



УДК 547.964:678.745.2

## ОПТИМИЗАЦИЯ ТРАНСФИЦИРУЮЩИХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСОВ ДНК С ЛИЗИНОВЫМИ ДЕНДРИМЕРАМИ

© 2005 г. Г. П. Власов<sup>\*#</sup>, Е. А. Лесина<sup>\*\*</sup>, В. И. Корольков<sup>\*</sup>, И. А. Гурьянов<sup>\*</sup>, Н. В. Баянова<sup>\*</sup>, А. Н. Баранов<sup>\*\*</sup>, А. В. Киселев<sup>\*\*</sup>, В. С. Баранов<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004, Санкт-Петербург, Большой просп., 31;

<sup>\*\*</sup>Институт акушерства и гинекологии РАМН им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 29.01.2004 г. Принята к печати 07.04.2004 г.

Проведен поиск возможности оптимизации ДНК-трансфицирующих свойств носителей на основе лизиновых дендримеров третьей и пятой генерации, в том числе содержащих на С-конце хлорацетильный и липофильный пальмитоильный фрагменты. Найдено, что использование лизосоморазрушающего антибиотика хлорокина, так же как амфипатического полианионного нонадекапептида JTS-1, дает возможность усилить ДНК-трансфицирующие свойства лизиновых дендримеров. Показано, что тройной комплекс, состоящий из ДНК, лизинового дендримера третьей генерации, модифицированного по С-концу липофильными фрагментами пальмитиновой кислоты, и JTS-1, по своей трансфицирующей активности сопоставим с комплексом ДНК с коммерческим носителем на основе катионных липосом, Escor<sup>TM</sup>.

*Ключевые слова:* лизиновые дендримеры; пальмитиновая кислота, хлоруксусная кислота, ДНК, хлорокин, трансфекция.

### ВВЕДЕНИЕ

Среди разнообразных синтетических векторов невирусной доставки ДНК значительный интерес проявляется к разветвленным и сферическим макромолекулам – полиэтиленимину [1, 2], липосомам [3, 4] и дендримерам [5–10]. Дендримеры – синтетические макромолекулы, имеющие сферическую структуру, содержащие плотное ядро (core) и различные функциональные группировки на поверхности [11]. Учитывая перспективность использования аминокислотных дендримеров как биологически деградирующих и биологически совместимых носителей для доставки генных конструкций или противораковых биологически активных веществ в клетки млекопитающих, мы синтезировали ранее дендример третьей генерации на основе лизина (D1) и три его производных, содержащих на С-конце дендримера дополнительные липофильные N<sup>c</sup>-пальмитоиллизиновые

фрагменты (D2) (табл. 1) или на N-концевых аминогруппах привитые поли(N-винилимидазольные) или полилизиновые цепи [9]. В сериях экспериментов были определены условия образования комплексов синтезированных носителей с ДНК, исследованы особенности внутриклеточной локализации комплексов и получены предварительные данные об экспрессии генных конструкций после трансфекции *in vitro*. Однако уровень экспрессии гена даже с наиболее перспективным производным дендримера, содержащим на С-конце липофильные фрагменты, был невысок.

В данной работе мы сообщаем о возможности оптимизации трансфицирующих свойств лизиновых дендримеров в результате увеличения числа генераций дендримера до пяти или введения в систему, выбранную для трансфекции, дополнительных компонентов – лизосоморазрушающих соединений – антибиотика хлорокина или амфипатического полианионного нонадекапептида JTS-1.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Синтез дендримеров

Синтез лизиновых дендримеров третьей генерации описан ранее [9]. Получение лизинового дендримера пятой генерации D3 (табл. 1) и пептида JTS-1 (H-Gly-Leu-Phe-Glu-Ala-Leu-Leu-Glu-Leu-Leu-Glu-Ser-Leu-Trp-Glu-Leu-Leu-Glu-Ala-OH) мы проводили по аналогии с работой [9] на бензгидриламине полимерном носителе с при-

