



УДК 547.964.4:678.745.2

ДЕНДРИМЕРЫ НА ОСНОВЕ ЛИЗИНА И ИХ “ЗВЕЗДООБРАЗНЫЕ” ПОЛИМЕРНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ: ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ КОМПАКТИЗАЦИИ ДНК И ДОСТАВКИ ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ *in vitro*

© 2004 г. Г. П. Власов**, В. И. Корольков*, Г. А. Панкова*, И. И. Тарасенко*,
А. Н. Баранов**, П. Б. Глазков**, А. В. Киселев**, О. В. Остапенко**,
Е. А. Лесина**, В. С. Баранов**

*Институт высокомолекулярных соединений РАН,
190004, Санкт-Петербург, Большой просп., 31;

**Институт акушерства и гинекологии РАМН им. Д. О. Отта,
Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 06.07.2002 г. Принята к печати 26.12.2002 г.

С целью поиска новых соединений, обеспечивающих эффективную доставку генных конструкций в клетки, нами получены два трехсферных дендримера на основе лизина, $(\text{Lys})_8-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_4-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_2-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})\text{-Ala-NH}_2$ (**D1**) и $(\text{Lys})_8-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_4-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_2-\alpha,\varepsilon\text{-Lys-Ala-[Lys(Plm)]}_2\text{-Ala-NH}_2$ (**D2**), а также “звездообразные” полимерные производные дендримера **D1**, $(\text{pVIm})_8\text{-D1}$ и $(\text{pLys})_n\text{-D1}$, содержащие односторонне связанные с аминогруппами дендримера поли(*N*-винилимидазолные) и полилизиновые цепи. Изучены условия образования комплексов дендримеров с молекулами плазмидной ДНК. Проведен анализ внутриклеточной локализации таких комплексов и экспрессии, доставленных с их помощью генных конструкций в экспериментах по трансфекции клеточных культур эпителиальной карциномы человека HeLa и мышечных миобластов C2C12. Обнаружено существенное влияние химического строения дендримера **D1** и его производных на структуру комплекса и его свойства.

Ключевые слова: дендримеры; полимерные конъюгаты; полилизин; поли(*N*-винилимидазол); ДНК, ретардация, трансфекция.

ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия – одно из быстро развивающихся направлений современной молекулярной медицины, подразумевает воздействие на медицинский статус и/или лечение болезни путем введения в организм нуклеиновых кислот [1]. Несмотря на масштабные исследования в данной области, проблема целевой доставки гена, обладающего терапевтическим эффектом, до настоящего времени не решена. Разработка подходов к лечению наследственных заболеваний, начавшаяся с попы-

ток использования вирусов в качестве носителей генов [2], в настоящее время смещается в сторону использования синтетических невирусных векторов [3]. Основным недостатком, осложняющим активное использование вирусных носителей в испытаниях на человеке, является выраженный иммунный ответ организма на неоднократное введение вирусных конструкций и опасность интоксикации продуктами его распада [4, 5]. Для решения проблем невирусной доставки нуклеиновых кислот в настоящее время используют физические, химические и биологические подходы. Хорошо известно, что используемый носитель должен обеспечивать компактизацию ДНК, ее проникновение в клетки мишени, предотвращать деградацию ДНК нуклеазами крови и лизосомными ферментами клетки и обеспечивать ядерную транслокацию. При этом система доставки должна быть нетоксичной и неиммуногенной, а входящие в ее состав компоненты должны быть биосовместимыми и биodeградируемыми [6].

Среди разнообразных подходов к созданию векторов невирусной доставки ДНК в последние

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; Bio-16-dUTP – 2-дезоксидеокси-5-[3-[ε-(γ-биотиниламинобутириламинокапроил)аминоаллил]]-уридин-5'-трифосфат; DABCO – диазобисциклооктан; DAPI – 4,6-диамино-фенилидон; DIC – диизопропилкарбодиимид; FITC – флюоресцеинизотиоцианат; HOBt – гидроксисбензтриазол; pLys – линейный полилизин; α,ε-Lys – остаток лизина, замещенный по α- и ε-аминогруппам; pVIm – поли(*N*-винилимидазол); PAMAM – полиамидаминный дендример; Plm – остаток пальмитиновой кислоты; PBS – фосфатно-солевой буфер, pH 7.5; TNBS – 2,4,6-тринитробензолсерная кислота; X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид.

* Автор для переписки (тел.: (812) 323-10-50; эл. почта: gpvlasov@hq.macro.ru).

