



УДК 577.1.547.577.323.23

# ТРОЙНЫЕ ИНТЕРПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДНК-ПОЛИКАТИОН-ПОЛИАНИОН: НОВЫЙ ПОДХОД К ОПТИМИЗАЦИИ СМЕСЕЙ ДЛЯ ТРАНСФЕКЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

© 2001 г. М. А. Слинкин<sup>#</sup>, А. Я. Шевелев

Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ,  
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

Поступила в редакцию 03.10.2000 г. Принята к печати 26.02.2001 г.

Предложен новый подход к оптимизации смесей для конденсации и введения в эукариотические клетки плазмидной ДНК, основанный на образовании тройных интерполиэлектролитных комплексов (ИПЭК) ДНК/поликатион/полианион. В настоящей работе в качестве поликатиона взят полиэтиленимин (PEI) с  $M$  30–40 кДа, а в качестве полианиона – полиакриловая кислота (PA) с  $M$  20 кДа или ее привитый сополимер с полиэтиленгликолем (PA-PEG). Получены тройные комплексы с различным соотношением компонентов. Показано, что включение в состав тройного комплекса сополимера PA-PEG как самого по себе, так и в смеси с PA (1 : 1), придает комплексам растворимость в широком диапазоне соотношений ДНК/PEI. Показано также, что включение даже незначительных количеств PA-PEG (в смеси с PA 1 : 9) в тройные ИПЭК, не устранив полностью агрегацию комплексов, существенно изменяет их сорбционные характеристики. С использованием в качестве ДНК плазмиды, кодирующую  $\beta$ -галактозидазу, проведено сравнение эффективности трансфекции клеток СНО-AA8 и 293 различными ИПЭК и комплексом ДНК/липофектив. Оказалось, что максимально эффективны тройные ИПЭК, в которых кроме ДНК и PEI присутствует смесь (1 : 1) PA и PA-PEG. Обсуждаются возможные причины этого эффекта и дальнейшие пути оптимизации смесей для экспрессии плазмидной ДНК с использованием тройных ИПЭК.

**Ключевые слова:** полиэтиленгликоль; полиэтиленимин; полиакриловая кислота; конденсация ДНК; доставка ДНК; трансфекция.

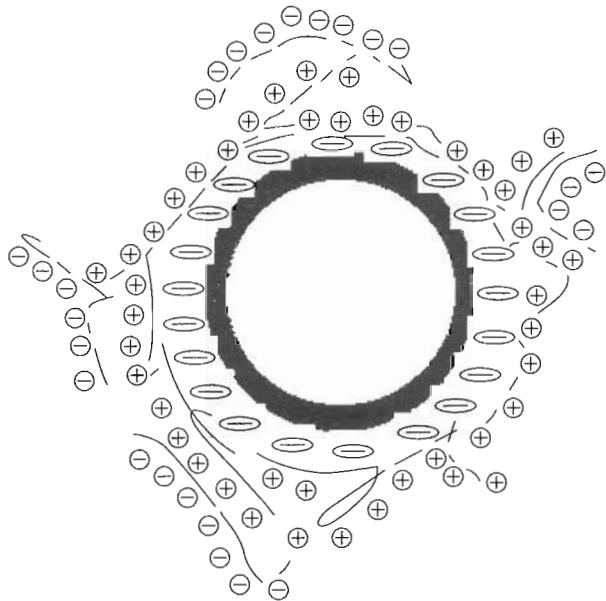
## ВВЕДЕНИЕ

Доставка чужеродных генов в эукариотические клетки с целью экспрессии этих генов или подавления экспрессии генов клетки, ответственных за то или иное заболевание, является одним из ключевых моментов генной терапии. В настоящее время эта задача решается с помощью вирусных конструкций (на основе адено- или ретровирусов), а также векторов невирусной природы, в которых отрицательно заряженная ДНК конденсирована положительно заряженными липидами или поликатионами. Использование последних приобрело известную популярность, главным образом, после открытия особых свойств комплексов ДНК с полиэтиленимином (PEI) [1], трансфицирующая способность которых *in vitro* значительно усиlena по сравнению с комплексами на основе других изученных поликатионов, на-

пример, полилизина [2], полиорнитина [3], хлористого поли(триметиламмонийэтил)метакрилата [4] и др. В отличие от последних, комплексы PEI/ДНК обладают способностью трансфицировать клетки в отсутствие веществ, нарушающих целостность эндосомальной мембрany [1, 5]. Дальнейший прогресс в использовании этих комплексов для генной терапии, в том числе, в их применении *in vivo*, в настоящее время связывают с возможностью направленно регулировать как их физические параметры (растворимость, размер, заряд), так и биологические характеристики (минимальные неспецифические взаимодействия с тканями и клетками организма). Много работ по этому посвящено изучению роли дополнительно включаемого в состав комплекса неполярного гидрофильного полимера, образующего на поверхности основного комплекса поликатион/ДНК гидрофильную оболочку и тем самым существенно модифицирующего его свойства. Наибольшее внимание в этом подходе привлекает полиэтиленгликоль (PEG) [6, 7], хотя есть примеры использования в аналогичных целях и декстрана [8].

Сокращения: PEG – полиэтиленгликоль; PA – полиакриловая кислота; PEI – полиэтиленимин; X-Gal – (5-бром-4-хлор-3-индолил)- $\beta$ -D-галактопиранозид; ИПЭК – интерполиэлектролитный комплекс.

<sup>#</sup>Автор для переписки (тел: (095) 149-28-08; e-mail: mona@cardio.ru).



**Рис. 1.** Схема тройного комплекса ДНК/поликатион/полианион. ДНК в конденсированной форме изображена как внутреннее кольцо в центре рисунка; с поверхностью глобулы ДНК кооперативно связаны цепи поликатиона, с петлями и "хвостами" которых могут взаимодействовать цепи полианиона.