Сокращения: α,ε-Lys – разветвленный по α- и ε-аминогруппам остаток лизина; DABCO – диазабициклооктан; DAPI – 4,6-диаминофенилидон; DIC – диизопротилкарбодимид; DOTAP – 1,2-диолеоил-3-(триметиламино)пропан; DOPE – диолеоилфосфатидилэтаноламин; Escor<sup>TM</sup> – коммерческий липосомный носитель, состоящий из смеси DOTAP и DOPE в соотношении 3 : 1; HOBt – гидроксисбензотриазол; Palm – остаток пальмитиновой кислоты; TNBS – 2,4,6-тринитробензолсерная кислота; хлорокин – 4-(7-хлор-4-хинолинилиламино)пентилдиэтиламин; X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил-D-галактопиранозид.

<sup>#</sup>Автор для переписки (тел.: (812) 323-10-50; эл. почта: gpvlasov@hq.macro.ru).

**Таблица 1.** Структура и сокращенное обозначение лизиновых дендримеров третьей и пятой генерации, использованных в данной работе

Структура дендримера	Сокращенное обозначение
$(\text{Lys})_8-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_4-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_2-\alpha,\varepsilon\text{-Lys-Ala-NH}_2$	<b>D1</b>
$(\text{Lys})_8-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_4-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_2-\alpha,\varepsilon\text{-Lys-Ala-[Lys(Palm)]}_2\text{-Ala-NH}_2$	<b>D2</b>
$(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_{32}-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_{16}-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_8-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_4-(\alpha,\varepsilon\text{-Lys})_2-\alpha,\varepsilon\text{-Lys-Ala-Lys(Ac(Cl)^*)\text{-Ala-Ala-NH}_2$	<b>D3</b>

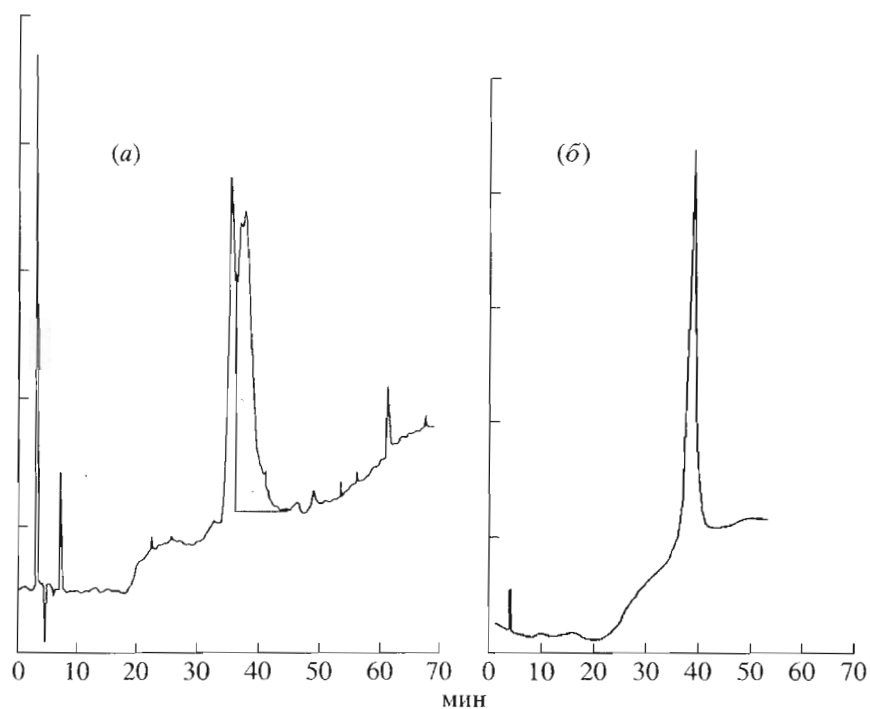
\* Хлорацетил.

