаины;^{14, 15} звездообразные полиэлектролиты;¹⁶ полиэлектролитные щетки¹⁷ и слабосшитые полиэлектролитные гидрогели¹ — вот далеко не полный перечень синтетических полиэлектролитов различной структуры, которые могут служить компонентами полиэлектролитных комплексов. Важно отметить, что усложнение структуры компонентов не приводит к кардинальным изменениям свойств систем, что позволяет прогнозировать поведение вновь синтезируемых ПЭК и

использовать комплексообразование в качестве эффективного средства направленного изменения свойств полимеров с целью придания им качеств, необходимых для практического применения.

Это в полной мере относится и к «биополиэлектrolитным» комплексам, в которых один или оба компонента являются заряженными биополимерами. Примером могут служить работы по исследованию взаимодействия поликатионов с ДНК — природным полианионом сложной структуры. Систематическое изучение продуктов такого взаимодействия, так называемых «полиплексов», началось 15 лет назад (см. обзор⁵). В настоящее время это направление активно развивается. Полиплексы используются, например, при создании полиэлектролитных невирусных носителей для генной терапии или для эффективного выделения плазмидных ДНК из клеточных лизатов. В основе функционирования подобных систем, которые представляют несомненный практический интерес, лежат те же принципы кооперативного электростатического взаимодействия, обеспечивающие самосборку комплексов и их поведение как «умных» полиэлектролитов.

Настоящий обзор призван привлечь внимание ученых, работающих в смежных областях полимерной химии, биохимии, энзимологии, биотехнологии и науки о материалах, к уникальным свойствам ПЭК и БПК, среди которых особо следует отметить универсальность их поведения, простоту получения, высокую стабильность и готовность вступать в конкурентные интерполиэлектролитные реакции (последние могут отличаться высокой избирательностью).

Большое внимание уделено рассмотрению факторов, влияющих на селективность интерполиэлектролитного взаимодействия, поскольку эффекты молекулярного «узнавания» лежат в основе способности комплексов к самосборке в водных растворах и определяют их высокую чувствительность к изменению окружающей среды. Установлено, что полиэлектролитные комплексы могут сохранять устойчивость в широком интервале изменения внешних условий (рН, ионной силы, температуры), а затем быстро и обратимо реагировать на очень незначительные их колебания кардинальным изменением молекулярных характеристик и фазового состояния. Особенно ценно, что перестройка комплексов может осуществляться в условиях, благоприятных для функционирования природных полиионов (белков, ферментов, нуклеиновых кислот), что позволяет использовать полиэлектролитные системы для решения прикладных задач биологии и медицины. В обзоре представлены и подробно проанализированы результаты недавно опубликованных работ по биополиэлектролитным комплексам, в которых фундаментальные исследования имеют выраженную практическую направленность. Эти данные свидетельствуют о непрерывном развитии рассматриваемого подхода и его большом потенциале.

II. Комплексообразование в растворах противоположно заряженных синтетических полиэлектролитов

Цепи линейных синтетических поликатионов и полианионов с высокой плотностью заряда являются относительно простыми, доступными и удобными модельными объектами для выявления принципов интерполиэлектролитного взаимодействия. Полиэлектролитные комплексы, образующиеся в результате кооперативной реакции связывания двух разноименно заряженных полиионов, представляют собой особое

семейство полимерных соединений. Степень превращения (θ) полиионов в этой реакции определяют как отношение равновесного числа образующихся в данных условиях ионных пар к максимально возможному их количеству. Если хотя бы один из компонентов смеси является слабым полиэлектролитом, степень превращения θ в реакции можно контролировать изменением рН среды. Значение θ рассчитывают из кривых потенциометрического титрования слабых полиэлектролитов в присутствии противоположно заряженных полиионов, как описано в обзоре¹. Из сравнения кривых, описывающих экспериментальные зависимости θ от рН, с кривыми, описывающими зависимости степени ионизации слабых полиэлектролитов от рН, следует, что слабые полиэлектролиты в присутствии противоположно заряженных полиионов становятся более сильными, т.е. высокозаряженный полимер вызывает дополнительную ионизацию слабых кислотных или слабых основных групп партнера, связанного с ним в комплекс (см. обзор³). Это значительно расширяет область существования устойчивых ПЭК, увеличивая тем самым ряды полианионов и поликатионов, пригодных для приготовления стабильных ПЭК.

Эффект зарядения слабого полиэлектролита на высокозаряженной полимерной матрице имеет ряд интересных практических приложений. Так, с его помощью удалось значительно повысить эффективность доставки целевого генетического материала в ядра клеток¹⁸ и добиться существенной стабилизации ПЭК и БПК в растворе и на поверхности раздела фаз в заданном интервале изменения рН,^{19–21} а также наделить ультратонкие мультислойные полиэлектролитные пленки и нанокапсулы способностью выделять низкомолекулярный наполнитель (краситель) в ответ на сорбцию полииона из раствора.²²

Полиэлектролитные комплексы обладают двумя, на первый взгляд взаимоисключающими, свойствами, а именно — высокой устойчивостью и лабильностью. Будучи весьма стабильными, ПЭК легко вступают в конкурентные интерполиэлектролитные реакции, которые сопровождаются переносом полиионов из одних комплексов на другие. Сочетание этих свойств и селективности кооперативного электростатического связывания обеспечивает самосборку ПЭК в водных растворах и создает предпосылки для разработки полиэлектролитных систем, чутко реагирующих на изменение среды в определенных условиях.

1. Стабильность полиэлектролитных комплексов

Кооперативный характер многоточечного электростатического связывания делает ПЭК чрезвычайно устойчивыми к диссоциации на исходные макромолекулярные компоненты. Эффективная константа диссоциации комплексов резко падает с увеличением степени полимеризации (P) короткого компонента (олигомера). Это следует из результатов теоретического рассмотрения кооперативного взаимодействия в системах полимер — олигомер, впервые проведенного в работах^{23, 24}. Позже полученные в этих работах результаты были детально проанализированы в обзорах^{25, 26}. Так, выражение (1), которое связывает константу равновесия образования интерполимерного комплекса олигомера с полимерной матрицей (K_n) с константой равновесия связывания одного звена олигомера с матрицей (K_1), имеет вид:

$$K_n = K_1^n = \exp\left(-\frac{n\Delta G_1^\circ}{RT}\right), \quad (1)$$

где n — число повторяющихся звеньев в олигомерной цепи, ΔG_1° — изменение свободной энергии при взаимодействии одного звена олигомера с матрицей. Уравнение (1), как и теоретические соотношения, описывающие избирательность интерполимерных взаимодействий в отношении длины и строения полимерных цепей и являющиеся прямым следствием уравнения (1), получены в результате статистико-термодинамического анализа общей модели полимер-полимерного взаимодействия и справедливы для любого типа интерполимерных комплексов, что особо отмечается в обзоре²⁶.

Применимость подобного теоретического рассмотрения к описанию интерполимерных взаимодействий с участием полиэлектролитов подтверждается экспериментальными данными. Избирательность интерполиэлектролитного связывания была впервые доказана осуществлением фракционирования сополимерного полиэлектролита по составу цепей, которое достигали комплексообразованием с противоположно заряженным партнером.²⁴

Важная роль длины цепи полиэлектролита в кооперативном электростатическом взаимодействии обсуждена в обзоре²⁷ и подтверждена экспериментально. Константа диссоциации ПЭК, состоящего из высокомолекулярного полиметакрилатного (ПМА) аниона (полианион) и олигомерного кватернизованного полиэтиленimina (поликатион), резко падала с увеличением длины цепи олигомера, приближаясь к нулевому значению для сравнительно короткого олигокатиона. Значение «критической» длины цепи, необходимой для образования стабильного ПЭК в водном растворе, варьирует в пределах $n = 4-6$ и зависит от природы полиионов.^{3,27} Иными словами, если количество заряженных звеньев, следующих друг за другом по цепи, превышает 4–6, то ПЭК, образующиеся в отсутствие низкомолекулярных электролитов, практически не диссоциируют на индивидуальные компоненты.

На практике это означает, что для приготовления ПЭК смешиванием разбавленных водных растворов полимерных компонентов можно использовать нефракционированные образцы высокозаряженных полиэлектролитов, в которых доля полиэлектролитов с относительно короткими цепями высока. Очевидно, что при избытке нефракционированного полимера возможно фракционирование по молекулярной массе, обусловленное предпочтительным связыванием в комплекс более длинных цепей.

Аналогично сополимер, состоящий из заряженных и незаряженных звеньев, может образовывать с высокозаряженным партнером стабильный ПЭК, если хотя бы один из сегментов сополимера содержит необходимое число заряженных звеньев, следующих друг за другом. Понятно, что в сополимере со статистическим распределением звеньев для формирования такого сегмента требуется достаточно большое количество заряженных групп. Но если учесть, что с ростом степени полимеризации сополимера при фиксированной плотности заряда цепи вероятность образования сегмента искомой длины увеличивается, то можно полагать, что обычно используемые длинноцепочечные сополимеры вполне пригодны для образования стабильных ПЭК, даже если относительно содержание заряженных звеньев в сополимере невелико. Кроме того, высокая гибкость виниловых полиэлектролитов, наиболее часто использующихся при получении ПЭК, обеспечивает подстраивание участков реагирующих цепей друг к другу, способствуя кооперативному электростатическому связыванию. В результате устойчивость ПЭК несущественно меняется с изменением плотно-

сти заряда высокомолекулярного сополимера. Подтверждением этому служат результаты исследования устойчивости ПЭК, образующихся при смешивании водных растворов ПМА (полианионный компонент) и статистических сополимеров *N*-этил-4-винилпиридиния с 4-винилпиридином (ПЭВП-β) с различным содержанием заряженных пиридиновых звеньев β (поликатионный компонент).^{28,29} При уменьшении β от 92 до 25% стабильность комплексов с участием сополимеров с $P = 600$ (см.²⁸) и 900 (см.²⁹) практически не уменьшалась. Та же закономерность наблюдалась для комплексов ДНК с ПЭВП-β-катионами³⁰ или ионенными поликатионами с различным расстоянием между зарядами по цепи.³¹ В обеих системах уменьшение плотности заряда на катионном партнере ДНК мало влияло на устойчивость полиплексов в солевых средах.

Возможность варьирования плотности заряда полииона в достаточно широких пределах без заметной дестабилизации ПЭК значительно расширяет круг полиэлектролитов, пригодных для комплексообразования, и упрощает их приготовление. Так, при подготовке высокомолекулярных полиэлектролитных сорбентов для разделения смесей (био)полимеров отпадает необходимость тотальной химической модификации незаряженных звеньев исходного полимера (например, полисахарида), которую обычно проводят для получения высокозаряженных образцов. Той же цели можно достичь, создавая на полимерной цепи относительно небольшое число зарядов и не затрагивая при этом остальные функционально значимые группы сорбента или вводя в полимерную цепь фрагменты, состоящие из относительно небольшого количества заряженных звеньев, необходимых для образования стабильного ПЭК (например, привитой сополимеризацией или пришивкой фрагментов к концевым группам).