Включение PEG в состав интерполиэлектролитного комплекса (ИПЭК) до настоящего времени достигалось двумя путями: либо поликатион модифицировали молекулами PEG с получением привитого сополимера [6, 8], либо получали блок-сополимер PEG-поликатион [4, 9]. В настоящей работе мы демонстрируем возможность модификации свойств комплекса PEI/DNA альтернативным способом – за счет включения в его состав привитого сополимера полиакриловой кислоты с полиэтиленгликолем (PA-PEG) и формирования тройного ИПЭК ДНК/поликатион/полианион.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Возможность включения в состав ДНК-содержащих ИПЭК третьего (отличного от ДНК) полианионного компонента основано на известном факте перезарядки комплекса ДНК/поликатион по мере увеличения содержания поликатиона [10]. В случае избытка ДНК двойной ИПЭК несет отрицательный заряд, при достижении эквивалентности зарядов ДНК и поликатиона образуется нерастворимый в водном растворе ИПЭК стехиометрического состава, а при избытке поликатиона вновь образуются нестехиометрические растворимые комплексы, стабилизированные положительно заряженными петлями и "хвостами" молекул поликатиона, связанными с ДНК [11].

Идея, лежащая в основе данной работы, состоит в том, что если положительный заряд нестехи-

ометричных ИПЭК ДНК/PEI, содержащих основомольный избыток PEI (то есть содержащих избыточное количество положительных зарядов), частично нейтрализовать полианионом (например, на основе PA), то при недостатке полианиона по отношению к PEI будет происходить образование тройного комплекса, и лишь при дальнейшем увеличении количества добавленной PA будет иметь место реакция замещения, которая приведет к полному вытеснению ДНК из ее комплекса с PEI. При этом введение в скелет PA дополнительных заместителей, лишь незначительно уменьшающих плотность отрицательного заряда полимерной цепи, не должно сказываться на способности таких модифицированных полианионов к кооперативному взаимодействию с петлями и хвостами поликатиона, но может существенным образом изменить свойства ДНК-содержащей частицы как целого. Сходный принцип образования полимерных мультислоев, в которых поликатион служит прослойкой между молекулами полианионов, активно используется для разработки новых типов полимерных материалов [12].

На рис. 1 схематично показана структура тройного комплекса на основе ДНК, поликатиона и полианиона. Следует отметить, что образование "молний" типа поликатион-полианион возможно как при добавлении полианиона к уже сформированному ИПЭК ДНК/PEI, так и при добавлении предобразованных нестехиометрических двойных комплексов поликатион/полианион (при основомольном недостатке последнего) к ДНК. При этом структура и кинетика образования тройных ИПЭК могут различаться.

В настоящей работе в качестве поликатиона был взят линейный PEI, а в качестве полианиона – либо просто PA, либо привитой сополимер PA-PEG. Последний получали через производное PA (см. схему), в котором часть карбоксильных групп была переведена в сульфосукцинимидные эфиры, способные реагировать с NH<sub>2</sub>-группой PEG.

Доля звеньев, несущих сульфосукцинимидные эфиры ( $\alpha = k/(i+k)$ ), составила 13%. Расчет степени модификации вели аналогично [13] по формуле:

$$\alpha = c_3 M_o / (c^{\text{вес}} - c_3 (M_3 - M_o)),$$

где  $c_3$  – молярная концентрация эфирных звеньев в исходном растворе в DMSO, а  $c^{\text{вес}}$  – весовая концентрация полимера в том же растворе (20 г/л),  $M_o$  (72) и  $M_3$  (271) – молекулярные массы немодифицированного и эфирного звеньев, соответственно. Величину  $c_3$  определяли экспериментально из значения оптического поглощения  $A_{259}$  после полного гидролиза образца полимера, добавленного в водный раствор в разведении 1/500, по формуле:

$$c_3 = A_{259} \times 500/\epsilon,$$

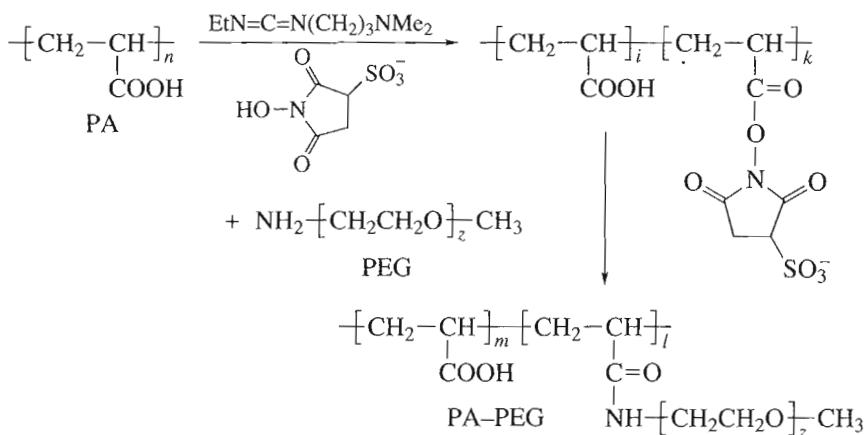


Схема. Получение привитого сополимера PA-PEG.

где  $\varepsilon = 7500 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , молярный коэффициент поглощения свободного гидроксисульфосукцинидия в воде при 259 нм.

Степень полимеризации PA с  $M = 20000$  составляет 270, т.е. около 35 звеньев активированного полимера доступны для прививки цепей  $\alpha$ -метокси- $\omega$ -амино-PEG. Как показало титрование с помощью тринитробензолсульфокислоты аминогрупп PEG, оставшихся после реакции (данные не показаны), при исходном соотношении PEG/активированное звено PA, равном 1 : 3, 90% молекул PEG вступили в реакцию, т.е. полученный привитой сополимер PA-PEG содержал около 10 цепей PEG на одну цепь PA.