менением Вос/TFA-стратегии и DIC/НОВt-смеси на стадии ацилирования, используя в качестве карбоксильного компонента  $N^\alpha,N^\varepsilon$ -ди(*трет*-бутилоксикарбонил)лизина. В *C*-конец дендримера был дополнительно введен остаток  $N^\varepsilon$ -хлорацетиллизина с целью создания возможности последующего использования хлорацетильной группы дендримера для связывания с пептидами, способными обеспечить целевую доставку комплекса в ядро клетки.

Полученный дендример пятой генерации и нонадекапептид JTS-1 на первом этапе были очищены с использованием метода гель-хроматографии на сефадексе G-10 с элюцией 10% уксусной кислотой. Далее препаративную очистку и анализ дендримера и пептида проводили с использованием оф-ВЭЖХ. На рис. 1 представлены аналитические данные для дендримера пятой генерации до

препаративной очистки (*a*) и после нее (*б*). Доказательство структуры дендримера **D3** пятой генерации осуществляли с помощью аминокислотного анализа и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР.

Как следует из данных  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (рис. 2 и табл. 2), структура **D3** соответствует ожидаемой. В спектре наблюдается четкое различие химических сдвигов для фрагментов лизина, расположенных на внешней сфере дендримера (внешних) и остатков лизина внутри дендримера (внутренних) с примерно одинаковым отношением величин интегралов. Ожидаемое число внутренних и внешних лизинов 32/32. Для *C*-концевого фрагмента дендримера –Ala–Lys(Ac(Cl))–Ala–Ala удалось зафиксировать слабые сигналы  $\text{CH}_3$ -групп аланина; сигналы хлорацетильной группы зарегистрировать не удалось в связи с их низким содержанием в образце.



**Рис. 1.** Аналитическая оф-ВЭЖХ дендримера **D3** до препаративного разделения (*a*) и после препаративного разделения (*б*). Условия хроматографии – элюция градиентом концентрации ацетонитрила (0 – 50% за 50 мин), содержащим 0.1% TFA; скорость 1 мл/мин, детектирование при  $\lambda$  230 нм.