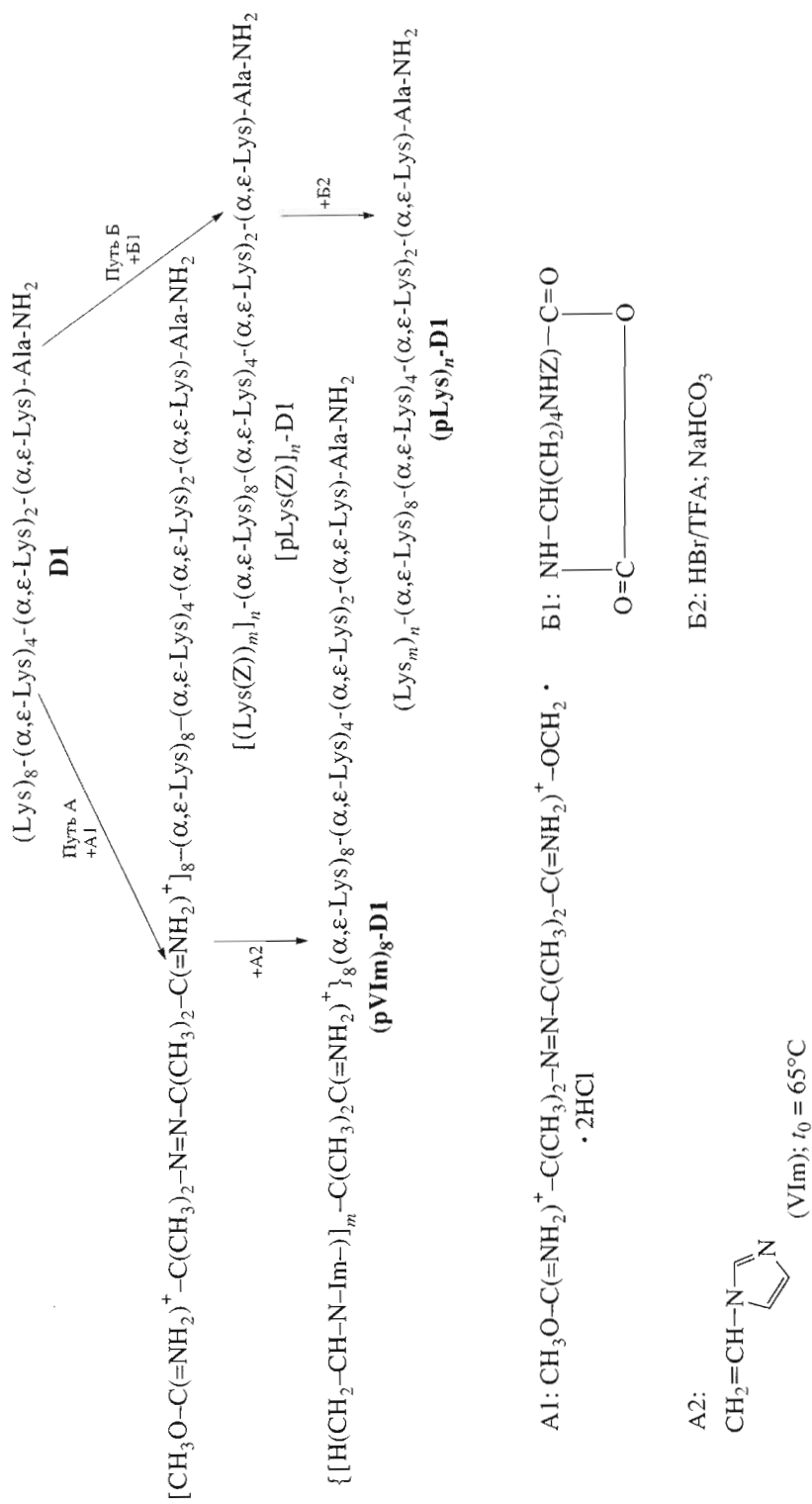


Схема. Синтез "звездообразных" полимерных производных дендримера D1.

Структура трехферного лизинового дендримера **D1**, его липофильного **D2** и “звездообразных” полимерных – $(pVIm)_8\text{-D1}$ - и $(pLys)_n\text{-D1}$ -производных

Структура дендримера или его производных	Сокращенное обозначение
$(Lys)_8-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})_4-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})_2-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})\text{-Ala-NH}_2$	D1
$(Lys)_8-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})_4-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})_2\text{-Lys-Ala-[Lys(Plm)]}_2\text{-Ala-NH}_2$	D2
$(pVIm)_8-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})_8-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})_4-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})_2-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})\text{-Ala-NH}_2$	$(pVIm)_8\text{-D1}$
$(pLys)_n-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})_8-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})_4-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})_2-(\alpha,\epsilon\text{-Lys})\text{-Ala-NH}_2$	$(pLys)_n\text{-D1}$

го бромистого водорода в трифторуксусной кислоте и последующей лиофилизации был получен полилизиновый конъюгат дендримера **D1**, в котором полилизиновые цепи связаны с α - и ϵ -аминогруппами лизина третьей сферы дендримера **D1** амидной связью своими C-концами. Аминокислотный анализ полилизинового производного **D1** показал, что в дендример **D1** дополнительно введено 157 остатков лизина, что соответствует молекулярной массе полилизинового производного дендримера **D1** 22 кДа и средней степени полимеризации привитых полилизиновых цепей (m), равной 10.

Структура трехферного лизинового дендримера **D1** и его N- и C-производных представлена в таблице.

Биологическое тестирование дендримерных носителей. В ходе экспериментов по изучению свойств синтезированных дендримеров исследовались условия образования комплексов дендримеров с плазмидной ДНК, особенности внутриклеточной локализации комплексов после трансфекции *in vitro*, а также эффективность трансфекции клеточных линий HeLa и C2C12 при различных соотношениях ДНК/носитель.

Образование комплексов дендримеров с плазмидной ДНК. Особенности связывания синтезированных соединений с плазмидной ДНК изучали методом агарозного гель-электрофореза (гель-ретардации) [21] по изменению электрофоретической подвижности плазмиды в агарозном геле после предварительного образования в течение 1 ч

комплекса ДНК с носителем. В каждую из лунок вносили равное количество (1.0 мкг) ДНК и различное (по весу) количество ДНК-связывающего носителя (рис. 1–4). Визуализация свободной ДНК и ДНК в комплексе с носителями осуществляли с помощью флуоресцентного интеркалирующего красителя – этидиумбромид.

Как следует из полученных данных, эффективное связывание молекул плазмидной ДНК с дендримером **D1** происходит при весовых соотношениях ДНК : носитель 1 : 1 (рис. 1, дорожка 4). О начале процесса комплексообразования свидетельствует исчезновение характерных для интактной плазмидной ДНК свободных конформационных изоформ (рис. 1, дорожка 1) и образование гетерогенных по заряду комплексов (рис. 1, дорожки 2, 3). Следует отметить, что при увеличении концентрации носителя, свечение комплексов в лунках 5–9 оставалось практически неизменным для комплекса – с возрастанием концентрации носителя не отмечалось эффекта затухания флуоресценции интеркалирующего красителя. Отсутствие разницы в свечении комплексов в лунках геля при возрастании концентрации дендримера может косвенно свидетельствовать о том, что образующиеся комплексы ДНК–**D1** являются в достаточной степени “рыхлыми”.