Мы изучили взаимодействие PEI с полианионами на основе PA методом турбидиметрии. Как следует из рис. 2, двойные ИПЭК PEI/PA образуют мутные суспензии (т.е. коллоидно нестабильны) при любом соотношении компонентов комплекса, причем по мере увеличения содержания PA мутность суспензии сначала возрастает, а затем уменьшается. Очевидно, что мутность достигает максимума при полной нейтрализации PEI, а затем падает по мере перезарядки ИПЭК. С другой стороны, из рис. 2 видно, что отрицательно-заряженный ИПЭК PEI/PA приобретает новые сорбционные характеристики: до точки нейтрализации заряда (левая часть рисунка) ИПЭК, оставленный в полистирольной плашке на 24 ч при комнатной температуре, прочно сорбируется на ее дне, и супернатант, перенесенный в новые лунки, полностью прозрачен. В то же время после точки нейтрализации (правая часть рисунка) ИПЭК вообще не сорбируется, и мутность суспензии не исчезает.

Совершенно иная картина наблюдается при формировании двойного ИПЭК добавлением к PEI смеси PA с привитым сополимером PA-PEG. На рис. 3 показана кривая мутности ИПЭК, весо-

вое соотношение PA/PEI в котором поддерживается постоянным и составляет 0.57, но в качестве полианиона берется смесь PA и PA-PEG в разных соотношениях. Видно, что добавление PEG-содержащего компонента в ИПЭК коренным образом изменяет свойства последнего, в частности, уменьшает его коллоидную нестабильность. По мере увеличения доли PA-PEG в смеси полианионов увеличивается растворимость ИПЭК, причем мутность ИПЭК полностью исчезает даже в том случае, когда к поликатиону добавлены равные ко-

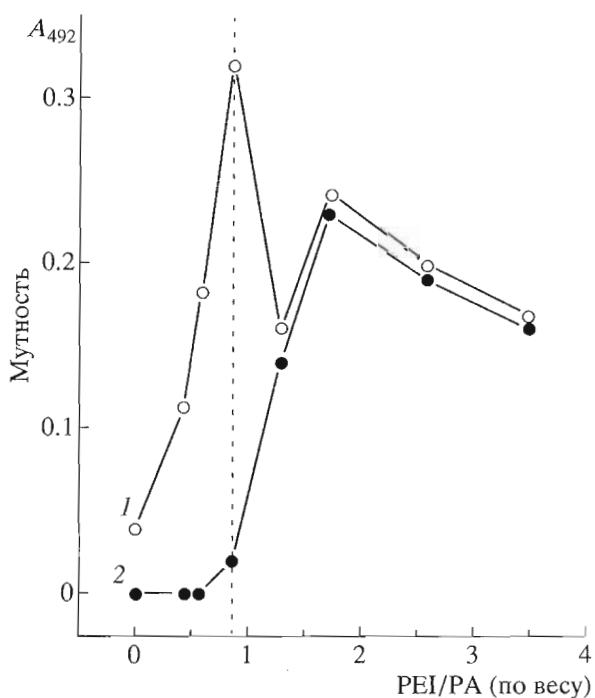
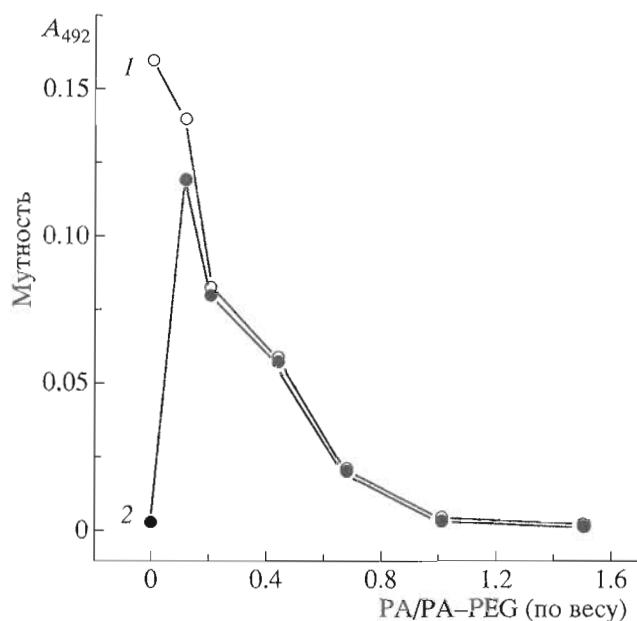
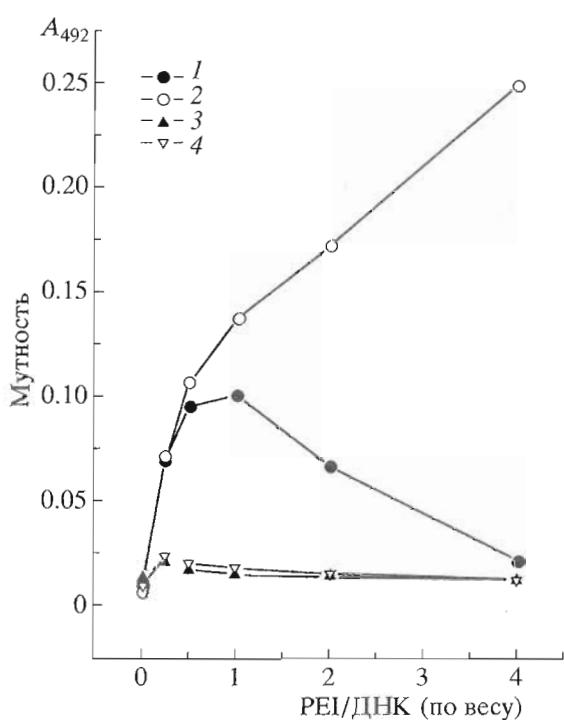


Рис. 2. Зависимость мутности комплексов PEI/PA от количества добавленной PA. Мутность измеряли через 10 мин (кривая 1) и через 24 ч (кривая 2) после смешивания полимеров.



**Рис. 3.** Зависимость мутности двойных ИПЭК от соотношения PA/PA-PEG. ИПЭК получены смешиванием 10.5 мкг PEI и смесей PA/PA-PEG при постоянном соотношении PA/PEI = 0.57 (в расчете на немодифицированную PA), через 10 мин (кривая 1) и через 24 ч после смешивания (кривая 2).