Наконец, небольшая протяженность участка электростатического связывания позволяет белковой глобуле, содержащей на поверхности небольшое количество расположенных недалеко друг от друга ионогенных групп, образовывать стабильные БПК с противоположно заряженным полиионом. Электростатическое кооперативное взаимодействие белковой глобулы с полиионом может осуществляться в широком интервале pH, включая область вблизи изоэлектрической точки белка. Более того, упомянутый выше эффект заряжения слабого полиэлектролита (в нашем случае белка) на высокозаряженном полимере делает возможным электростатическое взаимодействие компонентов БПК при таких значениях pH, при которых белок и полиэлектролит заряжены одноименно, если, разумеется, эти значения pH не очень сильно отличаются от изоточки белка.^{9,32–35}

Добавление низкомолекулярного электролита, экранирующего электростатическое взаимодействие противоположно заряженных компонентов ПЭК и разрушающего ионные пары, приводит к увеличению «критической» длины цепи, необходимой для формирования стабильных ПЭК. В смесях водно-солевых растворов стабильность комплексов, образующихся при взаимодействии ПМА-аниона с поли(*N*-этил-4-винилпиридиниевыми) катионами, резко увеличивается с ростом длины цепи поликатиона вплоть до $P \approx 100$, после чего длина цепи поликатиона уже не влияет на стабильность ПЭК.³⁶ Аналогичным образом ведут себя и другие пары полиэлектролитов.

Таким образом, чтобы обеспечить стабильность ПЭК в водно-солевых средах, необходимо использовать относительно высокомолекулярные полиэлектролиты. Так, для образования стабильного при физиологических значениях

Таблица 1. Критическая концентрация соли, при которой происходит полная диссоциация полиэлектролитного комплекса.

Комплекс	Критическая концентрация соли, моль · л ⁻¹									Ссылки
	LiCl	NaCl	KCl	KBr	KI	KF	Me ₄ NBr	Me ₄ NCl	Me ₄ NF	
ПМА/ПЭВП ^a	0.41	0.47	0.56	—	—	—	0.72	1.6	> 6	37
ДНК/ПЭВП ^b	0.22	0.23	0.25	0.14	0.07	1.0	0.18	0.43	> 2	30

^a $P_{\text{ПМА}} = 2150$, $P_{\text{ПЭВП}} = 390$, 20°C. ^b $P_{\text{ПЭВП}} = 100$, 20°C.

ионной силы раствора комплекса между ПЭВП-катионами и ПМА-анионом³⁶ или ДНК³⁰ необходимо, чтобы «критическая» длина цепи поликатиона была не меньше 20 звеньев. В тех случаях, когда для решения практических задач необходимо снизить устойчивость ПЭК (например, при приготовлении растворимых комплексов из сульфосодержащих полианионов, обладающих аномально высоким сродством к полиаминам, см. ниже), одним из путей достижения цели может быть применение заряженных олигомеров небольшой длины.

Устойчивость ПЭК зависит также от природы вводимой соли. По своей способности вызывать разрушение ионных пар ПМА/ПЭВП анионы и катионы 1,1-электролитов располагаются в следующих рядах: $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ и $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ \gg \text{Me}_4\text{N}^+$ (см.³⁷). В тех же последовательностях изменяется специфическое сродство галогенид-анионов к полиаминам и катионов щелочных металлов к поликарбоновым кислотам. Поскольку объемный тетраметиламмониевый катион Me_4N^+ слабо связывается с полианионами из-за стерических затруднений, а анион F^- имеет наименее выраженное сродство к полиаминам, их присутствие в растворе практически не влияет на устойчивость ПЭК. Таким образом, использование тетраметиламмониевых солей позволяет наиболее точно выявить эффективность воздействия различных анионов на стабильность комплексов, а использование фторидов металлов — воздействие различных катионов. Кроме того, с помощью этих солей можно существенно менять фазовое поведение водно-солевых растворов ПЭК.³⁷

Примечательно, что замена одного аниона на другой более существенно влияет на стабильность ПЭК, чем замена катиона (табл. 1). Таким образом, вводя в раствор тот или иной галогенид-анион, можно эффективно воздействовать на область существования ПЭК.

2. Водорастворимые нестехиометрические полиэлектролитные комплексы и их самосборка в растворах

Несмотря на высокую устойчивость к диссоциации на индивидуальные компоненты, ПЭК способны участвовать в интерполиэлектролитных реакциях, сопровождающихся переносом полиионов из одних комплексов на другие. Впервые такой вывод был сделан в процессе изучения свойств нерастворимого стехиометрического ПЭК (СПЭК), образующегося при смешивании эквимоллярных (по зарядам) количеств ионенового поликатиона и полистиролсульфонатного (ПСС) аниона.³⁸ При добавлении ПСС к суспензии нерастворимого СПЭК наблюдалось постепенное уменьшение мутности, а при введении трехкратного избытка полианиона суспензия полностью растворялась благодаря переносу поликатиона из СПЭК на вводимые цепи ПСС и образованию растворимого нестехиометрического ПЭК (НПЭК).

Открытие растворимых полиэлектролитных комплексов означало прорыв в исследовании интерполиэлектролитных реакций, поскольку в этом случае перенос полиионов осуществлялся в гомогенных условиях, а следовательно, для изучения этих реакций можно было использовать весь арсенал методов, развитых для исследования растворов полимеров. Кроме того, растворимость НПЭК в водных средах существенно расширяет возможности их практического применения.

Однако растворимость НПЭК в водных средах может приводить и к нежелательным последствиям. Так, образование растворимых НПЭК снижает эффективность разделения биологических смесей и препятствует послойной адсорбции разноименно заряженных полиионов, которая в последнее время широко применяется для создания полиэлектролитных мультислойных ультратонких пленок и нанокapsул. Поэтому условия образования растворимых НПЭК, их структура и свойства заслуживают подробного рассмотрения.

Растворимые НПЭК можно приготовить из разнообразных пар полиэлектролитов, структура которых может существенно различаться. Условия приготовления НПЭК обсуждаются в обзорах^{3,39}. Простой и универсальный способ получения НПЭК заключается в прямом смешивании водных растворов противоположно заряженных полимерных компонентов, взятых в эквимоллярном (по зарядам) соотношении, в области pH, где они существуют в заряженном состоянии. Смесь готовят в присутствии относительно небольших количеств низкомолекулярного электролита. Очевидно, что при смешивании растворов полиионов неизбежно возникают локальные пересыщения, приводящие к образованию комплексов различного состава, в том числе нерастворимого СПЭК. Тем не менее конечный продукт — растворимый НПЭК — композиционно однороден. Данные по светорассеянию растворов⁴⁰ подтвердили, что молекулярная масса и размеры НПЭК не зависят от порядка смешивания растворов компонентов и сравнимы по величине с молекулярными характеристиками исходных полимеров. Иными словами, НПЭК следует рассматривать как новые макромолекулярные образования, состоящие из ограниченного числа электростатически связанных цепей. В частности, НПЭК могут состоять из одной относительно длинной цепи полианиона и нескольких коротких цепей поликатионов, количество которых задается соотношением зарядов в смеси.⁴⁰ Эти данные являются прямым доказательством самосборки частиц НПЭК в водно-солевых растворах, которая осуществляется посредством переноса полиионов из одного комплекса на другой до достижения равновесного состояния, соответствующего равномерному распределению коротких поликатионов по всем длинным цепям полианионов.

Самопроизвольное образование растворимого отрицательно заряженного НПЭК при смешивании водных раство-

ров ПСС-аниона и ионенового поликатиона³⁸ указывает на то, что перенос полиионов в этой системе происходит достаточно быстро и не требует добавления низкомолекулярного электролита, который способствует обмену за счет ослабления связывания компонентов в комплексе. По всей вероятности, в этой системе интерполиэлектrolитное взаимодействие изначально ослаблено нарушенной структурной комплементарностью реагирующих цепей, вызванной большим расстоянием между зарядами в макромолекулах ионенового поликатиона.

О негативной роли хорошего соответствия зарядов на взаимодействующих цепях, тормозящего самосборку НПЭК, прямо свидетельствуют результаты исследования смесей высокомолекулярного ПМА-аниона с ПЭВП- β -катионами различной длины и плотности заряда.⁴¹ Если смешивание водных растворов электростатически комплементарных высокозаряженных ПМА и ПЭВП ($\beta = 92\%$, $P = 100$) приводило к образованию нерастворимого комплекса, то использование ПЭВП- β той же длины, но содержащего в два раза меньше зарядов, ускорило обмен до такой степени, что равновесное состояние системы, соответствующее образованию растворимых НПЭК, достигалось за минуты. Характерно, что шестикратное удлинение цепи поликатиона не влияло на поведение системы. В этом случае использование высокозаряженного ПЭВП (со степенью алкилирования 91% и $P = 600$) также накладывало кинетический запрет на обмен, тогда как алкилированный только наполовину ПЭВП- β -катион охотно в нем участвовал, о чем свидетельствовало быстрое возникновение растворимого НПЭК. Эти данные ясно показывают, что решающее воздействие на кинетику обмена оказывает плотность заряда цепей, а не число образующихся ионных пар.

Ускорить обмен полиионами можно простым добавлением небольших количеств низкомолекулярного электролита, что также приведет к локальным нарушениям системы ионных пар, образованной комплементарными цепями. Так, введение хлорида натрия в кинетически «замороженную» смесь водных растворов высокозаряженных ПМА и ПЭВП оказывает столь сильное воздействие, что уже в 0.05 М растворе соли образование растворимого НПЭК завершается за время смешивания исходных полиэлектролитов. Заметим, что при такой ионной силе раствора НПЭК остается весьма стабильным, для его полной диссоциации требуется на порядок более высокая концентрация соли.⁴¹

Следуя принятой в работе³ терминологии, растворимый НПЭК состоит из лиофилизующего полиэлектролита-хозяина (ЛПЭ) и противоположно заряженного блокирующего полиэлектролита-гостя (БПЭ). Молярное соотношение (φ) заряженных групп БПЭ и ЛПЭ не должно превышать определенного критического значения, $\varphi = [\text{БПЭ}]:[\text{ЛПЭ}] < \varphi_{\text{кр}}$, близкого к 0.5. Участки цепей ЛПЭ и БПЭ, стабилизированные ионными парами, образуют гидрофобные последовательности, склонные агрегировать в водных средах с образованием гидрофобного ядра. Гидрофильная оболочка гидрофобного ядра составлена из заряженных сегментов ЛПЭ, обеспечивающих растворимость НПЭК. Эти элементы структуры экспонированы в раствор в виде петель или хвостов (рис. 1). Отрицательно заряженные НПЭК с относительно длинными лиофилизующими полианионами (тип А), удовлетворяющие соотношению $\psi = R_{\text{ЛПЭ}}:R_{\text{БПЭ}} > 1$, изучены наиболее подробно.³ Комплексы типа В с короткими лиофилизующими полианионами ($\psi < 1$) были получены 20 лет назад,^{42,43} и до недавнего времени сведения о них оставались довольно скудными.

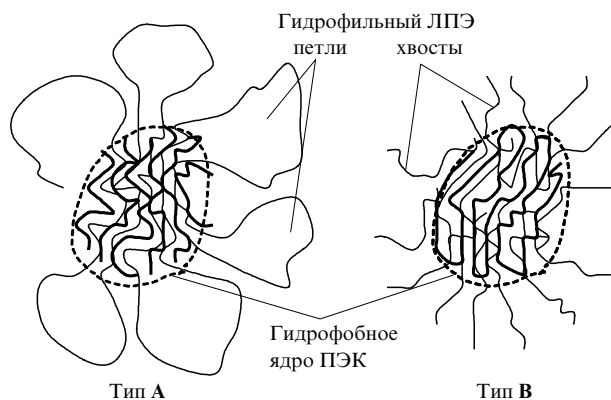


Рис. 1. Схематическое представление структуры растворимых НПЭК, образованных лиофилизующими (ЛПЭ) и блокирующими (БПЭ) полиэлектролитами с различным соотношением степеней полимеризации $\psi = R_{\text{ЛПЭ}}:R_{\text{БПЭ}}$. А — $\psi > 1$, В — $\psi < 1$.