Особенности комплексов ДНК с дендримером **D2**, содержащим на карбоксильном конце два остатка лизина, модифицированных липофильными пальмитоильными фрагментами, приведены на рис. 2. Как и для дендримера **D1**, полное связывание плазмиды происходит при весовом соотношении ДНК : **D2**, равном 1 : 1 (дорожка 4). Суще-

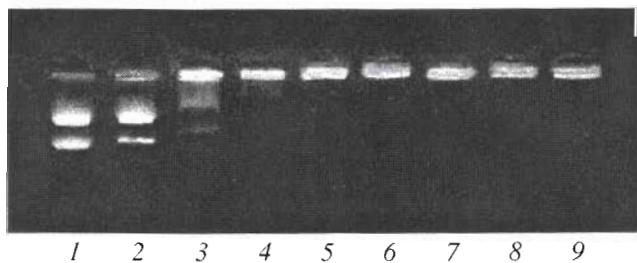


Рис. 1. Образование комплексов плазмидная ДНК–**D1** при соотношении ДНК : **D1** 1 : 0.1 (2); 1 : 0.5 (3); 1 : 1 (4); 1 : 2 (5); 1 : 4 (6); 1 : 6 (7); 1 : 8 (8); 1 : 10 (9). Здесь и на рис. 2–4 дорожка 1 – свободная (“несвязанная”) плазмидная ДНК.

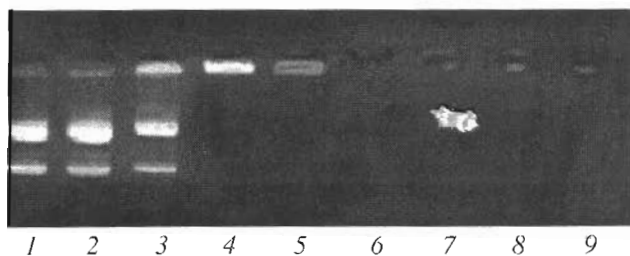


Рис. 2. Образование комплексов плазмидная ДНК–**D2** при соотношении ДНК : **D2** 1 : 0.1 (2); 1 : 0.5 (3); 1 : 1 (4); 1 : 2 (5); 1 : 4 (6); 1 : 6 (7); 1 : 8 (8); 1 : 10 (9).

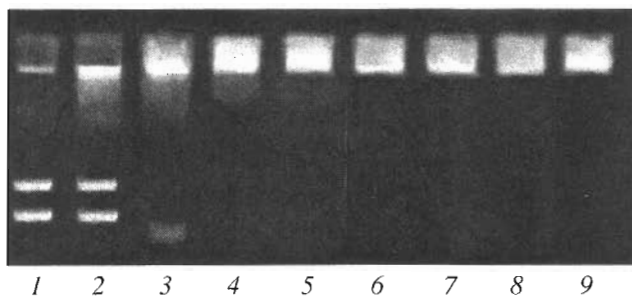


Рис. 3. Образование комплексов плазмидная ДНК–(pVIm)₈-D1 при соотношении ДНК : (pVIm)₈-D1 1 : : 0.1 (2); 1 : 0.5 (3); 1 : 1 (4); 1 : 2 (5); 1 : 4 (6); 1 : 6 (7); 1 : : 8 (8); 1 : 10 (9).

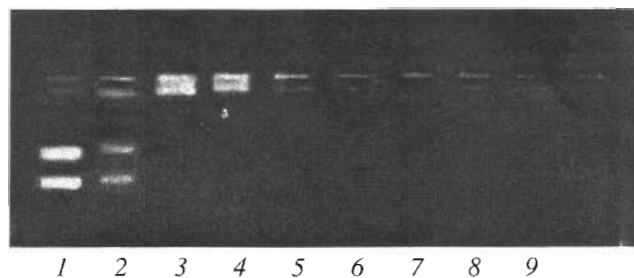


Рис. 4. Образование комплексов плазмидная ДНК–(pLys)_n-D1 при соотношении ДНК : (pLys)_n-D1 1 : 0.1 (2); 1 : 0.5 (3); 1 : 1 (4); 1 : 2 (5); 1 : 4 (6); 1 : 6 (7); 1 : 8 (8); 1 : 10 (9).

ственным отличием комплексов с дендримером D2 от комплекса с дендримером D1 служит увеличение плотности возникающих комплексов при увеличении концентрации дендримера D2, о чем свидетельствует почти полное (дорожка 5) и практически полное (дорожки 6–9) исчезновение в лунках геля свечения бромистого этидия. Подобный эффект ранее был описан для некоторых других носителей ДНК [21].

Для “звездообразного” поли(N-винилимидазольного) производного дендримера D1 показано (рис. 3), что образование комплексов с ДНК происходит при тех же весовых соотношениях как и для дендримера D1 (рис. 1), и при этом также отмечается достаточно “рыхлая” структура комплексов.

Для комплексов “звездообразного” полилизинового производного D1 с ДНК найдено, что полное связывание ДНК происходит при соотношении компонентов комплекса 1 : 0.5 – 1 : 1 (рис. 4, дорожки 3, 4). При увеличении концентрации носителя комплекс уплотняется (дорожка 5) и становится плотным (дорожки 6–9), не допуская интеркаляции красителя, как это было найдено для комплекса ДНК–D2 (рис. 2).