**Рис. 4.** Зависимость мутности двойных и тройных ИПЭК от соотношения PEI/ДНК. ИПЭК получены смешиванием 5 мкг плазмиды pcDNA-βGal и PEI (1), PEI/PA (2), PEI/PA-PEG (3) и PEI/(PA+PA-PEG) (4). Весовое соотношение PA/PA-PEG = 1 : 1. Весовое соотношение PA/PEI (в расчете на немодифицированную PA) поддерживается постоянным и равно 0.57.

личества PA и PA-PEG. Кроме того, видно, что минимальная добавка PA-PEG (10% общего веса полиамиона) резко изменяет сорбционные характеристики ИПЭК: оставаясь мутным, ИПЭК при этом практически не сорбируется на полистирольную поверхность, что резко отличает его от ИПЭК, состоящего только из PEI и PA. Очевидно, что такое падение "липкости" не может быть в данном случае связано с перезарядкой ИПЭК (как в случае, показанном на рис. 2), а определяется наличием "гребенки" из гидрофильных цепей PEG аналогично тому, как это происходит при формировании ИПЭК из ДНК и сополимеров полилизин-PEG [4, 9] или PEI-PEG [14, 15].

При изучении растворимости тройных комплексов ДНК/PEI/полианион, в которых в качестве полиамиона брали различные комбинации PA и PA-PEG, мы обнаружили следующие закономерности (см. рис. 4). В отсутствие полиамиона ИПЭК ДНК/PEI агрегирует, причем в точке нейтрализации заряда степень агрегации проходит через максимум, и при значительном избытке PEI ИПЭК становится полностью растворимым; при этом вблизи максимума мутности ИПЭК сорбируется на полистирольную поверхность (данные не показаны). В случае, когда к ДНК добавляют PEI/PA при постоянном весовом отношении PA/PEI 0.57, мутность ИПЭК увеличивается по мере увеличения отношения PEI/ДНК, причем тройной комплекс "липнет" на поверхность плашки лишь в области низких весовых отношений PEI/ДНК (до 1–2), и не сорбируется при дальнейшем увеличении отношения PEI/ДНК. Если же к ДНК добавлять комплекс, состоящий из PEI и PA-PEG (также при весовом отношении PA/PEI, равном 0.57), агрегации не наблюдается во всей области значений PEI/ДНК. Та же картина наблюдается и при включении в состав тройного ИПЭК смеси PA и PA-PEG, взятых в равных количествах.

Мы изучили также роль условий формирования тройного ИПЭК – а именно, порядка добавления реагентов. Выяснилось, что если к предобразованному двойному ИПЭК PEI/ДНК, полученному смешиванием 5 мкг ДНК и 2.5 мкг PEI (этот ИПЭК агрегирует вследствие нейтрализации заряда) добавлять PA-PEG вплоть до 2.5 мкг, растворимый тройной комплекс не образуется (по крайней мере, в течение 24 ч). Это наблюдение позволяет предположить, что двойной ИПЭК PEI/ДНК более термодинамически устойчив, чем тройной ИПЭК с участием PA-PEG, но в то же время последний характеризуется высокой кинетической устойчивостью. Действительно, описанные выше тройные комплексы, полученные смешиванием ДНК с предобразованным PEI/PA-PEG, не агрегировали, по крайней мере, в течение недели.

Более подробно влияние структуры и количества полиамиона на устойчивость тройных ИПЭК мы изучили с помощью электрофореза в 0.6% агарозном геле. Из рис. 5 видно, что РА сама по себе заметно вытесняет ДНК из тройного ИПЭК при весовом соотношении РА/PEI 1 : 1; при РА/PEI = 2 : 1 ДНК вытесняется полностью. В то же время сополимер РА-PEG даже при двукратном избытке по отношению к PEI оказывается неспособным вытеснить хоть сколько-нибудь заметную часть ДНК: вся ДНК остается в конденсированной форме на старте. По-видимому, такой эффект связан не столько с уменьшением плотности отрицательного заряда РА вследствие ее модификации PEG (в использованном сополимере модифицировано лишь 3–4% звеньев), сколько с тем, что цепи PEG создают стерические препятствия для образования длинных "молний" между PEI и полиамионом, требуемых для реакции замещения ДНК и ее высвобождения.

На рис. 5 видна еще одна особенность тройных ИПЭК с участием РА-PEG: флуоресценция ДНК, оставшейся на старте, существенно более сильная, чем в случае комплексов ДНК/PEI и ДНК/PEI/РА. Вероятно, это связано с вхождением растворимых PEG-содержащих комплексов в гель, что препятствует быстрому вымыванию ДНК при прокрашивании геля бромистым этидием (при этом процедуре ДНК должна быть предварительно высвобождена из ИПЭК за счет инкубации геля в присутствии избытка полиамиона). В то же время существующие в виде агрегатов комплексы ДНК/PEI и ДНК/PEI/РА в гель войти не могут, и потому после их диссоциации прокрашенная ДНК быстро вымывается из лунок.

Мы сопоставили эффективность трансфекции двух клеточных линий различными комплексами ДНК, в качестве которой использовали плазмиду pcDNA- $\beta$ Gal, кодирующую репортерный белок  $\beta$ -галактозидазу. Об эффективности трансфекции судили на основании числа клеток, окрашиваемых в сине-зеленый цвет после добавления к ним субстрата  $\beta$ -галактозидазы X-Gal. Окраска клеток обусловлена расщеплением X-Gal под действием фермента, появляющегося в клетках в результате трансфекции.