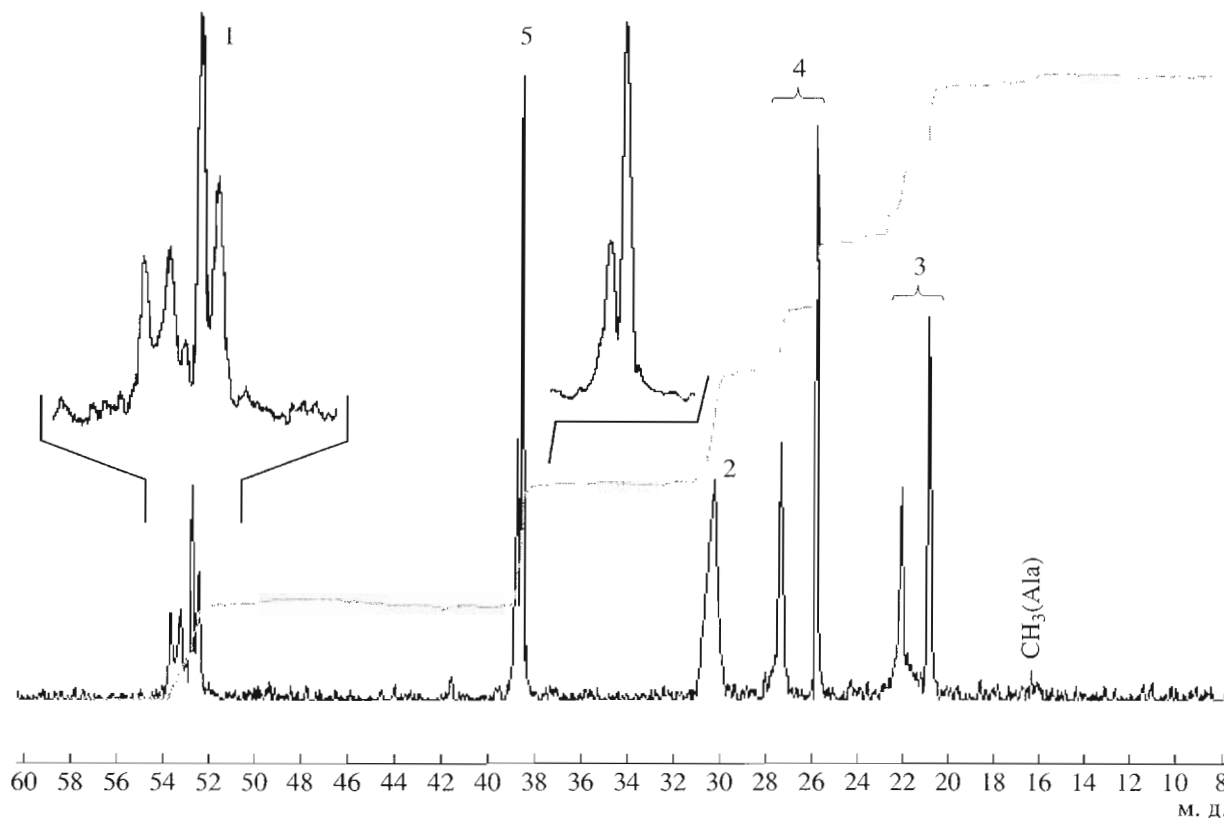


Рис. 2. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР лизинового дендримера пятой генерации **D3**. Цифры над пиками – отнесение к атомам углерода в соответствии с нумерацией в табл. 2.

#### Образование комплексов дендримеров с плазмидной ДНК

Особенности связывания синтезированных дендримерных носителей с плазмидной ДНК изучали методом агарозного гель-электрофореза (гель-ретардации) по аналогии с работой [9] по изменению электрофоретической подвижности плазмиды в агарозном геле после выдерживания в течение 1 ч комплекса ДНК с носителем (рис. 3). Ранее нами было показано [9], что эффективное связывание молекул плазмидной ДНК с дендримером **D1**, так же как и с дендримером **D2**, происходит при зарядовых соотношениях ДНК–носитель 1 : 1. Начало образования прочного комплекса дендримером **D3**, имеющим в С-концевом фрагменте остаток лизина, модифицированный по  $N^\epsilon$ -аминогруппе хлорацетильным фрагментом, наблюдается при соотношении ДНК–носитель равном 1 : 1, т. е. его поведение практически не отличается от поведения других трансферных дендримеров.

#### Эффективности трансфекции комплексов ДНК–носитель

Эффективность трансфекции, т. е. экспрессии бактериальной  $\beta$ -галактозидазы, комплексами,

содержащими в своем составе дендримеры **D1**, **D2** и **D3**, была определена на примере клеточных линий HeLa и HepG2 с маркерным геном *pCMV-nls-lacZ* и сопоставлена с эффективностью трансфекции при использовании коммерческого носителя Escort<sup>TM</sup> или в отсутствие носителя при использовании “голой” ДНК.