Образование НПЭК типа В сопровождается термодинамически невыгодным снижением энтропии системы из-за уменьшения общего числа полимерных частиц. Чем короче цепи ЛПЭ, тем большее их количество требуется включить в состав комплекса, чтобы молярное соотношение звеньев не превышало $\varphi_{\text{кр}}$, обеспечивающего растворимость НПЭК, а следовательно, тем меньше количество полимерных частиц будет находиться в растворе. Следствием действия этого неблагоприятного фактора является невысокая устойчивость НПЭК типа В в солевых средах.^{44,45} Критическая концентрация соли, соответствующая началу фазового разделения в растворах НПЭК типа В ($\psi < 1$), резко уменьшается с уменьшением ψ , тогда как в растворах НПЭК типа А ($\psi > 1$) она практически не зависит от параметра ψ (рис. 2).

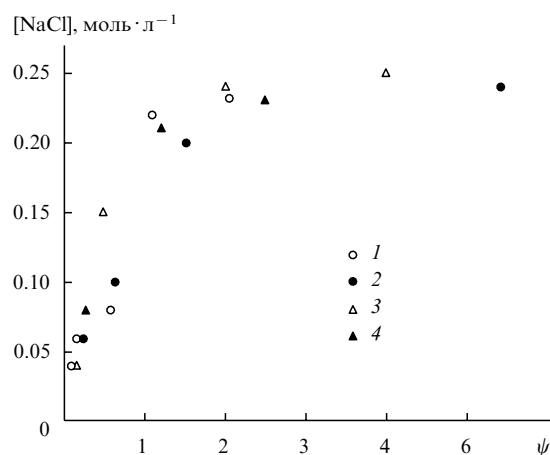


Рис. 2. Зависимость критической концентрации соли, соответствующей началу фазового разделения, от соотношения степеней полимеризации компонентов ($\psi = R_{\text{ЛПЭ}}:R_{\text{БПЭ}}$) в растворах отрицательно заряженных НПЭК, образованных ПМА-анионом (точки 1, 2)⁴⁵ или полианионом гидролизованного сополимера дивинилового эфира и малеинового ангидрида (ДИВЭМА) (точки 3, 4)⁴⁴ и ПЭВП-катионами различной степени полимеризации. $R_{\text{БПЭ}}$: 1 — 900, 3 — 560, 2, 4 — 340.

Таким образом, для НПЭК типа **В** интервал ионной силы, в котором концентрация вводимой соли уже достаточна для интенсивного обмена компонентами, но еще не столь велика, чтобы вызывать фазовое разделение, резко сужается по мере уменьшения ψ . Это затрудняет приготовление НПЭК типа **В** прямым смешиванием водно-солевых растворов полимеров.^{46, 47} Существует даже мнение о невозможности образования растворимых НПЭК из пар полиэлектролитов, для которых соотношение $R_{\text{ЛПЭ}} : R_{\text{БПЭ}} < 1$.

Приготовлению положительно заряженных растворимых НПЭК может препятствовать высокое сродство обычно используемых галогенид-анионов к положительно заряженным алкилированным полиаминам, например к ПЭВП, которое резко ослабляет их лиофилизующую способность в ряду $\text{F}^- \ll \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$. Иодид-анионы столь сильно связываются с пиридиновыми группами, что высокомолекулярный ПЭВП-катион высаливается и становится нерастворимым уже в 0.1 М растворе KI. Для приготовления растворимого НПЭК с лиофилизующим ПЭВП-катионом, содержащим в качестве противоионов анионы Br^- , последние заменяли на практически не связывающиеся противоионы F^- (см.⁴⁸).

Недавно были получены и изучены положительно заряженные растворимые НПЭК обоих типов, образованные лиофилизующим ПЭВП-бромидом и блокирующим ПМА-анионом (рис. 3).⁴⁵ Как и в случае отрицательно заряженных НПЭК (см. рис. 2), растворимые комплексы **A** ($\psi > 1$) сохраняли устойчивость в достаточно широком интервале изменения ионной силы, а область существования растворимых комплексов **B** ($\psi < 1$) с уменьшением ψ сужалась, что связано с уменьшением лиофилизующей способности ПЭВП-катиона. Олигомерные катионы с короткими цепями вовсе не образовывали растворимых НПЭК. При прочих равных условиях положительно заряженные НПЭК сохраняли растворимость в более узком интервале ионной силы, чем их отрицательно заряженные аналоги. Это согла-

суется с сильным связыванием анионов Br^- пиридиновыми группами лиофилизующего ПЭВП.

Приведенные данные могут представлять интерес для разработки условий количественного перевода комплекса из раствора в осадок. В принципе, для того чтобы избежать нежелательного образования растворимого НПЭК, соотношение положительно и отрицательно заряженных групп в водных или водно-солевых растворах смешиваемых полиэлектролитов должно быть строго эквивалентным. Однако на практике это требование реализовать трудно, а подчас и невозможно.

Так, уже упомянутая техника послойной адсорбции разноименно заряженных полиэлектролитов, которая широко применяется для создания мультислойных пленок и капсул,^{49–52} состоит в попеременной обработке формируемого материала растворами полианиона и поликатиона, причем на каждом этапе верхний слой адсорбированного полиэлектролита подвергается воздействию большого избытка противоположно заряженного партнера. Для того чтобы предотвратить солубилизацию комплекса и разрушение материала,^{53–55} можно использовать поликатионы с относительно короткими цепями, содержащие в качестве противоионов анионы Br^- , поскольку их передозировка не приведет к образованию растворимого положительно заряженного НПЭК в водно-солевых средах. По тем же соображениям обработка пленки избыточными количествами короткоцепочечных полианионов поможет избежать образования отрицательно заряженного растворимого НПЭК, приводящего к эрозии полиэлектролитных мультислоев.

Установлены взаимосвязи фазового поведения растворимого НПЭК и эффективности формирования мультислойных пленок и капсул из его полимерных компонентов.^{56–58} Это позволяет осуществлять жесткий контроль над переходом из режима устойчивого наращивания слоев в режим их эрозии при изменении условий (рН, ионной силы раствора, соотношения степеней полимеризации полиионов и т.д.). Как следует из данных, собранных и проанализированных в обзоре⁵⁹, накопленная информация о стабильности НПЭК, фазовом состоянии их водно-солевых растворов и кинетике интерполиэлектролитного обмена может послужить основой для составления «карты» областей устойчивого роста слоев или их разрушения, что необходимо для успешного формирования полиэлектролитного мультислойного материала с заданными свойствами.

Отметим, что обратимый переход между режимами стабильного роста слоев и их деградации может быть вызван крайне незначительными изменениями внешних условий. Ярким примером служит рН-зависимая стабилизация продуктов взаимодействия солей поликарбоновых кислот с полиаминами.^{19, 21} Стабилизация продуктов осуществляется в мягких условиях в узких интервалах рН и контролируется кислотностью полимерных карбоновых кислот и/или плотностью заряда на цепях полиаминов.[†] Перевод таких систем в нейтральные или слабокислые среды сопровождается скачкообразным ростом ионной силы раствора, необходимой для полного разрушения комплексов из-за образования

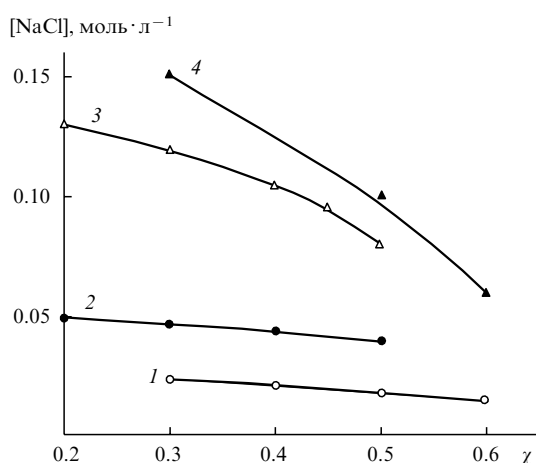


Рис. 3. Зависимость критической концентрации соли, соответствующей началу фазового разделения, от соотношения заряженных групп ($\chi = [-]:[+]$) в растворах положительно заряженных НПЭК, образованных ПЭВП-катионом ($P = 1640$) и ПМА-анионом (кривые 2, 3) или ДНК (кривые 1, 4) при различных соотношениях $R_{\text{ЛПЭ}} : R_{\text{БПЭ}}$. $\psi = 0.1$ (1), 0.4 (2), 2 (4) и 7 (3).

Кривые построены на основании данных, полученных в работе⁴⁵.

[†] Роль полиаминов в таких парах могут играть основные белки, в частности лизоцим или рибонуклеаза,²⁰ что делает возможным приготовление рН-чувствительных белок–полиэлектролитных мультислойных пленок и капсул, пригодных для использования в физиологических условиях.

сетки водородных связей между протонированными карбоксильными группами полимерной кислоты в комплексе.

3. Молекулярное «узнавание» в растворах нестехиометрических полиэлектролитных комплексов

Использование растворимых НПЭК позволило детально изучить интерполиэлектrolитные реакции, в которых два одноименно заряженных лиофилизующих полииона конкурируют за связывание с противоположно заряженным блокирующим полиэлектролитом:



Если химическая природа вводимых цепей ЛПЭ* та же, что и цепей ЛПЭ в исходном комплексе, то перенос цепей БПЭ называют реакцией обмена. В противном случае речь идет об интерполиэлектrolитной реакции замещения.³

Из результатов исследования кинетики и механизма интерполиэлектrolитных реакций, представленных в наиболее полном виде в работе⁶⁰, следует, что в бессолевых водных растворах обмен компонентами, как правило, кинетически запрещен. Для его запуска оказывается достаточным добавление весьма незначительных количеств низкомолекулярного электролита, в присутствии которого в системе быстро достигается равновесное состояние, соответствующее непрерывному переносу компонентов из одних растворимых НПЭК на другие. Обмен есть ни что иное, как форма теплового движения полиэлектролитных комплексов, представляющих собой продукты обратимых ионных реакций между полиэлектролитами.

Положение равновесия реакции (2) может изменяться в широких пределах: от равновесного распределения цепей БПЭ между ЛПЭ и ЛПЭ* одинаковой длины ($x = n/2$) до высокоселективного связывания БПЭ с цепями ЛПЭ* ($x \approx n$). Последний случай представляет особую ценность для конструирования систем направленного транспорта лекарственных веществ и создания саморегулируемых полиэлектролитных систем, а потому заслуживает подробного рассмотрения.

Явление молекулярного «узнавания» в растворах НПЭК и факторы, приводящие к селективному связыванию полиионов, проанализированы в обзорах^{9,61}. Поликатион «узнает» тот полианион, который образует с ним наиболее устойчивый НПЭК, даже если разница в изменении свободной энергии в пересчете на пару противоположно заряженных звеньев весьма мала.

Так, в смесях растворов длинных и коротких ПМА-анионов ПЭВП-катион предпочтительно связывается с длинноцепочечными ПМА. Если степени полимеризации полианионов различаются существенно, результатом конкурентного взаимодействия является количественное вытеснение из НПЭК короткоцепочечных ПМА ($P = 50$) длинноцепочечными ($P = 4100$).⁴² Аналогичным образом протекает реакция замещения с участием полифосфатных (ПФ) анионов. В 0.3 М растворах хлорида натрия относительно высокомолекулярные ПФ-анионы ($P = 230$) практически полностью замещают цепи ПМА-аниона в комплексе ПМА/ПЭВП, тогда как короткие ПФ-анионы ($P = 20$) в тех же условиях не могут конкурировать с ПМА-анионом за связывание с ПЭВП-катионом.⁶²

Ковалентное присоединение к цепи ПМА гидрофобных пиренильных остатков, которые дополнительно стабилизируют комплекс ПМА/ПЭВП, может приводить к селективному связыванию такого полианиона с поликатионом.