На рис. 6 и 7 представлены фотографии, иллюстрирующие трансфекцию клеток линии 293 и CHO-AA8 комплексами ДНК различного состава. Бытый в качестве контроля двойной комплекс ДНК/PEI был выбран в ходе предварительного эксперимента по трансфекции, цель которого состояла в оптимизации соотношения обоих компонентов: этот комплекс соответствует максимальной эффективности трансфекции, а его состав согласуется с ранее опубликованными данными [1]. Неожиданный эффект, обнаруженный нами в ходе этих экспериментов, связан с усилением эффектив-

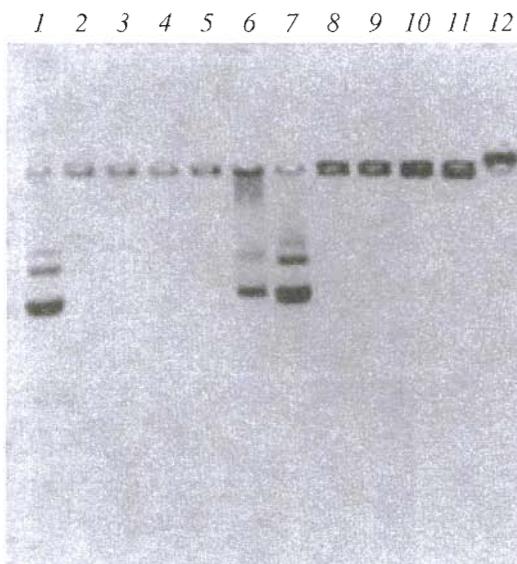
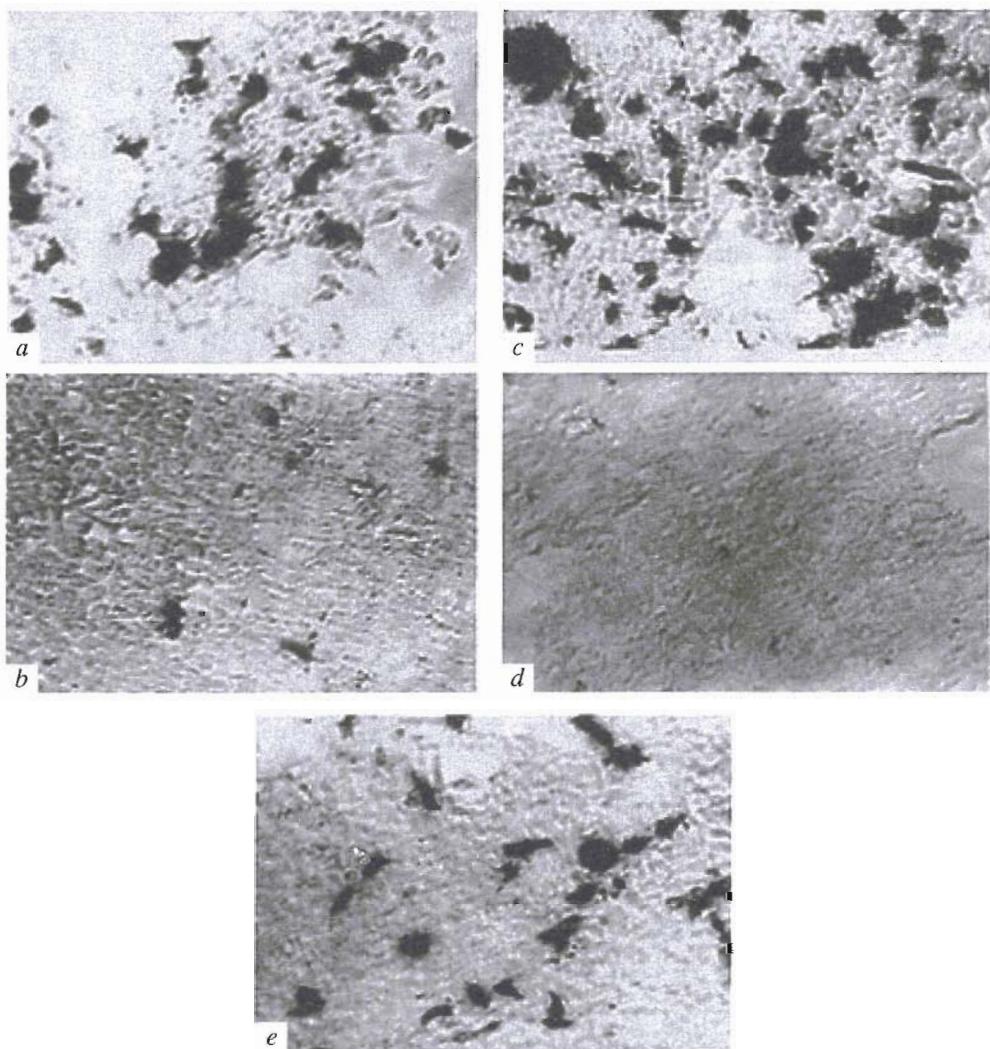


Рис. 5. Электрофорез в 0.6% агарозном геле свободной плазмиды pcDNA- $\beta$ Gal (дорожка 1), ее двойного ИПЭК с PEI (2 мкг PEI/1 мкг ДНК) (дорожка 2) и тройных ИПЭК, содержащих 0.24 (3), 0.48 (4), 0.96 (5), 1.98 (6), 3.96 мкг РА (7) и 0.24 (8), 0.48 (9), 0.96 (10), 1.98 (11), 3.96 мкг РА-PEG (12).

ности трансфекции при включении в тройные ИПЭК PEG-содержащего полиамиона. На рис. 6 хорошо видно, что комплекс ДНК/PEI/(PA+PA-PEG), в который в качестве полиамиона включена смесь линейного полимера РА и ее привитого сополимера с PEG, дает максимальное число окрашенных клеток (рис. 6c). Сходные данные получены и для клеток CHO-AA8, хотя общее количество трансфицированных клеток для них ниже (рис. 7). Интересно, что комплексы, в которые в качестве полиамиона включены просто РА (рис. 6b и 7b) или избыток РА-PEG (рис. 6d), дают пренебрежимо малый уровень трансфекции по сравнению как с ДНК/PEI (рис. 6a и 7a), так и с ДНК/липофектив (рис. 6e и 7d). Следует отметить, однако, что соотношение всех трех компонентов в этих ИПЭК таково, что вся ДНК в них конденсирована (как это следует из данных электрофореза) – очевидно, что само по себе это условие недостаточно для эффективной трансфекции.