Учитывая то, что полное связывание плазмидной ДНК дендримером D1 и его производными отмечается уже при соотношении 1 : 1, именно это соотношение использовано нами в дальнейших экспериментах.

Изучение особенностей внутриклеточной локализации комплексов плазмидной ДНК с дендримером после трансфекции *in vitro*. Анализ внутриклеточной локализации комплексов ДНК–дендример проводили на культуре клеток линии HeLa. На рис. 5 представлены микрофотографии клеток через 24 ч после трансфекции комплексами плазмиды pCMV-nlsLacZ, к которой добавлена плазмидная ДНК, меченная Bio-16-dUTP, с D1 (рис. 5а), D2 (рис. 5б) и (pVIm)₈-D1 (рис. 5в). Локализацию комплексов в клетках определяли по характерной желто-зеленой флуоресценции.

Из полученных данных следует, что синтезированные носители обеспечивают высокую и эффективную доставку генов в клетки. В экспериментах с дендримером D1 и его производными специфичный флуоресцентный сигнал наблюдается в 100% клеток (рис. 5а–в). Аналогичные данные для полилизинового производного D1 не приведены. В контрольных образцах флуоресцентный сигнал не наблюдался (рис. 5г). Следует отметить, что эффективность проникновения в клетку комплексов с дендримером D2 оказалась значительно выше, чем с дендримером D1 (ср. рис. 5а, б). Подобный подход к оптимизации трансфекции за счет введения липофильных фрагментов описан для ряда других ДНК-переносящих образований, например, для катионных олигопептидов [22]. Возрастание трансфекции в случае D2 по сравнению с D1 может быть объяснено тенденцией более гидрофобных соединений дополнительно компактизировать ДНК и обеспечивать более оптимальное взаимодействие с мембранами клеток. Из особенностей внутриклеточной локализации было отмечено, что комплексы с дендримером D1 и его производными преимущественно располагаются в перинуклеарном пространстве цитоплазмы (рис. 5а–в).

Эффективность трансфекции и экспрессии бактериальной β-галактозидазы комплексами различных клеточных линий была определена в опытах *in vitro* на примере клеточных линий HeLa и C2C12 и комплексов с маркерным геном pCMV-nlsLacZ с дендримерами D1 и D2 в весовых соотношениях ДНК : дендример, равным 1 : 0.5 и 1 : 1. Экспрессию бактериальной β-галактозидазы в клетках анализировали через 1 и 5 сут после введения комплексов.

Экспрессия бактериальной β-галактозидазы в клетках HeLa и C2C12 практически отсутствовала при доставке гена LacZ в комплексе с дендримером D1 (данные не приведены). При экспозиции 24 ч и соотношениях ДНК–дендример D1 1 : 0.5 и 1 : 1 в обеих культурах клеток выявлялись лишь

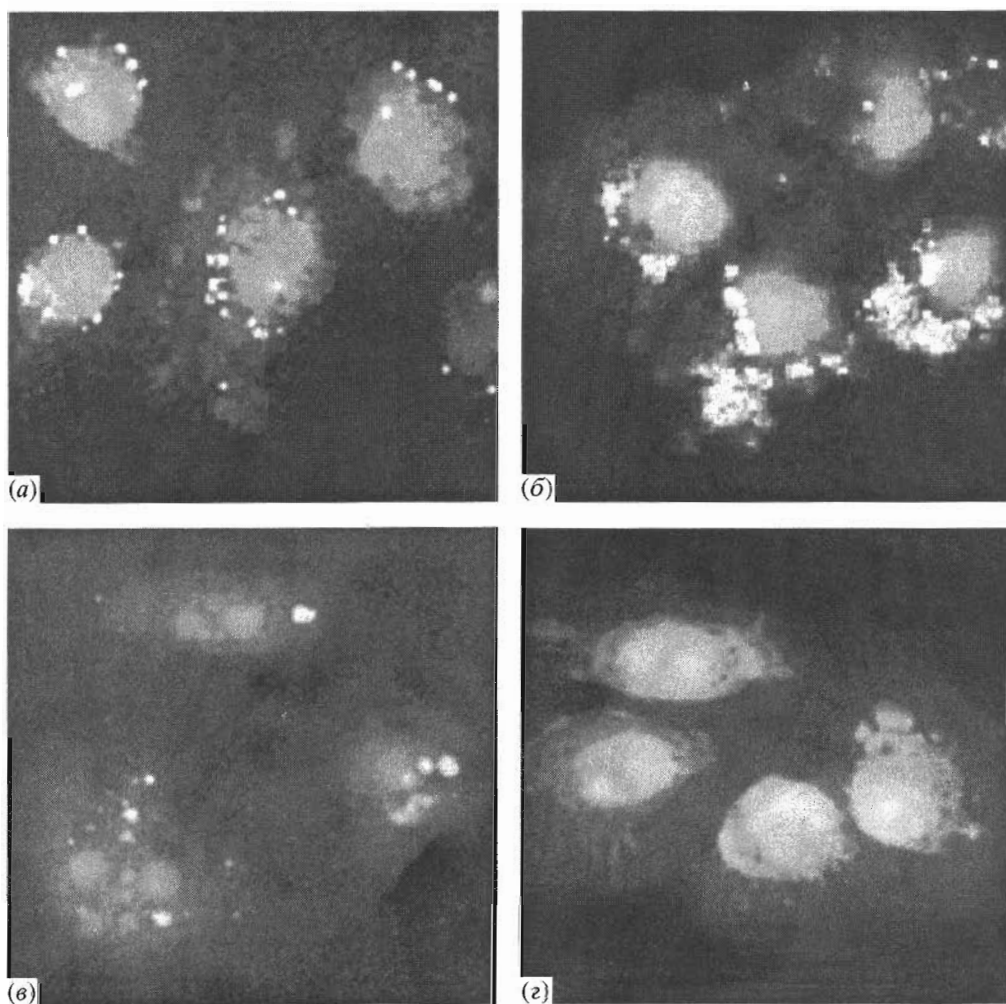


Рис. 5. Анализ внутриклеточной локализации комплексов плазмидной ДНК и дендримеров **D1** (а), **D2** (б) и $(pVim)_n$ -**D1** (в) через 24 ч после трансфекции клеток эпителиальной карциномы HeLa, интактные клетки HeLa (z). Ядра клеток контрастированы красителем пропидий иодидом. Увеличение $\times 1600$.