Наличие в макромолекуле ПМА даже одной пиренильной группы на 400 звеньев оказывается достаточно для безошибочного выбора ПЭВП-катионом именно этого полианиона среди немеченых ПМА-анионов,⁶³ несмотря на то что размеры групп, стабилизирующих комплекс, в сотни раз меньше размеров конкурирующих полианионов. Столь высокая селективность взаимодействия открывает большие перспективы для создания полиэлектролитных систем направленного транспорта лекарственных средств и генетического материала в клетку, повышения эффективности разделения смесей биополимеров и разработки чувствительных аналитических систем на основе конъюгатов полиионов с антителами, антигенами или антигенными детерминантами.

Функцию стабилизирующих групп («якорей») могут с успехом выполнять сульфатные или сульфонатные группы полианионов, которые для краткости будем называть полисульфоанионами. Наличие таких групп делает полианионы особенно привлекательными для поликатионов. В смесях отрицательно заряженных полисахаридов ПЭВП-катион безошибочно распознает те из них, которые несут сульфатные группы, и связывается с ними. Присутствие в смеси полианионов, которые не содержат сульфатных групп, но имеют гораздо более высокую плотность заряда, не влияет на селективность связывания,⁶⁴ даже если количество таких полианионов существенно превышает количество полисульфоанионов. Яркое выражение предпочтительности полиэлектролитного взаимодействия полиаминов с полисульфоанионами позволяет использовать полиамины в качестве чувствительного зонда для обнаружения участков цепи полисахарида, несущих сульфогруппы, и их блокирования. На том же принципе может быть основано изучение взаимосвязи структура—функция в случае гепариноподобных полианионов.⁶⁵

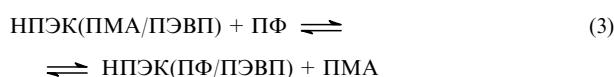
Полианионы с высокой плотностью сульфонатных или сульфатных групп в цепи (например, полистиролсульфонатный, поливинилсульфонатный и полианетолсульфонатный анионы, гепарин) образуют аномально стабильные комплексы с полиаминами. Чрезвычайно высокое специфическое сродство полисульфоанионов к поликатионам накладывает жесткие кинетические ограничения на обмен полиионами. Это существенно затрудняет приготовление растворимых НПЭК, поскольку смешивание столь сильно взаимодействующих компонентов неминуемо ведет к образованию нерастворимых продуктов переменного состава. По этой причине полимеры с высокой плотностью сульфатных или сульфонатных групп наиболее часто используют для создания полиэлектролитных мультислойных пленок и капсул.

Некоторые исследователи считают, что полисульфоанионы непригодны для образования растворимых НПЭК (см., например,^{66,67}), тем не менее подбором концентрации вводимой соли (которой для полисульфоанионов обычно требуется на порядок больше, чем для поликарбоксилатных или полифосфатных анионов) можно свести к минимуму кинетические затруднения обмена и приготовить растворимый НПЭК. Для пары, составленной из высокомолекулярных ПЭВП и ПСС, этого удастся добиться постепенным смешиванием водно-солевых растворов компонентов, содержащих 0.14 моль·л⁻¹ хлорида калия.⁶⁸ Недавно установлено,⁴⁵ что область существования растворимых НПЭК на основе полисульфоанионов существенно шире областей существования других НПЭК, поскольку фазовое разделение в их растворах наступает при гораздо более высоких концентрациях вводимой соли. Протяженность этой области,

как и в других полиэлектролитных системах, контролируется соотношением степеней полимеризации компонентов ψ .

Полисульфоанионы эффективно конкурируют с поликарбонатными или полифосфатными анионами за связывание с полиамином.^{68,69} На этой способности основано применение растворимых НПЭК на основе гепарина в качестве «депо» полиаминов, играющих роль антигепариновых агентов.³ Аномально высокое сродство полисульфоанионов к поликатионам представляет несомненный практический интерес и может быть использовано, например, на последних стадиях процессов разделения смесей (био)полимеров, когда требуется количественно выделять анионные компоненты из нерастворимых ПЭК или БПК. Необратимость реакции замещения с участием полисульфоанионов обеспечивает полную регенерацию олигонуклеотидов, плазмид, белков (ферментов) и белковых конъюгатов.

Если различия в сродстве конкурирующих полианионов к поликатиону невелики, направление интерполиэлектролитного замещения может в большей степени определяться окружающей средой. Так, конкурентное связывание ПМА- и ПФ-анионов с ПЭВП-катионом



эффективно контролируется природой вводимой соли.⁶² По своей способности сдвигать равновесие (3) вправо катионы щелочных металлов располагаются в ряд $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$, который находится в хорошем соответствии с различиями в сродстве тех же катионов к ПМА- и ПФ-анионам. Заслуживает особого внимания тот факт, что хотя эти различия весьма незначительны, замена одной соли на другую приводит к кардинальным изменениям поведения тройной системы. Так, в 0.3 М LiCl равновесие реакции (3) полностью сдвинуто вправо, в 0.3 М KCl оно полностью сдвинуто влево, а в 0.3 М NaCl реализуется промежуточная ситуация.

Равновесие реакции (3) чувствительно к изменению температуры в интервале 5–60°C.⁷⁰ При низких температурах ПЭВП-катион предпочтительнее связывается с ПФ-анионом, а при нагревании — с ПМА-анионом. Такое изменение направления реакции (3) согласуется с изменением стабильности комплексов НПЭК(ПМА/ПЭВП) и НПЭК(ПФ/ПЭВП) в этом температурном интервале. Однако если стабильности исходного и конечного комплексов различаются достаточно сильно, то направление замещения перестает зависеть от температуры. Так, поли(*N*-метил-4-винилпиридиниевый) катион, в отличие от ПЭВП, образует существенно более стабильный НПЭК с ПФ-анионом, чем с ПМА-анионом, поэтому равновесие конкурентного связывания в такой смеси полностью сдвинуто в сторону образования полифосфатного комплекса во всем интервале температур (от 5 до 60°C).⁷⁰ Естественно, что в тройных системах полианион–поликатион–полисульфоанион, в которых полисульфоанионы имеют неоспоримое преимущество перед другими полианионами в связывании с поликатионами, температурный фактор также не имеет значения.

Самосборка комплексов и их превращения в результате изменения внешних условий осуществляются методом проб и ошибок в результате реакций обмена или замещения, которые могут протекать селективно, обратимо и с высокой скоростью. Такой взгляд на ПЭК и их свойства является фундаментальным. Принципы конкурентного связывания и переноса цепей, открытые при исследовании растворов син-

тетических полиионов, могут быть распространены на реакции с участием природных полимеров. Растворимые НПЭК, представляющие собой продукты кооперативного взаимодействия полиионов, можно уподобить комплексам заряженных биополимеров. И те, и другие комплексы самопроизвольно образуются в водных средах, подчиняясь общим закономерностям полиэлектролитных взаимодействий, которые контролируются одними и теми же специфическими факторами. Это следует из результатов исследования биополиэлектролитных комплексов, образованных синтетическими полиэлектролитами с противоположно заряженными биополимерами — нуклеиновыми кислотами, глобулярными белками (ферментами, антителами) и конъюгатами белков с полиионами.

III. Интерполиэлектролитные реакции в растворах полиплексов

Высокая плотность заряда нативной ДНК обусловлена отрицательно заряженными фосфатными группами двойной спирали. Полиэлектролитные комплексы ДНК с полиаминами привлекают к себе все возрастающее внимание как потенциальные невирусные средства доставки генетического материала в ядра клеток. Их использование повышает эффективность трансфекции клеток плазмидами и защищает доставляемую ДНК от расщепления клеточными нуклеазами (см. обзоры^{5,7,8,71–73}). Перспективность транспорта ДНК к целевым клеткам в упакованном с помощью поликатиона виде обусловило интенсивное изучение полиплексов и стимулировало поиск факторов, позволяющих тонко регулировать их стабильность.

1. Стабильность ДНК-содержащих полиэлектролитных комплексов

За образованием и диссоциацией комплексов ДНК удобно следить с помощью метода тушения флуоресценции,[‡] используя интеркалирующие красители, в частности бромид этидия. В основе метода лежит способность катиона этидия самопроизвольно встраиваться (интеркалировать) между основаниями двойной спирали ДНК, что приводит к значительному росту интенсивности флуоресценции красителя. Конкурентное вытеснение интеркалятора вводимым поликатионом, образующим с ДНК стабильный комплекс, сопровождается тушением флуоресценции. Последующее разрушение ПЭК с помощью низкомолекулярного электролита приводит к усилению флуоресценции благодаря встраиванию этидия в освобожденные участки ДНК. С момента публикации работы⁷⁵, в которой впервые была экспериментально обоснована применимость такого подхода к исследованию полиплексов в растворах и конкурентных реакций с их участием, появилось множество новых данных, полученных с помощью того же приема. Наиболее интересные из них будут проанализированы в этом разделе.

Эффективность разрушающего действия вводимых катионов и анионов на ПЭК(ДНК/ПЭВП) уменьшается в рядах $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} \gg \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ \gg \text{Me}_4\text{N}^+$ (см.^{74–77}) и $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- \gg \text{F}^-$ (см.⁷⁷) соответственно. В той же последовательности ослабляется сродство противоионов к ДНК и ПЭВП. Такая же взаимосвязь между способностью

[‡] Суть метода тушения флуоресценции, его возможности и перспективы использования детально обсуждены в обзоре⁷⁴.

катионов и анионов разрушать ПЭК и их сродством (как противоионов) к полимерным компонентам была установлена при изучении систем ПФ/ПЭВП (см.⁶³) и ПМА/ПЭВП (см.³⁷). Аналогичный ряд $\text{Ca}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+} \gg \text{Li}^+ > \text{Na}^+ \geq \text{K}^+ > \text{Cs}^+$ был получен для ПЭК, образованных ДНК с различными кватернизованными полиаминами.⁷⁸

Зависимости устойчивости комплексов ДНК/ПЭВП (см.³⁰) и ПМА/ПЭВП (см.³⁶) от длины цепи ПЭВП-катиона имеют одинаковый характер. Критическая концентрация соли, необходимая для полной диссоциации обоих комплексов, не зависела от длины высокомолекулярных ДНК и ПМА-анионов, но резко возрастала с увеличением длины ПЭВП-катионов вплоть до $R_{\text{ПЭВП}} \approx 100$, после чего увеличивалась сравнительно медленно.

Природа аминогрупп поликатиона оказывает существенное влияние на стабильность комплексов.⁷⁹ Диссоциация полиплексов, образованных поликатионами с кватернизованными аминогруппами в цепи, не зависит от pH и наиболее чувствительна к разрушающему действию добавляемой соли, тогда как поликатионы с первичными аминогруппами образуют с ДНК самые стабильные комплексы, устойчивые в широком интервале изменения pH. Полиплексы на основе поликатионов с третичными аминогруппами по стабильности занимают промежуточное положение, причем их устойчивость заметно зависит от pH среды.