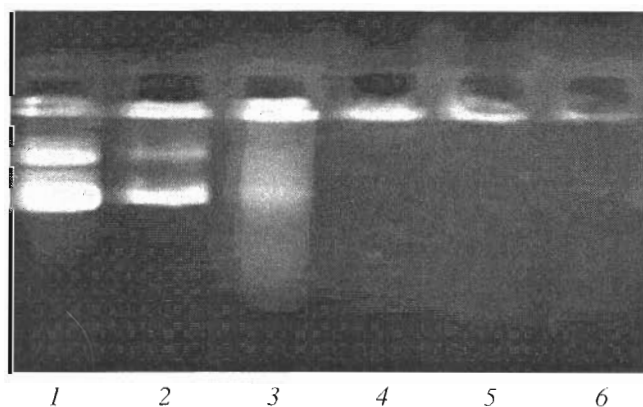


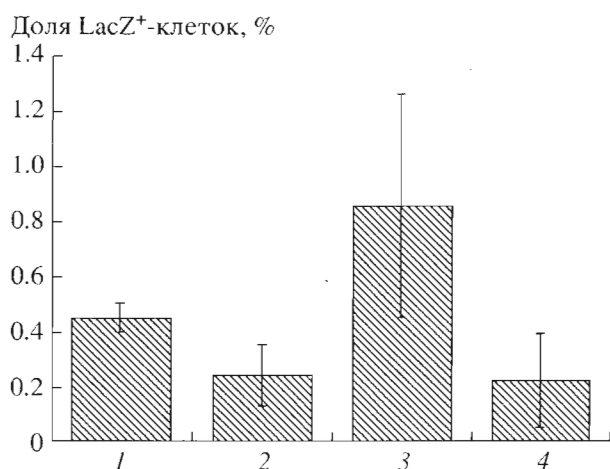
Рис. 3. Электрофорез в 0.8% агарозном геле смеси ДНК плазмиды *pCMV-nls-LacZ* с дендримером **D3** при зарядовых отношениях: 1 : 0.5 (2); 1 : 1 (3); 1 : 2 (4); 1 : 4 (5); 1 : 6 (6) через 1 ч инкубации. Контроль – свободная (“голая”) плазмидная ДНК (1).

**Таблица 2.** Химические сдвиги углеродных атомов  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра внешних и внутренних фрагментов

$$\begin{array}{c} \text{H} \quad | \quad \text{O} \\ \text{---N---C---C---} \\ | \quad | \\ \text{C2} \\ | \\ \text{C3} \\ | \\ \text{C4} \\ \text{---N---C5} \end{array}$$

Атом углерода в лизине	Хим. сдвиги атомов углерода, м. д.	
	Внутренние фрагменты лизина	Внешние фрагменты лизина
C=O	169.1–170.3	172.7–173.0
C1	( $\alpha$ ) 52.46 ( $\epsilon$ ) 52.76	( $\alpha$ ) 53.29 ( $\epsilon$ ) 53.70
C2	29.6–30.7	
C3	22.06	20.88
C4	27.39	25.86
C5	38.74	38.51
CH <sub>3</sub> (Ala)	16.31	

В серии экспериментов было проведено изучение эффективности трансфекции клеток линии HeLa комплексами генетической конструкции pCMV-nls-LacZ с дендримерами **D1**, **D2** или **D3**, образованными при зарядовых соотношениях ДНК–носитель 1 : 0.5, 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4. Зарядовые соотношения рассчитывали, исходя из того, что концентрация фосфатных групп в растворе ДНК концентрации 1 мкг/мл составляет 3.08 нМ. При расчете зарядовых соотношений ДНК–носитель



**Рис. 4.** Эффективность трансфекции  $\beta$ -галактозидазы (%) клетками HeLa в присутствии комплекса ДНК–**D1**. Зарядовые соотношения ДНК–**D1**: 1 : 0.5 (1); 1 : 1 (2); 1 : 2 (3); 1 : 4 (4).