отдельные положительно окрашенные клетки. Вместе с тем экспрессия маркерного белка была обнаружена в обеих исследованных клеточных культурах при трансфекции с использованием дендримера **D2**. На рис. 6а в качестве примера представлены данные по экспрессии бактериальной β -галактозидазы в клетках HeLa. При введении гена *pCMV-nlsLacZ*, не связанного с носителем, экспрессии бактериальной β -галактозидазы в клетках HeLa выявлено не было (рис. 6б). Как следует из представленных на рис. 7 данных для дендримера **D2**, число клеток экспрессировавших β -галактозидазу было достаточно низким для клеток линии C2C12. На планшетах регистрировались единичные миобласты с положительной окраской на β -галактозидазу. Эффективность экспрессии возрастала у клеток эпителиальной карциномы HeLa. Так, через 5 сут после введения комплексов ДНК–**D2** в соотношении 1 : 0.5 регистрировалось около 50 положительно окрашенных клеток на

планшет и порядка 135 клеток в случае соотношения ДНК–**D2** 1 : 1, что составляет около 0.2–0.5% клеток на планшет. Предварительные данные, полученные в результате оптимизации структуры комплекса плазида–**D2** введением в него после формирования комплекса дополнительно нонадекапептида JTS1 (H-Gly-Leu-Phe-Glu-Ala-Lei-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Ser-Leu-Trp-Glu-Leu-Leu-Glu-Ala-OH), способного разрушать эндосомы и увеличивать трансфекцию комплексов ДНК с поликатионами [23], показали возможность повышения экспрессии галактозидазы до 25%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований синтезирован трехферный дендример на основе *L*-лизина и три его производных, один из которых, **D2**, содержал на карбоксильном конце два остатка лизина, модифицированных липофиль-

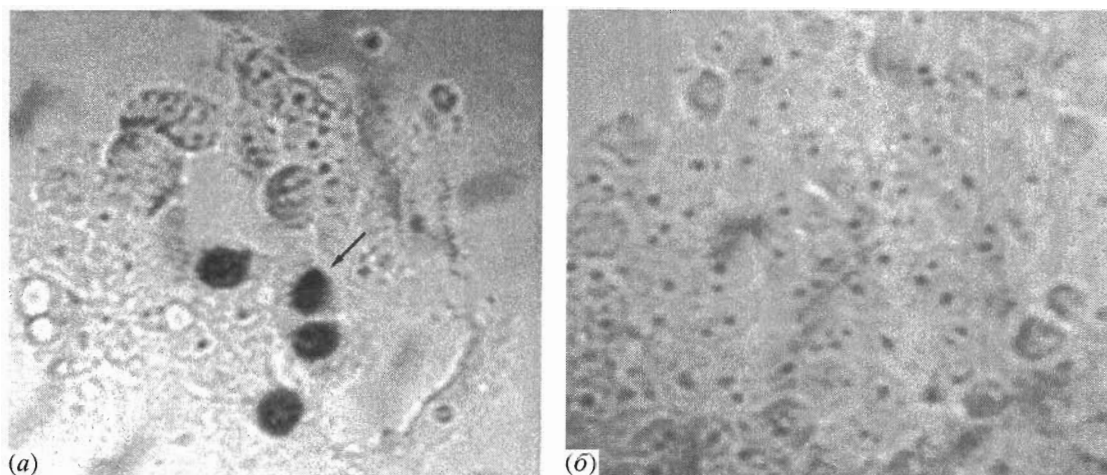


Рис. 6. Иммуноцитохимическое выявление активности β -галактозидазы через 5 сут после введения в культуру клеток HeLa комплексов pCMV-nlsLacZ/D2 (а) и “голой” плазмиды pCMV-nlsLacZ (б). Увеличение $\times 200$. Ядра клеток с положительной окраской на β -галактозидазу указаны стрелкой.

ными пальмитоильными радикалами, а два других – на аминогруппах дендримера D1 поли(*N*-винилимидазольные) и полилизиновые цепи, пришитые одноточечно одним своим концом к дендримеру D1. При изучении комплексообразования полученных соединений с плазмидной ДНК найдено, что дендримеры на основе *L*-лизина могут быть использованы для связывания и компактизации ДНК. Дендример на основе лизина и его производные дают устойчивые комплексы с ДНК уже при соотношениях ДНК–дендример, равных 1 : 1. Найдено, что дендример D2, содержащий липофильные фрагменты, как и дендример, содержащий привитые полилизиновые фрагменты (pLys-D1), при увеличении их концентрации обеспечивает образование более плотных комплексов, предотвращающих интеркалирование этидиумбромида – красителя, использованного для выявления ДНК. Дендример D2 обеспечивает также более высокий уровень трансфекции и превосходит дендример D1 по эффективности экспрессии маркерного гена *LacZ* в экспериментах по трансфекции клеток эукариот *in vitro*. Эффективность трансфекции в условиях использования комплексов ДНК–D2 в значительной степени зависела от их структуры и типа клеточной линии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали аминокислоты (*L*-лизин, *L*-аланин), диизопропилкарбодиимид, трифторуксусную кислоту, трифторметансульфокислоту, тиоанизол, этандитиол, гидроксибензтриазол, *N*-винилимидазол, трифосген, *N*^ε-бензилоксикарбонил-*L*-лизин производства Fluka (ФРГ), 5-бром-4-

хлор-3-индолил-*D*-галактопиранозил (Sigma, США), Bio-16-dUTP (Boehringer Mannheim, ФРГ), конъюгат Авидин-FITC (Vector, США), йодистый пропиций (Sigma, США). Растворители, использованные в работе, были получены из ОАО Вектон (Санкт-Петербург) и очищены перед использованием.