Ту же закономерность наблюдали при изучении липоплексов — комплексов ДНК с катионными мицеллами, образованными поверхностно-активными веществами C_{12} с аминогруппами различной структуры в гидрофильных «головках».⁸⁰ Наименьшей стабильностью отличались липоплексы, построенные из молекул $\text{n-C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+\text{Me}_3\text{Br}^-$, у которых кватернизованный атом азота окружен объемистыми метильными группами. Уменьшение числа Me-групп в «головке» ПАВ приводило к существенной стабилизации комплекса. Критическая концентрация соли, соответствующая полной диссоциации липоплексов, возрастала в ряду $\text{n-C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+\text{Me}_3\text{Br}^- < \text{n-C}_{12}\text{H}_{25}\text{NMe}_2 < \text{n-C}_{12}\text{H}_{25}\text{NHMe} < \text{n-C}_{12}\text{H}_{25}\text{NH}_2$. Как и в полиплексах, наибольшей устойчивостью обладал липоплекс, в котором партнер ДНК содержал первичные аминогруппы.

Приведенные данные указывают на важную роль расстояния между зарядами в ионных парах, при увеличении которого интерполиэлектродитное взаимодействие существенно ослабляется. О том же свидетельствуют результаты исследования полиплексов с поли(*N*-алкил-4-винилпиридиниевыми) катионами, содержащими *N*-алкильные заместители различной длины.¹⁸ Увеличение числа метиленовых групп в заместителе от 1 до 6 сопровождалось последовательным снижением концентрации соли, необходимой для диссоциации комплекса. Это влияние было особенно выраженным у полиаминов с наиболее длинными метиленовыми фрагментами, создающими стерические препятствия тесному контакту заряженных пиридиниевых групп поликатиона и фосфатных групп ДНК.

Следует отметить, что увеличение гидрофобности боковых групп с ростом их длины не препятствовало дестабилизации комплекса, хотя известно, что гидрофобные взаимодействия неполярных фрагментов поликатионов с гидрофобными основаниями ДНК могут упрочнять полиплекс по отношению к действию соли, как это происходит, например, при связывании ДНК с растворимыми поли(пиридилфениленовыми) дендримерами.¹³ По-видимому, в случае линейных поликатионов вклад гидрофобных взаимодействий в стабилизацию комплекса не столь значителен и остается незамет-

ным на фоне ярко выраженного ослабления электростатического взаимодействия компонентов. Тем не менее гидрофобные взаимодействия оказывали свое влияние на трансфекцию, которое выражалось в росте ее эффективности с удлинением цепи *N*-алкильных заместителей полиамина,¹⁸ что объясняется известным эффектом усиления связывания полиплекса с клеточной мембраной при введении в его катионный компонент гидрофобных фрагментов.^{81,82}

Первичные полиамины благодаря их способности образовывать очень стабильные ПЭК широко применяются для приготовления полиэлектродитных мультислойных пленок и капсул. Среди полиэлектродитных систем, используемых для этих целей, пара полиаллиламин/ПСС применяется особенно часто, поскольку аномально высокое сродство первичного полиамина и полисульфоаниона друг к другу накладывает строгий кинетический запрет на интерполиэлектродитный обмен, исключая нежелательное образование растворимого НПЭК в процессе приготовления пленок.

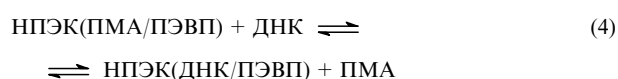
Таким образом, устойчивость ДНК-содержащих комплексов можно эффективно контролировать, варьируя длину, плотность заряда и структуру поликатиона, а также используя различные низкомолекулярные электролиты. Для усиления эффекта можно комбинировать упомянутые факторы.^{30,79}

Благодаря высокой плотности заряженных фосфатных групп и их регулярному расположению на жесткой двойной спирали ДНК последняя получает преимущество перед остальными анионными компонентами клетки в электростатическом связывании с поликатионами. Например, молекулы РНК, которые в основном состоят из однотяжных участков, склонных к образованию внутренних петель и шпилек, имеют сложную и неупорядоченную структуру, что ослабляет их электростатическое взаимодействие с поликатионами. К тому же РНК характеризуются широким молекулярно-массовым распределением со значительной долей олигомерных цепей, что обусловлено многообразием типов РНК в клетке и наличием их деградированных форм. В результате высвобождение РНК из комплексов с полиаминами при добавлении низкомолекулярных электролитов заканчивается при такой концентрации вводимой соли, когда комплексы тех же полиаминов с ДНК еще вполне устойчивы.^{83,84}

Такое различие в стабильности ДНК- и РНК-содержащих комплексов может служить основой для разделения смесей ДНК и РНК. Эффективность процедуры определяется удачным подбором ионной силы раствора, при которой наступает полная диссоциация комплекса полиамина с РНК, а ДНК остается в осадке в связанном с полиамином виде. Для кватернизованных полиаминов такая ситуация реализуется в интервале 0.3 М–0.5 М NaCl. Количественное осаждение ДНК из смеси ДНК–РНК делает возможным разработку простого, дешевого, эффективного и крупномасштабного метода выделения ДНК (плазмид) из клеточных лизатов.^{85,86}

2. Селективность интерполиэлектродитного взаимодействия в растворах полиплексов

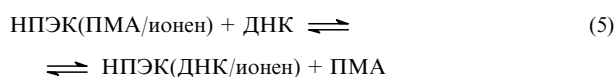
Конкурентные реакции с участием полианионов ПФ и ДНК, заряд которых обусловлен наличием фосфатных групп, имеют много общего. Реакция замещения в растворах ДНК



столь же чувствительна к концентрации и природе вводимого низкомолекулярного электролита, как и реакция (3) с участием ПФ. По своей способности влиять на направление реакции (4) катионы щелочных металлов располагаются в ряд $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$. При фиксированной концентрации вводимой соли ($0.25 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) в растворе NaCl равновесие (4) существенно сдвинуто вправо, в растворе LiCl оно нацело сдвинуто влево, а в растворе KCl реализуется промежуточная ситуация.⁷⁷ Этот ряд отличается от последовательности $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$, полученной для реакции (3), что можно объяснить аномально высоким сродством катиона Li^+ к нативной ДНК. Денатурированная ДНК не обладает этим свойством, и в ее растворах влияние природы вводимого катиона на равновесие (4) близко к полученному для реакции (3), а именно, $\text{Li}^+ \approx \text{Na}^+ > \text{K}^+$.

Соотношение степеней полимеризации компонентов $\psi = P_{\text{ПМА}} : P_{\text{ПЭВП}}$ и в этом случае является фактором, определяющим направление замещения.⁷⁶ Если используется отрицательно заряженный НПЭК(ПМА/ПЭВП) типа А (см. рис. 1, $\psi > 1$), то ДНК проигрывает перед ПМА в конкурентном связывании с ПЭВП, если же используется комплекс типа В ($\psi < 1$), то по мере уменьшения ψ все более предпочтительным становится образование полиплекса, что обусловлено выигрышем в энтропии за счет увеличения общего числа частиц в растворе.

Способность алифатических n,n -ионеновых катионов узнавать и связываться с ДНК или ПМА в эквимольных смесях этих полианионов



определяется длиной ионена и числом (n) метиленовых групп между зарядами в его цепи.⁸⁷ Олигомерные ионены не склонны различать конкурирующие высокомолекулярные полианионы, однако при увеличении длины ионена появляется селективность взаимодействия, которая повышается по мере увеличения n . Ионены с высокой плотностью заряда предпочитают связываться с ПМА-анионом, а с низкой плотностью заряда — с ДНК.

Для 3,3-ионеновых поликатионов с достаточно большой степенью полимеризации ($P \approx 100$) равновесие (5) полностью сдвинуто влево, а для 10,10-ионенбромида — вправо.

Самосборка НПЭК в водных растворах ДНК и селективность конкурентных реакций с их участием могут иметь большое значение при создании «умных» полиэлектролитных носителей, способных высвободить доставляемую ДНК при изменении внешних условий.

3. Пути повышения эффективности трансфекции полиплексами

Для того чтобы надежно связываться с отрицательно заряженной клеточной мембраной, полиплекс должен иметь противоположный знак заряда. Авторы работы⁸⁸ отмечают, что перенос генетического материала в клетку осуществляется лишь очень небольшой фракцией растворимых положительно заряженных продуктов взаимодействия ДНК с поликатионами. В этой связи данные по исследованию положительно заряженных растворимых полиплексов вызывают особый интерес. Недавно⁸⁹ была установлена тесная взаимосвязь между эффективностью трансфекции клеток молекулами ДНК, упакованными в положительно заряженный комплекс с полиамином, и устойчивостью этого

комплекса по отношению к вводимому низкомолекулярному электролиту. Разработка стратегии приготовления растворимых положительно заряженных полиплексов, сохраняющих стабильность при физиологических значениях pH и ионной силы, — одна из наиболее важных задач, стоящих перед исследователями, работающими в области физической химии биополимеров.

Решение этой проблемы затруднено невысокой лиофилизирующей способностью полиаминов и огромной молекулярной массой ДНК. Как уже упоминалось, положительно заряженные растворимые НПЭК обладают сравнительно низкой устойчивостью в водно-солевых средах из-за значительного сродства галогенидных противоионов к аминогруппам лиофилизирующего поликатиона. Кроме того, традиционно используемые полиамины значительно короче плазмид, а потому они образуют с ними растворимые НПЭК типа В (см. рис. 1), которые особенно чувствительны к добавляемой соли. Фазовое разделение в таких системах наступает уже при первых порциях вводимой соли^{45, 83} и практически не зависит от заряд-зарядового соотношения $\chi = [-]:[+]$ в смеси (см. рис. 3, кривые 1, 2).

Положительно заряженные НПЭК типа А ($\psi \geq 1$) более устойчивы, особенно при низких значениях χ (см. рис. 3, кривые 3, 4). Примечательно, что левая часть кривой 4, полученной для НПЭК типа А ($\psi \approx 2$) с относительно короткими молекулами ДНК (300–500 пар оснований), располагается в области ионной силы, близкой по значению к физиологической. Таким образом, для приготовления положительно заряженного растворимого полиплекса из достаточно протяженной нуклеиновой кислоты необходимо использовать длинный полиамин, удовлетворяющий условию $\psi > 1$. Для транспорта олигонуклеотидов в ядра клеток подобрать лиофилизирующий полиамин гораздо проще, поскольку в этом случае требование $\psi > 1$ легко выполнимо для широкого круга обычно используемых высокомолекулярных поликатионов.

Другим путем улучшения трансфекции клеток может быть использование упомянутого эффекта заряжения слабого полиэлектролита на высокозаряженной матрице.³ Трансфекция — сложный многостадийный процесс, начальными стадиями которого являются гидрофобное и электростатическое связывание полиплекса с мембраной и его проникновение внутрь клетки по механизму эндоцитоза. Ключевым моментом, определяющим успех трансфекции в целом, является быстрый выход полиплекса из эндосом и лизосом в цитоплазму. Наличие в цепи полиамина групп, способных к ионизации в слабокислых средах, способствует этому процессу. Он протекает по так называемому механизму «насоса протонов», или «протонной губки».⁹⁰ Попадая в слабокислую среду эндосом и лизосом, ионогенные группы полиамина действуют подобно губке, всасывая протоны. При протонировании они превращаются в ионные группы, в результате чего возникает градиент заряда, который вызывает приток противоионов Cl^- , рост осмотического давления внутри эндосом и лизосом, их набухание и последующий разрыв с выбросом ДНК в цитозоль.