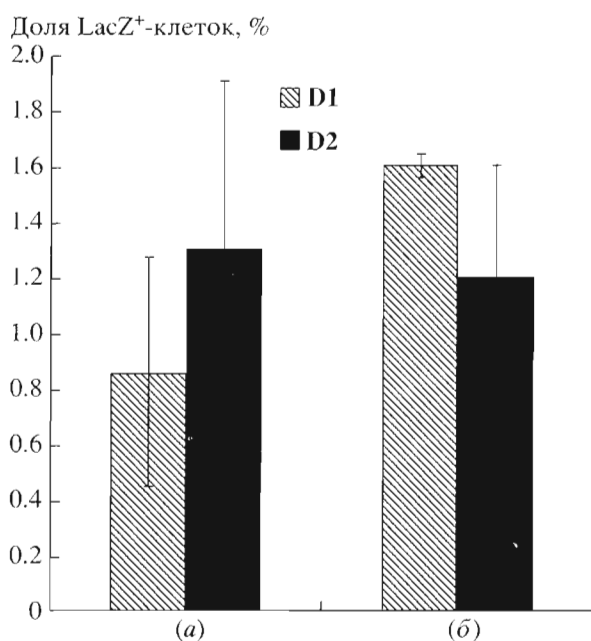
учитывали содержание аминокрупп в соответствующем дендримере. Положительным контролем в экспериментах являлась трансфекция 5 мкг плазмидной ДНК, компактизованной носителем Escort<sup>TM</sup>. В качестве отрицательного контроля использовалась трансфекция “голой” ДНК, не компактизованной носителем. При подборе соотношения ДНК и носителя было показано, что максимальная эффективность трансфекции комплексом ДНК–**D1** без дополнительных добавок (без хлорокина или пептида JTS-1) была достигнута при зарядовом соотношении ДНК–носитель 1 : 2 и составила  $0.86 \pm 0.41\%$  от общего числа клеток (рис. 4). Эффективность трансфекции при использовании комплекса ДНК–**D2** при том же соотношении ДНК и носителя, в целом, была несколько выше и составила  $1.2 \pm 0.4\%$ . Эффективность трансфекции при использовании комплекса ДНК–**D3**, в целом, была сравнима с трансфекционной активностью первых двух комплексов и составила  $0.94 \pm 0.05\%$ , а трансфекция с помощью “голой” ДНК практически отсутствовала (данные не приведены).

#### Изучение эндосомолитических свойств комплексов ДНК–**D1** и ДНК–**D2**

Одной из причин низкой эффективности трансфекции может быть разрушение ДНК в эндосомах после проникновения комплекса в клетку. Обеспечение быстрого освобождения ДНК из эндосом может быть одним из подходов к повышению эффективности трансфекции. Для изучения эндосомолитических свойств дендримеров были проведены эксперименты по трансфекции клеток HeLa комплексами pCMV-nls-LacZ–**D1** и pCMV-nls-LacZ–**D2** в присутствии сильного эндосомолитического антибиотика хлорокина [12].

Для совместной трансфекции с хлорокином использовались комплексы ДНК–**D1** и ДНК–**D2** в зарядовом соотношении 1 : 2. Было показано, что в присутствии хлорокина эффективность трансфекции комплексами с **D1** возрастала в два раза с 0.8 до 1.6% (рис. 5). Возрастание трансфекционной эффективности комплексов ДНК–**D1** в присутствии хлорокина показало, что дендример **D1**, по-видимому, не обладает собственной эндосомолитической активностью. В то же время эффективность трансфекции комплексами ДНК–**D2** в присутствии хлорокина составляла  $1.2 \pm 0.4\%$ , что достоверно не отличается от результатов трансфекции этими комплексами без применения хлорокина  $1.3 \pm 0.6\%$  (рис. 5). Отсутствие влияния хлорокина в этом случае указывает на наличие у дендримера **D2** собственной эндосомолитической активности, связанной, по-видимому, с его липофильностью.

Дендример **D3** (рис. 6) в присутствии хлорокина показал значительное повышение уровня трансфекции: с  $0.94 \pm 0.05\%$  до  $7.9 \pm 4.0\%$ . Возрастание