Оборудование. Дендримеры синтезировали на полуавтоматическом пептидном синтезаторе NPS 4000 (Neosystem, Франция). Для анализа продуктов использовали обращенно-фазовую ВЭЖХ на приборе Waters 620 (США). Аминокислотный анализ проводили на анализаторе ААА Т339 М (Microtechna, Прага, Чехословакия). Анализ кле-



Рис. 7. Число клеток HeLa и C2C12, экспрессирующих β -галактозидазу через 5 сут после трансфекции комплексами с различными соотношениями ДНК конструкции и носителя – дендримера D2.

ток проводили с использованием микроскопов Leica и Opton Axioscop (ФРГ).

Синтез дендримерных носителей ДНК

Трехсферный лизинный дендример (D1) и его дипальмитоильное производное (D2)

Синтез дендримеров на основе лизина проводили с использованием полимерного носителя – *para*-метилбензгидриламинной смолы (Neosystem Laboratoires, Франция) с применением Вос-стратегии, DIC/HOBt в качестве конденсирующей смеси и трифторуксусной кислоты на стадии деблокирования. В синтезе на 1 г *para*-метилбензгидриламинной смолы (емкость 0.5 ммоль/г) использовали следующий протокол: (1) деблокирование, 70% TFA/CH₂Cl₂ (10 мл), 15 мин; (2) промывка, CH₂Cl₂ (10 мл × 2), DMF (10 мл × 2); (3) депротонирование, 10% Et₃N/DMF (10 мл × 2); (4) промывка, DMF (10 мл × 2); (5) конденсация, Вос-аминокислота (1.5 мМ), DIC (15 мМ), HOBt (1.5 мМ)/DMF (10 мл); (6) промывка, DMF (10 мл × 2), CH₂Cl₂ (10 мл × 2); нингидриновый тест. При неполной конденсации (наличие положительной нингидринной реакции) протокол повторяли с этапа (3).

Полное деблокирование и снятие дендримера с полимера проводили с использованием трифторметансульфокислоты (1 мл) в TFA (10 мл) в присутствии 1 мл тиоанизола и 0.5 мл этандитиола в течение 1 ч при 0°C и 1.5 ч при комнатной температуре. Смесь разбавили этиловым эфиром (30 мл), фильтровали. Дендример растворили в 30 мл трифторуксусной кислоты, фильтровали для удаления смолы и высаживали в 300 мл сухого эфира. Очистку дендримеров проводили методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-10 в 10% уксусной кислоте. Соответствующие фракции лиофилизировали. Продукт анализировали с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Waters 620 (США). Аминокислотный анализ показал соотношение Lys–Ala 15.3 : 1, что близко к расчетному (15 : 1) для D1 и 16 : 1, что близко к расчетному (17 : 1) для D2. Структура полученного дендримера D1 и его дипальмитоильного производного D2 приведена в таблице.

Поли(*N*-винилимидазольный) конъюгат дендримера D1

2,2'-Азобисизобутирил-D1 (макроинициатор) получали по аналогии с методикой [18]. К 5 мл 0.5% раствора дендримера D1 в 0.1 М натрий-боратном буфере (рН 9.6) при +4°C прибавили 0.27 г дихлоргидрата диметилимидата 2,2'-азобисизомаляной кислоты (10 моль имидата на 1 аминокислотную группу) в 1 мл 2 М NaOH. Смесь перемешивали 2 ч, поддерживая рН 10 с помощью 2 М NaOH, и выдерживали при +4°C 18 ч. Реакционную смесь хроматографировали на колонке с сефадексом

G-10 (2.5 × 50 см), используя в качестве элюента разбавленную уксусную кислоту (рН 5). После лиофилизации выход составил 21.5 мг. Количество остатков 2,2'-азобисизомаляной кислоты, введенных в дендример D1, определяли титрованием свободных аминокислотных групп TNBS [24]. Было введено восемь остатков 2,2'-азобисизомаляной кислоты.

(pVIm)₈-D1. К 20 мг 2,2'-азобисизобутирил-D1, растворенного в 5 мл 0.1 М натрий-фосфатного буфера (рН 7.7), добавили 1 мл *N*-винилимидазола (отношение VIm–2,2'-азобисизобутирил-D1 300 : 1) и выдерживали в атмосфере аргона в ампуле в течение 3 ч при 65°C. Реакционную смесь диализовали против воды 24 ч. После лиофилизации выход конъюгата составил 24 мг. Молекулярная масса поли(*N*-винилимидазол)-D1, определенная на колонке с сефадексом G-150 (2.0 × 70 см), калиброванной белками (β-амилазой, церулоплазмином, бычьим сывороточным альбумином, овальбумином, трипсином), составила 80 кДа, что соответствует средней степени полимеризации каждой из восьми привитых к аминокислотным группам дендримера D1 поли(*N*-винилимидазольных) цепей, равной 125.