Гипотеза «протонной губки» была построена для катионных полимеров с $pK_a \approx 5.5$, т.е. способных протонироваться в слабокислой среде внутри эндосом и лизосом. Частично алкилированные ПЭВП-β, характеризующиеся низким значением $pK_a = 3.25$, протонируются в сильнокислой области,⁹¹ однако присутствие ДНК в комплексе снижает кислотность на 2–3 единицы и способствует протонированию пиридиновых групп полимера, делая ПЭВП-β-катионы

трансфекционно активными.¹⁸ Эти данные демонстрируют преимущества использования частично алкилированных третичных полиаминов в качестве векторов невирусной природы для доставки генетического материала в ядра клеток.

IV. Комплексы глобулярных белков с полиионами

Кинетические и термодинамические факторы, контролирующие образование белок-полиэлектrolитных комплексов и их перестройки в водных растворах, обобщены и проанализированы в обзорах^{9,92}. Поскольку растворимые комплексы бычьего сывороточного альбумина (БСА) с ПЭВП-катионами изучены достаточно подробно, воспользуемся этой модельной системой для иллюстрации основных особенностей поведения БПК.

Связывание ПЭВП-катионов с отрицательно заряженными глобулами БСА может приводить к образованию как растворимых, так и нерастворимых комплексов. Положительно заряженные водорастворимые БПК типа **C** (рис. 4) образуются при большом (по меньшей мере, трехкратном) избытке заряженных групп ПЭВП по отношению к отрицательно заряженным группам БСА, расположенным на поверхности белковой глобулы и доступным для взаимодействия, при этом участки цепей ПЭВП-катиона, несущие некомпенсированные заряды, сольбилизируют комплекс.^{93,94}

Для образования растворимых БПК типа **D** (см. рис. 4), в которых белок выполняет функцию лиофилизующего компонента, необходим 2.5-кратный избыток отрицательно заряженных групп БСА.⁹⁵ Комплексы **D** содержат одну цепь поликатиона и такое количество глобул белка, которое необходимо для обеспечения растворимости БПК в целом. При промежуточных концентрациях положительно и отрицательно заряженных групп в системе ПЭВП–БСА наблюдается фазовое разделение.

Самопроизвольное образование водорастворимых БПК при смешивании компонентов свидетельствует о переносе глобул белка из одного комплекса на другой. В работе⁹⁶

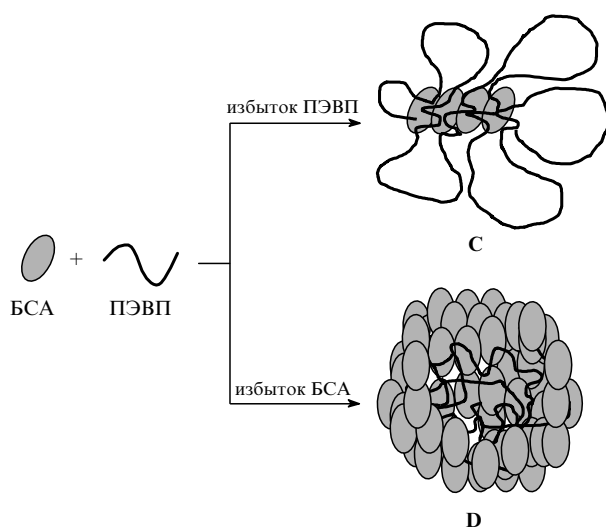
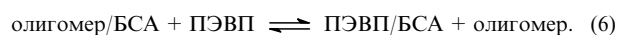


Рис. 4. Схематическое представление структуры водорастворимых БПК. **C** — положительно заряженный комплекс (избыток ПЭВП), **D** — отрицательно заряженный комплекс (избыток БСА).

получены прямые экспериментальные доказательства переноса глобул в растворах БПК типа **C**. Кинетику переноса изучали в растворах отрицательно заряженного БПК типа **D** с помощью флуоресцентно меченного белка соевого ингибитора трипсина.⁹⁷ Переход белка с одного поликатиона на другой осуществлялся достаточно быстро даже в бессолевых средах и ускорялся при добавлении низкомолекулярного электролита. Конкурентное связывание белка двумя различными поликатионами имело обратимый характер и эффективно контролировалось изменением содержания того или другого поликатиона в смеси.

Авторы работы⁹⁸ наблюдали явление молекулярного узнавания ПЭВП-катионом различных белков плазмы. В равновесном состоянии в смеси ими были обнаружены растворимые БПК типа **D**, каждый из которых состоял из одной цепи высокомолекулярного поликатиона и глобул белка только одного сорта.

Конкуренция высокомолекулярного ПЭВП-катиона ($P = 650$) и олигомерного ПЭВП ($P = 30$) за связывание с БСА заканчивается в пользу полимера.



Равновесие реакции (6) в растворах БПК типа **D** сдвинуто вправо, что обусловлено выигрышем в энтропии из-за увеличения общего числа полимерных частиц в растворе.⁹⁹ Тот же энтропийный фактор лежит в основе снижения стабильности БПК типа **C** в солевых средах при уменьшении длины цепи ПЭВП-катиона. Как и в случае ПЭК, дестабилизирующее воздействие становится особенно заметным для коротких цепей ПЭВП-катиона (при $P < 100$).⁹⁹ Степень полимеризации заряженных цепей существенным образом влияет и на их способность сольбилизовать БПК типа **C**, в том числе при повышенных температурах. Важность исследования этого влияния определяется большой практической значимостью проблемы стабилизации растворов глобулярных белков (ферментов).

Возможность установления контроля над растворимостью белков приобретает особое значение в связи с ключевой ролью, которую играет агрегация белков в процессах формирования нерастворимых амилоидных структур, приводящих к нейродегенеративным заболеваниям. Найдено, что образование растворимых БПК препятствует термоагрегации белков, а длина полииона может быть фактором эффективного контроля этого процесса.^{100–102}

В работах^{100–102} в качестве одного из модельных белков была выбрана глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) — олигомерный фермент, состоящий из четырех субъединиц. Этот фермент использовали для изучения механизмов сворачивания белка и поведения белков при тепловом шоке.¹⁰³ Молекулы ГАФД не только склонны к агрегации, но и участвуют в образовании амилоидных структур, которые ответственны за развитие болезней Альцгеймера, Хантингтона и коровьего бешенства.¹⁰⁴ Показано,¹⁰¹ что очень короткие олигомерные ПМА-анионы не в состоянии оказывать заметного влияния на термоагрегацию положительно заряженной ГАФД.

Удлинение цепей ПМА-аниона, как и увеличение их относительного содержания в смеси, благотворно сказывается на образовании растворимых БПК (рис. 5), а использование достаточного количества высокомолекулярных ПМА-анионов полностью подавляет термоагрегацию положительно заряженной ГАФД. Для отрицательно заряженной ГАФД того же результата можно добиться введением избыточных количеств высокомолекулярных ПЭВП-катионов.¹⁰² Инте-

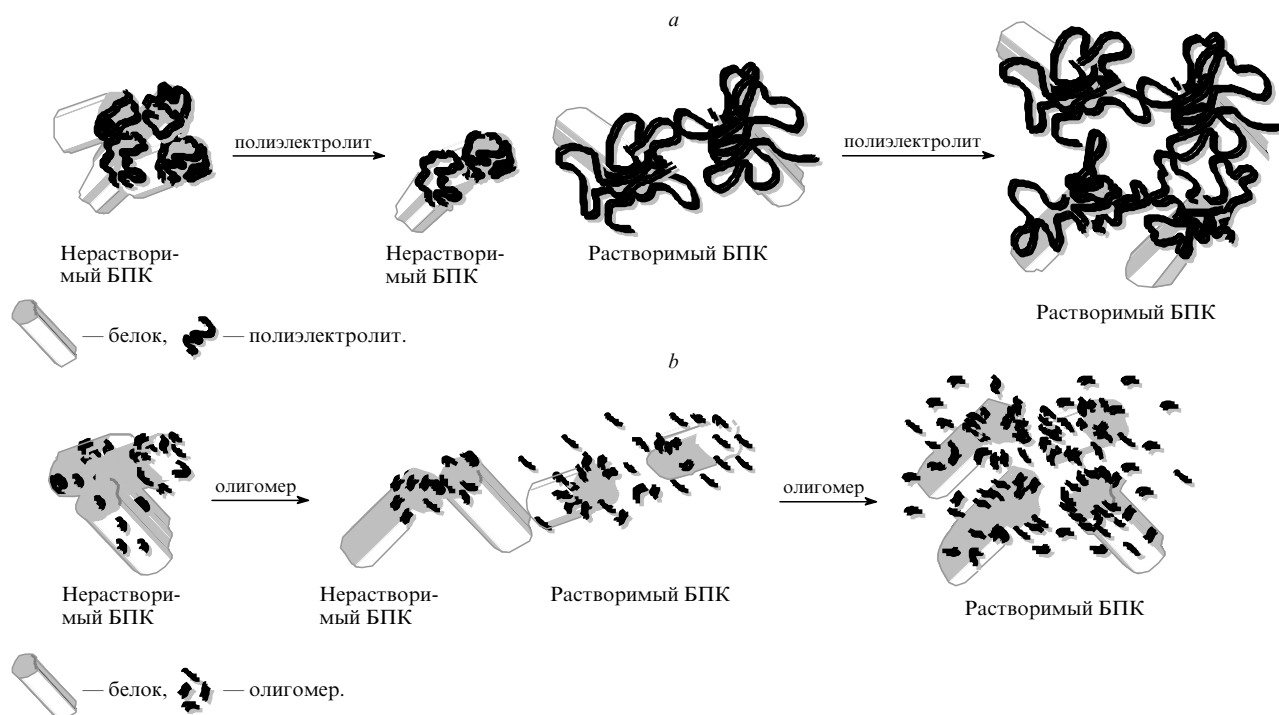


Рис. 5. Схематическое изображение превращения нерастворимого БПК в растворимый комплекс в результате добавления высокомолекулярного полииона (а) или заряженного олигомера (b).

ресно, что частично алкилированные ПЭВП- β -катионы проявляли даже более высокую стабилизирующую активность, чем полностью алкилированные, причем их способность подавлять термоагрегацию ГАФД существенно возростала с ростом содержания незаряженных гидрофобных пиридиновых звеньев в сополимере.[§]

Термодинамические ограничения, которые накладываются на образование растворимых комплексов олигомер/белок типа С, следует учитывать и по возможности использовать при решении практических задач. Так, неспособность коротких заряженных цепей сольubilизировать БПК заставляет более осторожно подходить к выбору полиионов для предотвращения термоагрегации белков. С другой стороны, можно без опасения осаждать белок из раствора заряженными олигомерами, поскольку их передозировка не влияет на эффективность выделения, а для разрушения образующихся нерастворимых БПК при регенерации белка достаточно небольших количеств низкомолекулярного электролита. По тем же соображениям нанесение заряженных олигомеров из раствора на белок-полиэлектролитную мультислойную пленку с белком в наружном слое не должно приводить к нежелательному образованию растворимых БПК, как это происходит при использовании высокомолекулярных полиионов.