Согласно современным представлениям [2, 16], для трансфекции клеток комплексами ДНК с поликатионами необходимо соблюдение как минимум двух условий: (1) эти комплексы должны достаточно эффективно проникать в клетку путем жидкофазного пиноцитоза, при котором они захватываются "окаймленными пузырьками" и попадают сначала в эндосомы, а затем в лизосомы, и (2) из указанных клеточных органелл ДНК должна в неповрежденном виде попадать в цитоплазму, чему может препятствовать ее гидролиз лизосомными нуклеазами, pH-оптимум которых



**Рис. 6.** Экспрессия гена  $\beta$ -галактозидазы в клетках линии 293, полученная в результате их транзитной трансфекции комплексами ДНК/PEI 1 : 2 (a), ДНК/PEI/PA 1 : 2 : 1.2 (b), ДНК/PEI/(PA+PA-PEG) 1 : 2 : (0.6 + 0.6) (c), ДНК/PEI/PA-PEG 1 : 2 : 6 (d) и ДНК/липофектин (e). Увел.  $\times 200$ .

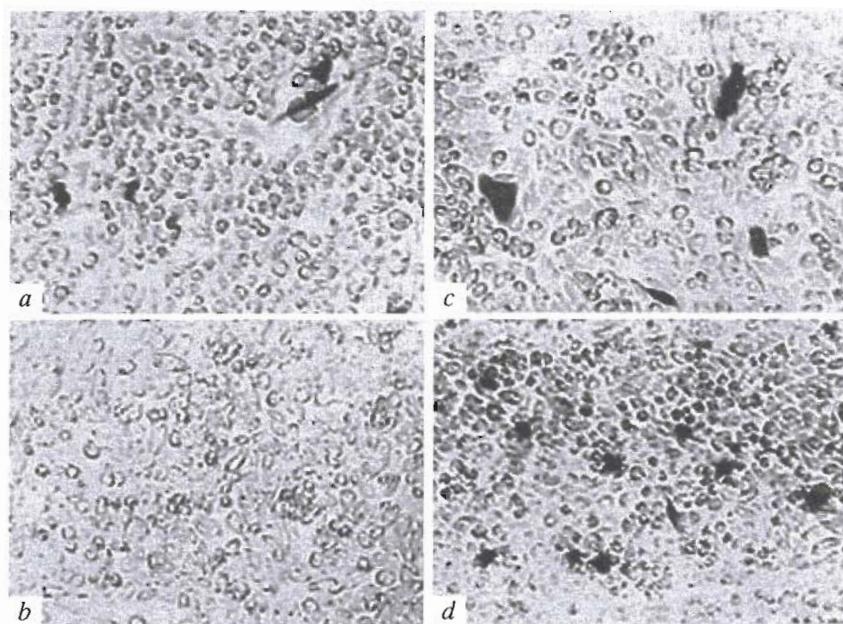
соответствует внутрилизосомному pH (4–4.5). Такой механизм объясняет, в частности, роль размеров ИПЭК: они не должны значительно превышать 100 нм, что примерно соответствует размерам “окаймленных пузырьков”. Наиболее эффективные из применяемых в настоящее время для конденсации ДНК поликатионов (PEI и аминосодержащие дендримеры) оказываются и наиболее стабильными: размеры их ИПЭК с ДНК в присутствии сыворотки и солей остаются в пределах 90–120 нм, в то время как ИПЭК положительно заряженных полипептидов с ДНК агрегируют [3, 17].

С другой стороны, присущую PEI буферную способность в кислой области pH связывают с возможным защелачиванием в его присутствии лизосомной среды и ингибированием нуклеаз [5], что позволяет комплексам ДНК/PEI оказывать

трансфицирующее действие в отсутствие эндосомолитических агентов – эффект, не наблюдаемый для ИПЭК ДНК/полипептид [3].

Ранее уже было описано включение PEG в состав ИПЭК с ДНК. Для этого использовали как блок-сополимеры, так и привитые сополимеры PEG с полилизином [4, 9] и PEI [6, 14]. Было показано, что оболочка гидрофильных цепей PEG вокруг нейтрализованного ИПЭК с ДНК стабилизирует комплекс против воздействия температуры, полианионов [9] и компонентов сыворотки [6], предотвращая его разрушение или агрегацию. Сходный эффект стабилизации ИПЭК в присутствии PEG был показан для стехиометрических комплексов блок-сополимера PEG-полиметакрилата и поли(*N*-этил-4-винилпиридина) [18].

Возможно, наблюдаемое нами повышение эффективности трансфекции при включении PEG в



**Рис. 7.** Экспрессия гена  $\beta$ -галактозидазы в клетках CHO-AA8, полученная в результате их транзитной трансфекции комплексами ДНК/РЕИ 1 : 2 (a), ДНК/РЕИ/РА 1 : 2 : 1.2 (b), ДНК/РЕИ/(РА+РА-PEG) 1 : 2 : (0.6 + 0.6) (c), ДНК/липофектин (d). Увел.  $\times 200$ .

состав тройных ИПЭК, описанное выше, связано с более высокой стабильностью получаемых комплексов. Напротив, значительное снижение эффективности трансфекции тройных ИПЭК, содержащих только РА, вероятно, можно объяснить уменьшением стабильности таких конструкций по сравнению с комплексами ДНК/РЕИ. Не исключено, что определенную роль может играть также тот факт, что расположенные на поверхности цепи PEG экранируют заряд внутренней части ИПЭК и опосредуют слияние с клеточной мембранный [4]. Наконец, нулевая трансфекция клеток комплексами, содержащими избыток РА-PEG в качестве полианиона, свидетельствует о том, что существенную роль в трансфекции тройными ИПЭК может играть и такой фактор, как плотность цепей PEG на поверхности комплекса и степень экранирования заряда.