Полилизинный конъюгат дендримера D1

p[Lys(N^ε-Z)]_n-D1. К раствору 40 мг дендримера D1 в 19 мл диметилацетамида прибавили 760 мг N^α-карбоксингидрида N^ε-бензилоксикарбониллизина, полученного по методу [7]. Полимеризацию проводили в течение 10 сут при +40°C. Полученный раствор высаживали в 100 мл сухого серного эфира, промывали эфиром 3 раза и метанолом один раз. Выход поли(N^ε-бензилоксикарбониллизин)-D1 составил 480 мг.

(pLys)_n-D1. Через раствор 480 мг поли(N^ε-бензилоксикарбонил)-D1 в 25 мл сухого хлороформа пропускали в течение 45 мин газообразный HBr. Через несколько минут после начала деблокирования полимер выпадает в осадок. После прекращения пропуска HBr смесь перемешивали дополнительно 1.5 ч. Избыток HBr удаляли током азота. Полимер фильтровали и растворяли в 30 мл насыщенного бикарбоната натрия. Водный раствор экстрагировали два раза 25 мл серного эфира, подкисляли соляной кислотой до рН 3, диализовали в течение 16 ч против 0.01 М HCl и лиофилизировали. Получено 157 мг бромгидрата полилизинного производного дендримера D1. Аминокислотный анализ показал соотношение Lys : Ala = 172, что соответствует молекулярной массе полилизинного производного дендримера D1 22 кДа и средней степени полимеризации привитых полилизинных цепей 10.

Биологическое тестирование носителей

Генетическая конструкция. В работе была использована плазмидная ДНК-конструкция рCMV-nlsLacZ, содержащая маркерный ген бактериальной β -галактозидазы, модифицированный сигналом ядерной транслокации, предоставленная Б. Шольте из Университета г. Роттердама (Голландия).

Препаративное выделение плазмидной ДНК проводили по стандартной методике щелочного лизиса с последующей двукратной очисткой ДНК в градиенте плотности хлористого цезия [25].

Клеточные линии. Эксперименты по трансфекции выполняли на клеточных культурах эпителиальной карциномы человека HeLa и мышечных скелетных миобластов C2C12 (коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Культивирование осуществляли на среде RPMI, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотики пенициллин и стрептомицин в концентрации 100 ед./мл.

Сборка комплексов дендример-рCMV-nlsLacZ. К серии проб, содержащих различные количества дендримера (0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 мкг), растворенного в 20 мкл дистиллированной воды, добавляли 1 мкг плазмидной ДНК в 20 мкл дистиллированной воды. После часовой инкубации анализировали образование комплексов методом ретардации – по уменьшению электрофоретической подвижности ДНК в 0.8% агарозном геле [21].

Изучение эффективности доставки и внутриклеточной локализации комплексов дендримеров и плазмидной ДНК *in vitro*. Внутриклеточную локализацию ДНК анализировали с использованием комплексов дендримеров с ДНК, предварительно биотинилированной с помощью Bio-16-dUTP плазмидной ДНК. В культуральные планшеты, содержащие около 30 000 клеток, добавляли 100 мкл раствора комплексов, содержащих 2 мкг плазмидной ДНК. Инкубацию комплексов с клетками проводили в течение 24 ч при +37°C в CO₂-инкубаторе. По окончании трансфекции планшеты с клетками дважды промывали культуральной средой и один раз раствором PBS, фиксировали в трех сменах охлажденного до –20°C фиксатора (метанол-ацетон 1 : 1, 10 мин в каждой смене), промывали PBS, инкубировали клетки в блокирующем растворе (3% BSA в PBS) 20 мин при комнатной температуре. Блокирующий раствор сливали и в планшеты, добавляли раствор конъюгата Авидин-FITC (Vector, США) в концентрации 5 мкг/мл на PBS/3% BSA. Планшеты инкубировали 30 мин при 37°C во влажной камере, отмывали в трех сменах PBS, в дистиллированной воде, высушивали и заключали под покровные стекла в фотозащитный раствор (90% глицерин/PBS), содержащий йодистый пропидий (0.5–1.0 мкг/мл), 2.5% DABCO и DAPI (0.5 мкг/мл). Анализ внутри-

клеточной локализации комплексов дендример-ДНК проводили с помощью флуоресцентных микроскопов Leica и Opton Axioscop (блоки световых фильтров для FITC, DAPI и йодистого пропидия) при увеличении от $\times 200$ до $\times 2000$.

Оценка эффективности трансфекции комплексами дендример-рCMV-nlsLacZ. Для каждого дендримерного носителя было проведено сравнение эффективности трансфекции комплексов с рCMV-nlsLacZ, различающихся по соотношению плазмидная ДНК/носитель. В планшеты с клеточными линиями, содержащими порядка 30000 клеток в 2 мл культуральной среды, добавляли 5 мкг (в пересчете на дозу по ДНК) комплексов, растворенных в 100 мкл культуральной среды RPMI. Смесь перемешивали, и планшеты с клетками выдерживали при 37°C в CO₂-инкубаторе. Через 24 или 72 ч клетки промывали культуральной средой, затем PBS (pH 7.5), фиксировали в 0.5% растворе глутарового альдегида в PBS, после чего инкубировали 16 ч в растворе реагента X-gal, содержащего 2 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид, 5 мМ K₃[Fe(CN)₆], 5 мМ K₄[Fe(CN)₆], 2 мМ MgCl₂ в PBS. Затем планшеты промывали в растворе PBS, заключали в глицерин и анализировали на световом микроскопе Opton. Наличие β -галактозидазы в ядрах клеток определяли по специфическому синему окрашиванию. Критерием эффективности трансфекции комплексов дендримеров и генетической конструкции рCMV-nlsLacZ являлась доля клеток, экспрессирующих бактериальную β -галактозидазу.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают свою признательность И.А. Гурьянову (ИВС РАН) за предоставление синтетического нонадекапептида JTS1. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант “Научные школы РФ” № 00-15-97318), гранта РФФИ (№ 02-04-49329) и федеральной целевой научно-технической программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники”, программы CDRF (проект: Молекулярно-биологические основы здоровья человека и окружающей среды Северо-Западного региона России).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kay M., Liu D., Hoogerbrugge P.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 12744–12746.
2. Wilson J.M. // N. Engl. J. Med. 1995. V. 334. P. 1185–1187.
3. Li S., Huang L. // Gene Ther. 2000. V. 7. P. 31–34.
4. Smaglik P. // The Scientist. 1999. V. 12. P. 1–3.
5. Smaglik P. // The Scientist. 1999. V. 13. P. 9–11.
6. Morris M.C., Chaloin L., Heitz F., Davita G. // Current Opinion in Biotechnol. 2000. V. 11. P. 461–468.