V. Заключение

Анализ литературных данных⁹ показывает, что свойства растворимых НПЭК и БПК, в том числе явления самосборки и молекулярного «узнавания» в этих системах, имеют много

общего. Образование растворимых комплексов обоих семейств определяется гидрофильно-липофильным балансом их частиц, которые содержат минимальное количество компонентов, необходимых для растворения. Сходство НПЭК и БПК проявляется и в протекании конкурентных реакций, направление и скорость переноса компонентов в которых контролируются одними и теми же факторами, что отражает идентичность движущих сил реакций обмена и замещения. Фазовые разделения в растворах НПЭК и БПК также подчиняются единым закономерностям: они протекают количественно, обратимо, в узких интервалах изменения pH или ионной силы раствора и эффективно контролируются заряд-зарядовым соотношением партнеров (рис. 6).¹⁰⁵

Особенности поведения ПЭК и БПК определяются несходством структуры компонентов комплексов, а также различием в количестве и расположении ионных и ионогенных групп на поверхности глобулярных белков и на цепях линейных синтетических полиэлектролитов. Так, доступные для взаимодействия с поликатионом карбоксильные группы БСА распределены неравномерно по поверхности глобулы белка ($pI = 4.7$, 69 кДа) и жестко зафиксированы на ней. При pH 7.0 они образуют 55 ионных пар с ПЭВП-катионом,⁹³ тогда как на участке цепи гибкого ПМА-аниона той же молекулярной массы, связанного с ПЭВП-катионом, количество ионных пар на порядок больше. Небольшая протяженность и невысокая упорядоченность системы ионных пар в БПК обуславливают относительно низкую устойчивость комплекса БСА/ПЭВП в водно-солевых средах⁹⁹ и обеспечивают самосборку растворимых комплексов при смешивании водных растворов белка и поликатиона.

В отличие от БПК самопроизвольное образование растворимых НПЭК при смешивании растворов сильносвязывающихся комплементарных полиионов ПЭВП и ПМА

§ Эти данные могут составить основу для направленного синтеза эффективных профилактических и лекарственных средств.

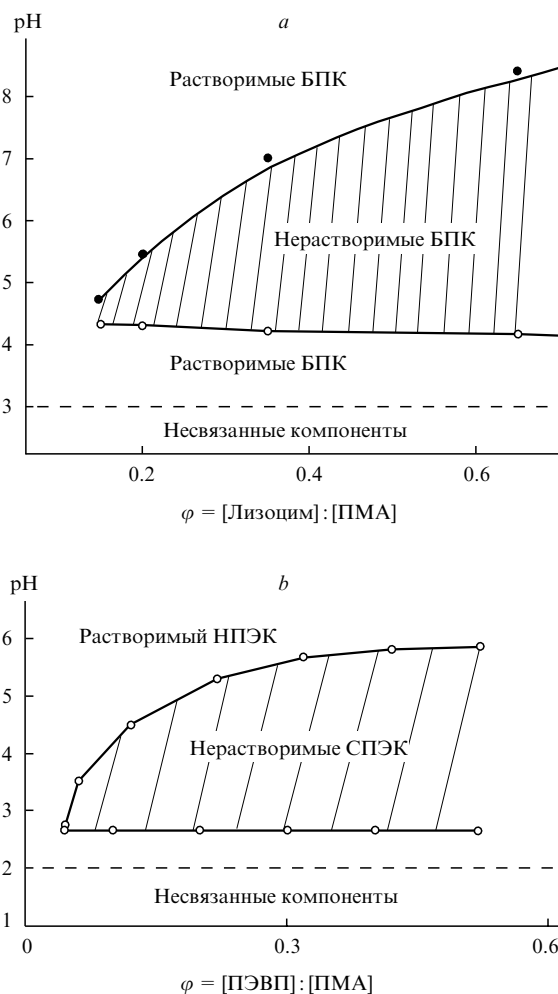


Рис. 6. Фазовые диаграммы смесей растворов ПМА-аниона с лизиним (a)¹⁰⁵ и ПЭВР-катион (b).¹⁰⁹

осуществляется только в присутствии низкомолекулярного электролита. По тем же причинам конкурентное взаимодействие высокозаряженных виниловых полиэлектролитов с БПК приводит к количественному вытеснению глобул белка из комплекса в раствор, тогда как белок, специфически связанный в БПК (например, взаимодействиями типа фермент – ингибитор¹⁰⁶ или антиген – антитело¹⁰⁷) переходит в образующийся осадок СПЭК. Этот эффект положен в основу разработки усовершенствованного метода иммунохимического анализа, при котором определение целевого белка проводят в растворе, пользуясь всеми преимуществами гомогенного катализа, а затем компоненты переводят в осадок, что сопровождается одновременным вытеснением из него неспецифически связанных белков.¹⁰⁸

Ковалентное связывание белка (фермента) с полиэлектролитом наделяет конъюгат полезными свойствами. Присутствие фермента в цепи практически не сказывается на ее взаимодействии с противоположно заряженным полиэлектролитом и не препятствует самосборке растворимых НПЭК в водно-солевых средах. Фазовое поведение растворимых НПЭК также практически не меняется. При этом иммобилизованный фермент приобретает уникальную способность НПЭК претерпевать обратимое и количественное фазовое разделение в заранее заданных условиях при крайне незначи-

тельных изменениях pH, ионной силы или состава смеси полиэлектролитов.¹⁰⁹ Свойства таких иммобилизованных обратимо-растворимых ферментов подробно изучены в работе¹¹⁰ и проанализированы в обзоре¹¹¹. Их использование позволяет

— осуществлять ферментативную реакцию в растворе, пользуясь всеми преимуществами гомогенного катализа, а по окончании процесса легко выводить иммобилизованный фермент из сферы реакции;

— значительно улучшать термостабильность фермента путем перевода его в осадок изменением pH раствора;

— защищать фермент от действия высокомолекулярных ингибиторов как в растворе, так и в осадке;

— создавать саморегулирующиеся ферментативные системы, в которых катализируемый процесс останавливается при достижении некоторой наперед заданной степени конверсии субстрата;

— конструировать обратимо-растворимые мультиферментные системы.

Литература

1. В.А.Кабанов. *Успехи химии*, **74**, 5 (2005)
2. J.Xia, P.L.Dubin. In *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. (Eds P.L.Dubin, J.Bock, R.M.Davis, D.N.Schulz, C.Thies). Springer-Verlag, Berlin, 1994. P. 247
3. В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **36**, 183 (1994)
4. J.Y.Shief, C.E.Glatz. In *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. (Eds P.L.Dubin, J.Bock, R.M.Davis, D.N.Schulz, C.Thies). Springer-Verlag, Berlin, 1994. P. 272
5. А.В.Кабанов, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **36**, 198 (1994)
6. E.Kokufuta. In *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. (Eds P.L.Dubin, J.Bock, R.M.Davis, D.N.Schulz, C.Thies). Springer-Verlag, Berlin, 1994. P. 301
7. A.V.Kabanov, V.A.Kabanov. *Bioconj. Chem.*, **6**, 7 (1995)
8. A.V.Kabanov, V.A.Kabanov. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **30**, 49 (1998)
9. V.A.Izumrudov, I.Yu.Galaev, B.Mattiasson. *Bioseparation*, **7**, 207 (1999)
10. D.V.Pergushov, E.V.Remizova, J.Feldthusen, A.B.Zezin, A.H.E.Müller, V.A.Kabanov. *J. Phys. Chem. B*, **107**, 8093 (2003)
11. П.С.Челушкин, Е.А.Лысенко, Т.К.Бронич, А.Эйзенберг, А.В.Кабанов, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **46**, 799 (2004)
12. V.A.Kabanov, A.B.Zezin, V.B.Rogacheva, Zh.G.Gulyaeva, M.F.Zansochova, J.G.H.Joosten, J.Brackman. *Macromolecules*, **31**, 5142 (1998)
13. З.Б.Шифрина, Н.В.Кучкина, А.Л.Русанов, В.А.Иzumrudov. *Докл. АН*, **416**, 66 (2007)
14. V.A.Izumrudov, N.I.Domashenko, M.V.Zhiryakova, O.V.Davydova. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 17391 (2005)
15. A.G.Didukh, G.Sh.Makys, L.A.Bimendina, S.E.Kudaibergenov. In *Advanced Macro- and Supramolecular Materials and Processes*. Kluwer Academic; Plenum Press, New York, 2002. P. 265
16. Д.В.Пергушов, И.А.Бабин, F.Plamper, A.H.E.Müller, А.Б.Зезин. В кн. *Наука о полимерах 21-му веку. Т. 2. (Тезисы IV Всероссийской Каргинской конференции)*. МГУ, Москва, 2007. С. 335
17. A.Kusumo, L.Bombalski, Q.Lin, K.Matyjaszewski, J.W.Schneider, R.D.Tilton. *Langmuir*, **23**, 4448 (2007)
18. A.San Juan, D.Letourneur, V.A.Izumrudov. *Bioconj. Chem.*, **18**, 922 (2007)
19. V.A.Izumrudov, S.A.Sukhishvili. *Langmuir*, **19**, 5188 (2003)
20. V.A.Izumrudov, E.Kharlampieva, S.A.Sukhishvili. *Biomacromolecules*, **6**, 1782 (2005)