Таким образом, из полученных нами результатов следует, что полианион (РА) может быть успешно использован как третий компонент ДНК-содержащего ИПЭК для включения в него молекул PEG и придания новых свойств комплексу. При этом, хотя включение в ИПЭК РЕИ/ДНК поликарболовой кислоты само по себе оказывает негативное влияние на эффективность трансфекции, включение ее в равном количестве с привитым сополимером РА-PEG, напротив, увеличивает транзитную трансфекцию. По сравнению с привитым сополимером РЕИ-PEG, использование которого для получения коллоидно стабильных комплексов с ДНК было описано ранее [6, 14], такой путь может иметь определенные преимуще-

ства с точки зрения полноты конденсации ДНК не модифицированным РЕИ, а лишь входящим в нестехиометрический комплекс с полианионом. Кроме того, описанный подход открывает дальнейшие возможности для оптимизации свойств ДНК-содержащих ИПЭК. Варьирование природы и соотношений полианионных компонентов таких ИПЭК позволяет увеличить эффективность трансфекции по сравнению с уже традиционными комплексами ДНК/РЕИ и ДНК/липофектин. Заслуживает дальнейшего изучения вопрос о влиянии состава PEG-содержащих ИПЭК на их стабильность, заряд и размеры. Наконец, большой простор для исследований открывает включение в ИПЭК полианионов, модифицированных не только PEG, но и другими молекулами – пептидами, опосредующими разрыв эндосомальной мембранны; углеводами и белками, узнающими клеточные рецепторы; липидами, вызывающими слияние с клеточной мембранный и увеличивающими проникновение конструкций в клетку [19]. Некоторые из перечисленных подходов изучаются в настоящее время в нашей лаборатории.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали следующие исходные вещества: РЕИ ( $M = 30\text{--}40000$ , BDH, Англия); РА ( $M = 20000$ ), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, N-гидроксисульфосукцинимид, DMSO (все реактивы Fluka, Швейцария);  $\alpha$ -метокси- $\omega$ -амино-PEG ( $M 3500$ ), (Shearwaters, США); триниитробензолсульфокислоту (Kodak, Япония); X-Gal, Трис и

другие компоненты буферных растворов фирмы "Sigma" (США), липофектин (Life Technologies, США).

В качестве ДНК для трансфекции использовали плазмиду pcDNA- $\beta$ Gal размером 9.7 т.п.о., полученную на основе стандартного эукариотического вектора pcDNA3 (INVITROGEN). В состав pcDNA- $\beta$ Gal включена область, кодирующая репортерный белок  $\beta$ -галактозидазу *E. coli* под контролем раннего промотора цитомегаловируса. Плазмида была выделена методом щелочного гидролиза и дополнительно очищена от РНК с помощью PEG [20].

**Активированную РА**, несущую боковые сульфосукцинимидные группы получали по описанной нами ранее методике активации карбоксильных групп полимера в органической среде [13], для чего к 4.6 мг РА в 230 мкл DMSO добавляли *N*-гидроксисульфосукцинимид (11 мг) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодииimid (9.5 мг) в 205 мкл DMSO, и смесь оставляли на ночь при 37°C. По окончании активации к смеси добавляли 3 мл этанола, полученный осадок отделяли центрифугированием и удаляли следы растворителя на лиофильной установке HetoSicc (Дания). Осадок активированного полимера растворяли в DMSO до концентрации 20 мг/мл. Наличие активированных эфиров в цели РА подтверждалось, наблюдая обусловленный их гидролизом прирост оптической плотности при 259 нм после добавления аликвоты раствора полимера в DMSO в раствор 0.1 М фосфатного буфера, pH 8.0.

Для получения привитого сополимера PEG-РА к раствору 0.7 мг  $\alpha$ -метокси- $\omega$ -амино-PEG (200 нмоль) в 215 мкл 0.05 М боратного буфера, pH 8.0, добавляли 0.5 мг активированной РА в 25 мкл DMSO (600 нмоль активированных эфиров). Смесь инкубировали 18 ч при комнатной температуре, после чего полноту пришивки PEG проверяли по реакции титрования первичных аминогрупп с помощью тринитробензолсульфокислоты [21]. Для удаления низкомолекулярных продуктов реакции и следов несвязавшегося  $\alpha$ -метокси- $\omega$ -амино-PEG смесь дialisировали против 12.5 мМ Трис-HCl, pH 7.5 в дialisном мешке фирмы "Serva" с размером пор, соответствующим белку с молекулярной массой 12–14 кДа.

**Двойные ИПЭК PEI/ДНК и PEI/РА** получали простым смешиванием компонентов в 12.5 мМ Трис-HCl, pH 7.5 в различных соотношениях. Тройные ИПЭК получали, предварительно смешивая PEI с полианионом на основе РА в различных соотношениях, а затем предобразованный комплекс добавляли к ДНК. Для измерения мутности суспензий полимеры смешивали в лунках полистирольной плашки для культивирования клеток (Costar), и полный объем доводили до 200 мкл добавлением 12.5 мМ Трис-HCl, 1 мМ EDTA, pH

7.5. В качестве меры мутности использовали оптическое поглощение при 492 нм, которое изменили либо через 10 мин, либо через 24 ч после смешивания. В последнем случае перед измерением содержимое лунок без перемешивания переносили в новые лунки.

**Конденсацию ДНК в ИПЭК** наблюдали по ее подвижности при электрофорезе в 0.6% агарозном геле в Трис-ацетатном буфере [20]. Для визуализации не вошедшей в гель конденсированной ДНК после окончания электрофореза гель в течение 30 мин промывали в 200 мл буфера PBS (10 мМ фосфат Na, 140 мМ NaCl, pH 7.3), содержащим 100 мкг/мл РА и 1 мкг/мл бромистого этидия.