7. Newkome G.R., Moorefield C.N., Vogtle F. *Dendritic Molecules (Concepts, Synthesis, Perspectives)*. Wienheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH, 1996.
8. Kukowska-Latallo J.F., Bielinska A.U., Johnson J., Spindler R., Tomalia D.A., Baker J.R., Jr. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 4897–4902.
9. Boletta A., Benigni A., Lutz J., Remuzzi G., Soria M. R., Monaco L. // *Hum. Gene Ther.* 1997. V. 8. P. 1243–1251.
10. Malik N., Wiwattanapatapee R., Klopsch R., Lorenz K., Frey H., Weener J.W., Meijer E.W., Paulus W., Duncan R. // *J. Contr. Rel.* 2000. V. 65. P. 133–148.
11. Ohsaki M., Okuda T., Wada A., Hirayama T., Niidome T., Aoyagi H. // *Bioconjug. Chem.* 2002. V. 13. P. 510–517.
12. Tam J.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 5409.
13. Vlasov G.P., Illarionova N.G., Izvarina N.L., Denisov I.G. // *Macromol. Chem. Suppl.* 1985. V. 9. P. 239–249.
14. Власов Г.П., Никонова И.Н., Илларионова Н.Г. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 1981. Т. 17. С. 494–499.
15. Власов Г.П., Изварина Н.Л., Илларионова Н.Г. // *Биохимия*. 1981. Т. 46. С. 942–950.
16. Власов Г.П., Никонова И.Н., Илларионова Н.Г., Денисов И.Г. // *Приклад. биохимия и микробиология*. 1987. Т. 23. С. 600–606.
17. Власов Г.П., Изварина Н.Л., Илларионова Н. Г., Денисов И.Г., Мальшев Д.А. // *Приклад. биохимия и микробиология*. 1988. Т. 24. С. 56–61.
18. Власов Г.П., Панкова Г.А., Никонова И.Н., Антонов Н.Г. // *Биоорганич. химия*. 2003. Т. 29. С. 38–48.
19. Nureddin A., Inagami T. // *Biochem. J.* 1975. V. 147. P. 71–78.
20. Glaser A.N., Bar-Eli A., Katchalski E. // *J. Biol. Chem.* 1962. V. 237. P. 1832–1838.
21. Niidome T., Takai K., Urakawa M., Ohmori N., Wada A., Hirayama T., Aoyagi H. // *Bioconjug. Chem.* 1999. V. 10. P. 773–780.
22. Niidome T., Urakawa M., Takai K., Matsuo Y., Ohmori N., Wada A., Hirayama T., Aoyagi H. // *J. Peptide Res.* 1999. V. 54. P. 361–367.
23. Gottshalk S., Sparrow J.T., Hauer J., Mims M.P., Leland F.E., Woo S.L.C., Smith L.C. // *Gene Therapy*. 1996. V. 3. P. 448–457.
24. Satake K., Okuyama T., Ohashi M., Shimoda T. // *J. Biochem. (Japan)*. 1960. V. 47. P. 654–660.
25. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, N.Y.; Gold Spring Harbor Lab. Press, 1989.

Lysine Dendrimers and Their Starburst Polymer Derivatives: Possible Application for DNA Compaction and *in vitro* Delivery of Genetic Constructs

G. P. Vlasov*[#], V. I. Korol'kov*, G. A. Pankova*, I. I. Tarasenko*, A. N. Baranov,
P. B. Glazkov**, A. V. Kiselev**, O. V. Ostapenko**, E. A. Lesina**, and V. S. Baranov****

[#] Phone: +7 (812) 323-1050; e-mail: gpvlasov@hq.macro.ru

* Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Bolshoi pr. 31,
St. Petersburg, 199004 Russia

** Ott Institute of Obstetrics and Gynecology, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia

We attempted to find some compounds for the effective delivery of gene constructs into cells and obtained two trispherical dendrimers on the basis of lysine, (Lys)₈-(α,ε-Lys)₄-(α,ε-Lys)₂-(α,ε-Lys)-Ala-NH₂ (**D1**) and (Lys)₈-(α,ε-Lys)₄-(α,ε-Lys)₂-(α,ε-Lys)-Ala-[Lys(Plm)]₂-Ala-NH₂ (**D2**), as well as the starburst polymeric derivatives of **D1**, (pVIm)₈-**D1** and (pLys)_n-**D1**, containing poly(*N*-vinylimidazole) and polylysine chains bound at a single point to the dendrimer amino groups. The conditions of dendrimer–plasmid DNA complex formation were studied. The intracellular localization of these complexes and the expression of gene constructs delivered with their help were analyzed in transfection experiments on the HeLa cell cultures of human epithelial carcinoma and on C2C12 mouse myoblasts. It was found that the chemical structure of dendrimer **D1** and its derivatives significantly affected the structure and properties of complex. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: dendrimers; DNA, retardation, transfection; polylysine; poly(*N*-vinylimidazole); polymer conjugates