21. В.А.Измурдов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **49**, 691 (2007)
22. Е.Кхарлampieva, S.A.Sukhishvili. *Langmuir*, **20**, 9677 (2004)
23. И.М.Паписов, А.А.Литманович. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **19**, 716 (1977)
24. А.А.Литманович, И.М.Паписов, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **22**, 1180 (1980)
25. В.А.Кабанов, И.М.Паписов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **21**, 243 (1979)
26. I.M.Papisov, A.D.Litmanovich. *Adv. Polym. Sci.*, **90**, 139 (1989)
27. E.Tsuchida, K.Abe. *Adv. Polym. Sci.*, **45**, 1 (1982)
28. В.А.Измурдов, А.И.Рыкунова, А.А.Синицын. *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия*, **34**, 405 (1993)
29. В.А.Измурдов, С.Х.Лим. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **40**, 459 (1998)
30. V.A.Izumrudov, M.V.Zhiryakova. *Macromol. Chem. Phys.*, **200**, 2533 (1999)
31. A.N.Zelikin, A.A.Litmanovich, V.V.Paraschuk, A.V.Sybatchin, V.A.Izumrudov. *Macromolecules*, **36**, 2066 (2003)
32. K.W.Mattison, P.L.Dubin, I.J.Brittain. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 3830 (1998)
33. J.M.Park, B.B.Muhoherac, P.L.Dubin, J.Xia. *Macromolecules*, **25**, 290 (1992)
34. M.Müller, T.Rieser, P.L.Dubin, K.Lunkwitz. *Macromol. Rapid Commun.*, **22**, 390 (2001)
35. E.Seyrek, P.L.Dubin, C.Tribet, E.A.Gamble. *Biomacromolecules*, **4**, 273 (2003)
36. Д.В.Пергушов, В.А.Измурдов, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **37**, 1739 (1995)
37. Д.В.Пергушов, В.А.Измурдов, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **35**, 844 (1993)
38. E.Tsuchida, Y.Osada, K.Sanada. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **10**, 3397 (1972)
39. V.A.Kabanov, A.B.Zezin. *Soviet Sci. Rev., Ser. B, Chem. Rev.*, **4**, 207 (1982)
40. О.А.Харенко, А.В.Харенко, Р.И.Калюжная, В.А.Измурдов, В.А.Касаикин, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **21**, 2719 (1979)
41. V.A.Izumrudov, A.P.Savitskii, K.N.Bakeev, A.B.Zezin, V.A.Kabanov. *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **5**, 709 (1984)
42. В.А.Измурдов, Т.Ю.Ныркова, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. Б*, **29**, 474 (1987)
43. В.А.Измурдов, Т.К.Бронич, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **29**, 1224 (1987)
44. V.A.Izumrudov, M.Yu.Gorshkova, I.F.Volkova. *Eur. Polym. J.*, **41**, 1251 (2005)
45. V.A.Izumrudov, V.V.Parashchuk, A.V.Sybachin. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **16**, 267 (2006)
46. В.А.Касаикин, О.А.Харенко, А.В.Харенко, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. Б*, **21**, 84 (1979)
47. А.Б.Зезин, В.А.Касаикин, Н.М.Кабанов, О.А.Харенко, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **26**, 1619 (1984)
48. Н.К.Нефедов, Т.Г.Ермакова, В.А.Касаикин, А.Б.Зезин, В.А.Лопырев. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **27**, 1496 (1985)
49. G.Decher. *Science*, **277**, 1232 (1997)
50. J.B.Schlenoff, S.T.Dubas. *Macromolecules*, **34**, 592 (2001)
51. C.L.Cooper, P.L.Dubin, A.B.Kayitmazer, S.Turksen. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **10**, 52 (2005)
52. S.A.Sukhishvili. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **10**, 37 (2005)
53. N.G.Hoogeveen, M.A.Cohen Stuart, G.J.Fleer, M.R.Böhmer. *Langmuir*, **12**, 3675 (1996)
54. Z.Sui, D.Salloum, J.B.Schlenoff. *Langmuir*, **19**, 2491 (2003)
55. B.Schoeler, G.Kumaraswamy, F.Caruso. *Macromolecules*, **35**, 889 (2002)
56. D.Kovačević, S.van der Burgh, A.de Keizer, M.A.C.Stuart. *Langmuir*, **18**, 5607 (2002)
57. D.Kovačević, S.van der Burgh, A.de Keizer, M.A.C.Stuart. *J. Phys. Chem. B*, **107**, 7998 (2003)
58. V.A.Izumrudov, E.Kharlampieva, S.A.Sukhishvili. *Macromolecules*, **37**, 8400 (2004)
59. S.A.Sukhishvili, E.Kharlampieva, V.A.Izumrudov. *Macromolecules*, **39**, 8873 (2006)
60. K.N.Bakeev, V.A.Izumrudov, S.I.Kuchanov, A.B.Zezin, V.A.Kabanov. *Macromolecules*, **25**, 4249 (1992)
61. В.А.Измурдов, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Успехи химии*, **60**, 1570 (1991)
62. V.A.Izumrudov, T.K.Bronich, O.S.Saburova, A.B.Zezin, V.A.Kabanov. *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **9**, 7 (1988)
63. К.Н.Бакеев, В.А.Измурдов, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. Б*, **29**, 483 (1987)
64. V.A.Izumrudov, F.Chaubet, A.-S.Clairebois, J.Jozefonvicz. *Macromol. Chem. Phys.*, **200**, 1753 (1999)
65. F.Chaubet, V.A.Izumrudov, C.Boisson-Vidal, J.Jozefonvicz. *Carbohydr. Polym.*, **51**, 33 (2003)
66. N.Kariyants, H.Dautzenberg, H.Cölfen. *Macromolecules*, **30**, 7803 (1997)
67. A.Zintchenko, G.Rother, H.Dautzenberg. *Langmuir*, **19**, 2507 (2003)
68. V.A.Izumrudov, T.K.Bronich, A.B.Zezin, V.A.Kabanov. *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.*, **23**, 439 (1985)
69. V.A.Kabanov, A.B.Zezin, V.A.Izumrudov, T.K.Bronich, K.N.Bakeev. *Macromol. Chem. Suppl.*, **13**, 137 (1985)
70. В.А.Измурдов, О.Ортега Ортиз, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Докл. АН*, **349**, 630 (1996)
71. A.V.Kabanov. *Pharm. Sci. Tech. Today*, **2**, 365 (1999)
72. C.W.Pouton, L.W.Seymour. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **46**, 187 (2001)
73. Y.W.Cho, J.-D.Kim, K.Park. *J. Pharmacokin. Pharmacodyn.*, **55**, 721 (2003)
74. М.В.Жирякова, В.А.Измурдов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **49**, 2092 (2007)
75. В.А.Измурдов, А.Б.Зезин, С.И.Каргов, М.В.Жирякова, В.А.Кабанов. *Докл. АН*, **342**, 626 (1995)
76. V.A.Izumrudov, S.I.Kargov, M.V.Zhiryakova, A.B.Zezin, V.A.Kabanov. *Biopolymers*, **35**, 523 (1995)
77. V.A.Izumrudov, M.V.Zhiryakova, S.I.Kargov, A.B.Zezin, V.A.Kabanov. *Makromol. Chem., Macromol. Symp.*, **106**, 179 (1996)
78. T.Schindler, E.Nordmeier. *Macromol. Chem. Phys.*, **198**, 1943 (1997)
79. V.A.Izumrudov, M.V.Zhiryakova, S.E.Kudaibergenov. *Biopolymers*, **52**, 94 (1999)
80. V.A.Izumrudov, M.V.Zhiryakova, A.V.Goulko. *Langmuir*, **18**, 10348 (2002)
81. J.Wang, S.-W.Huang, P.-C.Zhang, H.-Q.Mao, K.Leong. *Int. J. Pharm.*, **265**, 75 (2003)
82. D.H.Wakefield, J.J.Klein, J.A.Wolff, D.B.Rozema. *Bioconj. Chem.*, **16**, 1204 (2005)
83. V.A.Izumrudov, P.-O.Wahlund, P.-E.Gustavsson, P.-O.Larsson, I.Yu.Galaev. *Langmuir*, **19**, 4733 (2003)
84. P.-O.Wahlund, V.A.Izumrudov, P.-E.Gustavsson, P.-O.Larsson, I.Yu.Galaev. *Macromol. Biosci.*, **3**, 4 (2003)
85. P.-O.Wahlund, P.-E.Gustavsson, V.A.Izumrudov, P.-O.Larsson, I.Yu.Galaev. *Biotechnol. Bioeng.*, **87**, 675 (2004)
86. P.-O.Wahlund, P.-E.Gustavsson, V.A.Izumrudov, P.-O.Larsson, I.Yu.Galaev. *J. Chromatogr. A*, **807**, 121 (2004)
87. E.S.Trukhanova, V.A.Izumrudov, A.A.Litmanovich, A.N.Zelikin. *Biomacromolecules*, **6**, 3198 (2005)
88. J.D.Eichman, A.U.Bielinska, J.F.Kukovska-Latallo, B.W.Donovan, J.R.Baker. In *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*. (Eds J.M.J.Fréchet, D.A.Tomalia). Wiley, New York, 2001. P. 442
89. A.N.Zelikin, D.Putnam, P.Shastri, R.Langer, V.A.Izumrudov. *Bioconj. Chem.*, **13**, 548 (2002)
90. O.Boussif, F.Lezoualc'h, M.A.Zanta, M.D.Mergny, D.Scherman, B.Demeneix, J.P.Behr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7297 (1995)

91. Yu.Kirsh, O.Komarova, G.Lukovkin. *Eur. Polym. J.*, **9**, 1405 (1973)
92. V.A.Izumrudov. *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.*, **100**, 1017 (1996)
93. В.А.Иzumrudov, В.А.Касаикин, Л.Н.Ермакова, М.И.Мустафаев, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **23**, 1365 (1981)
94. V.A.Kabanov, A.B.Zezin, M.I.Mustafaev, V.A.Kasaikin. In *Polymer Amines and Ammonium Salts*. (Ed. E.J.Goethals). Pergamon Press, Oxford; New York, 1980. P. 173
95. В.С.Зайцев, В.А.Иzumrudov, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Докл. АН СССР*, **322**, 17 (1992)
96. В.А.Иzumrudov, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Докл. АН СССР*, **275**, 335 (1984)
97. В.А.Иzumrudov, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Докл. АН СССР*, **291**, 1127 (1986)
98. В.А.Кабанов, М.И.Мустафаев, В.Д.Блохина, В.С.Агафьева. *Мол. биология*, **14**, 64 (1980)
99. В.С.Зайцев, В.А.Иzumrudov, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Докл. АН СССР*, **323**, 177 (1992)
100. O.N.Ivinova, V.A.Izumrudov, V.I.Muronets, I.Yu.Galaev, B.Mattiasson. *Macromol. Biosci.*, **3**, 210 (2003)
101. I.N.Shalova, R.A.Asryants, M.V.Sholukh, L.Saso, B.I.Kurganov, V.I.Muronetz, V.A.Izumrudov. *Macromol. Biosci.*, **5**, 1184 (2005)
102. I.N.Shalova, I.N.Naletova, L.Saso, V.I.Muronetz, V.A.Izumrudov. *Macromol. Biosci.*, **7**, 929 (2007)
103. O.V.Polyakova, O.Roitel, R.A.Asryants, A.A.Polyakov, G.Branlant, V.I.Muronetz. *Protein Sci.*, **14**, 921 (2005)
104. Q.Wang, R.L.Woltjer, P.J.Cimino, C.Pan, K.S.Montine, J.Zhang, T.J.Montine. *FASEB J.*, **19**, 869 (2005)
105. В.А.Иzumrudov, С.Х.Лим. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **44**, 793 (2002)
106. А.Л.Марголин, С.Ф.Шерстюк, В.А.Иzumrudov, В.К.Швядас, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Докл. АН СССР*, **284**, 997 (1985)
107. Б.Б.Дзантиев, А.Н.Блинцов, Л.С.Цивилева, И.В.Березин, А.М.Егоров, В.А.Иzumrudov, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Докл. АН СССР*, **302**, 222 (1988)
108. Б.Б.Дзантиев, А.Н.Блинцов, А.Ф.Бобкова, В.А.Иzumrudov, А.Б.Зезин. *Докл. АН СССР*, **342**, 549 (1995)
109. А.Л.Марголин, В.А.Иzumrudov, С.Ф.Шерстюк, В.К.Швядас, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Мол. биология*, **17**, 1001 (1983)
110. А.Л.Марголин, С.Ф.Шерстюк, В.А.Иzumrudov, В.К.Швядас, А.Б.Зезин, В.А.Кабанов. *Eur. J. Biochem.*, **146**, 625 (1985)
111. А.Б.Зезин, В.А.Иzumrudov, В.А.Кабанов. *Makromol. Chem., Macromol. Symp.*, **26**, 249 (1989)

SELF-ASSEMBLY AND MOLECULAR «RECOGNITION» PHENOMENA IN SOLUTIONS OF (BIO)POLYELECTROLYTE COMPLEXES

V.A.Izumrudov

Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory, 119991 Moscow, Russian Federation, Fax +7(495)939-0174

Recently published data on polyelectrolyte complexes formed by both oppositely charged synthetic polyions and natural polyelectrolytes (proteins, enzymes, nucleic acids) are summarised. The properties of these complexes and the phase behaviour of their solutions is shown to obey the general trends found in the studies of cooperative interpolyelectrolyte interactions. The principles of functioning of polyelectrolyte complexes that underlie the self-assembly of complexes in solution and determine the ability of complexes to retain stability over a specified broad range of external conditions and then to quickly and reversibly respond with high sensitivity to a change in the environment by changing their molecular characteristics and phase state are considered. The successful use of the results of fundamental research of (bio)polyelectrolyte complexes for the solution of topical problems of biotechnology, materials science and medicine are demonstrated.

Bibliography — 111 references.

Received 26th November 2007

Свидетельство о регистрации № 0110235 от 08.02.93 в Министерстве печати и информации Российской Федерации.
Учредители: Российская академия наук, Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН

Номер набран и сверстан с использованием системы **Advent 3B2 Total Publishing System** на оборудовании, поставленном фирмой «Turpion Ltd».

Подписано к печати с оригинал-макета 04.04.08. Формат 60 × 90 1/8. Печать офсетная.
Усл. п. л. 12.0. Уч.-изд. л. 13.1. Тираж 600 экз. Заказ 519.

Отпечатано в полном соответствии с качеством предоставленных диапозитивов в ППП «Типография «Наука»
121099 Москва, Шубинский пер., 6.