**Трансфицирующую способность ДНК-содержащих ИПЭК** изучали на клетках CHO-AA8 и 293 (получены от В.С. Прасолова, ИМБ, Москва), выращенных на среде DMEM (Life Technologies, каталожный номер 52100-047) в присутствии 10% сыворотки плода коровы в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (95% воздух, 5% CO<sub>2</sub>). Клетки высевали в ростовой среде в количестве 50000 (1 мл) в лунки 24-луночной плашки, через 24 ч ростовую среду заменяли на бессывороточную среду DMEM и добавляли по 0.5 мкг ДНК на лунку в составе ИПЭК. Трансфекцию с липофектином проводили согласно протоколу фирмы-производителя. Через 16 ч вновь добавляли ростовую среду, клетки инкубировали еще 24 ч, после чего среду удаляли, а клетки фиксировали смесью 2% формальдегид – 0.2% глутаровый альдегид в PBS (10 мин при 25°C), снова промывали PBS и инкубировали с субстратом  $\beta$ -галактозидазы (1 мг/мл X-Gal, 5 мМ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 мМ K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 мМ MgCl<sub>2</sub> в PBS) 6 ч при 37°C. После окончательной промывки с помощью PBS клетки наблюдали в световом микроскопе на предмет образования сине-зеленого окрашивания, свидетельствующего об эффективности транзитной трансфекции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 7297–7301.
2. Wagner E., Cotten M., Foisner R., Birnstiel M.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 4255–4259.
3. Pouton C.W., Lucas P., Thomas B.J., Uduehi A.N., Millroy D.A., Moss S.H. // J. Controlled Release. 1998. V. 53. P. 289–299.
4. Wolfert M.A., Schacht E.H., Toncheva V., Ulbrich K., Nazarova O., Seymour L.W. // Hum. Gene Ther. 1996. V. 7. P. 2123–2133.
5. Demeneix B.A., Behr J.P. // Artificial Self-Assembling Systems for Gene Delivery /Eds P.L. Felgner, M.J. Heller, P. Lehn, J.-P. Behr, F.C. Szoka. Washington: American Chem. Soc. Books, 1996. P. 146–152.
6. Ogris M., Brunner S., Schuller S., Kircheis R., Wagner E. // Gene Ther. 1999. V. 6. P. 595–605.

7. Erbacher P., Bettinger T., Belguise P., Zou S., Coll J.L., Behr J.P., Remy J.S. // *J. Gene Med.* 1999. V. 1. P. 210–222.
8. Maruyama A., Watanabe H., Ferdous A., Katoh M., Ishihara T., Akaike T. // *Bioconjug. Chem.* 1998. V. 9. P. 292–299.
9. Katayose S., Kataoka K. // *Bioconjug. Chem.* 1997. V. 8. P. 702–707.
10. Kabanov V.A., Zezin A.B. // *Soviet. Sci. Rev. B. Chemistry* / Ed. M.E. Volpin. N.Y.: Harwood Academic Publishers, 1984. V. 4. P. 207.
11. Кабанов А.В., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. С. 198–210.
12. Decher G. // *Science*. 1997. V. 277. P. 1232–1236.
13. Slinkin M.A., Klibanov A.L., Khaw B.A., Torchilin V.P. // *Bioconjug. Chem.* 1990. V. 1. P. 291–295.
14. Vinogradov S.V., Bronich T.K., Kabanov A.V. // *Bioconjug. Chem.* 1998. V. 9. P. 805–812.
15. Vinogradov S., Batrakova E., Li S., Kabanov A.V. // *Bioconjug. Chem.* 1999. V. 10. P. 851–860.
16. Bettinger T., Remy J.S., Erbacher P. // *Bioconjug. Chem.* 1999. V. 10. P. 558–561.
17. Tang M.X., Szoka F.C. // *Gene Ther.* 1997. V. 8. P. 823–832.
18. Kabanov A.V., Bronich T.K., Kabanov V.A., Kui Y., Eisenberg A. // *Macromolecules*. 1996. V. 29. P. 6797–6802.
19. Yaroslavov A.A., Sukhishvili S.A., Obolsky O.L., Yaroslavova E.G., Kabanov A.V., Kabanov V.A. // *FEBS Lett.* 1996. V. 384. P. 177–180.
20. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
21. Fields R. // *Biochem. J.* 1971. V. 124. P. 581–589.

## **Ternary Interpolyelectrolyte Complexes DNA–Polycation–Polyanion: A New Approach to Optimization of Mixtures for Transfection of Eukaryotic Cells**

**M. A. Slinkin and A. Ya. Shevelev**

e-mail: mona@cardio.ru

Russian Cardiology Research Center, Third Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

A new approach to optimization of mixtures for the condensation and introduction of plasmid DNA into eukaryotic cells is proposed, which is based on the formation of ternary interpolyelectrolyte complexes (IPEC) DNA/polycation/polyanion. Polyethyleneimine (PEI) with  $M$  30–40 kDa as polycation and polyacrylic acid (PA) with  $M$  20 kDa or its grafted copolymer with polyethyleneglycol (PEG) as polyanion were used, and ternary complexes with various ratios of the components were prepared. The PA–PEG incorporation into a ternary complex (by itself or as a 1 : 1 mixture with PA) was shown to confer the solubility onto complexes in a wide range of DNA/PEI ratios. Incorporation of even minute amounts of PA–PEG (as a 1 : 9 mixture with PA), while not completely preventing the aggregation of ternary IPEC, drastically changed their sorption characteristics. Using a  $\beta$ -galactosidase-encoding plasmid, efficiencies of transfection of the CHO-AA8 and 293 cells for different IPEC and DNA/lipofectin complex were compared. The maximum efficiency was exhibited by ternary complex DNA/PEI/polyanion where a 1 : 1 mixture of PA and PA–PEG was used as polyanion. Possible reasons for this effect and further ways of optimization of mixtures for expression of plasmid DNA in the context of the new approach are discussed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

**Key words:** polyethyleneglycol, polyethyleneimine, polyacrylic acid, DNA condensation, DNA delivery, transfection