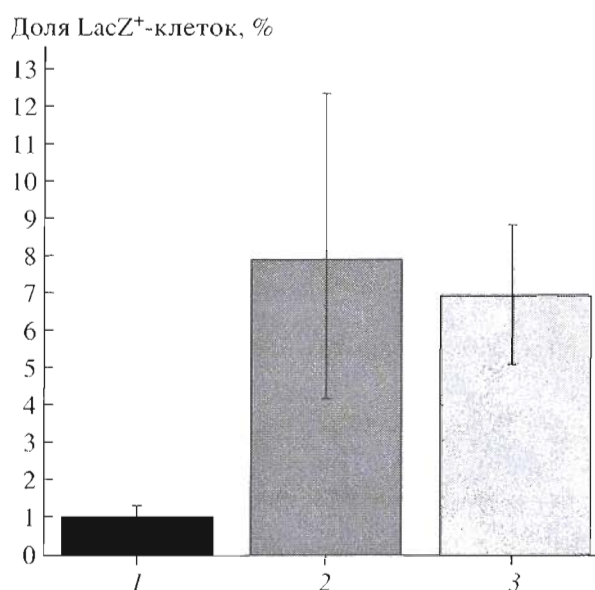


**Рис. 5.** Эффективность трансфекции β-галактозидазы (%) клетками HeLa комплексами ДНК-D1 и ДНК-D2 в отсутствие (а) и в присутствии хлорокина (б). Соотношение ДНК-дендример 1 : 2.

активности может быть объяснено двумя причинами – отсутствием у дендримера D3 собственной эндосомолитической активности и повышением активности в присутствии хлорокина. Вторая причина может быть связана с увеличением у дендримера D3 числа генераций, что также может привести к повышению трансфекционной активности его комплекса с ДНК. В литературе имеются данные по повышению трансфекционной активности лизиновых дендримеров при переходе от дендримера третьей генерации к дендримеру с большим числом генераций [7].

#### Анализ эффективности трансфекции комплексом ДНК-D2-JTS-1

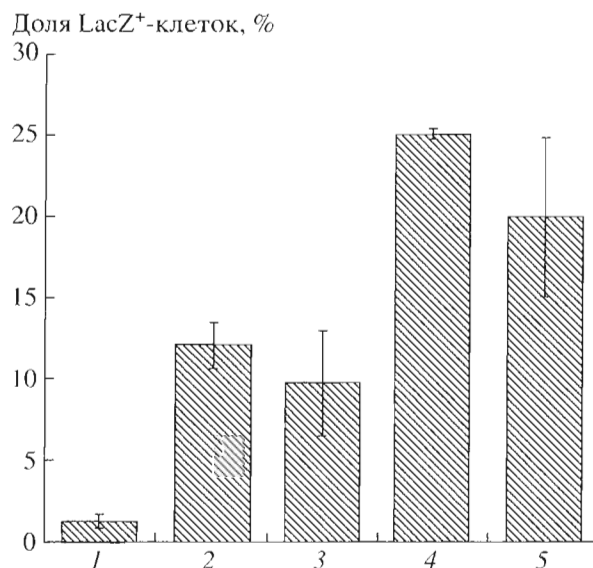
В связи с достаточно низким уровнем эффективности трансфекции при использовании дендримеров для ее усиления к заранее созданному комплексу ДНК-D2 добавили амфипатический анионный пептид JTS-1. В качестве ДНК были использованы клетки HepG2. Переход с культуры клеток HeLa, которая в основном использовалась в данной работе, на культуру клеток HepG2 был связан с тем, что именно линия клеток HepG2 была использована ранее для определения возможности усиления трансфекционной активности комплекса ДНК-полианионный пептид K8 добавлением к нему полианионного пептида JTS-1 [13]. Было показано, что амфипатический пептид JTS-1



**Рис. 6.** Эффективность трансфекции β-галактозидазы (%) клеток HeLa комплексом ДНК-D3 в отсутствие (1) и в присутствии хлорокина (2, 3). Соотношение ДНК-D3 – 1 : 2. Для создания комплекса использовался ДНК в количестве 5 (2) и 1 мкг (3).

способен разрушать эндосомы и увеличивать трансфекцию комплексов ДНК с поликатионами.

Было показано (рис. 7), что добавление пептида JTS-1 достоверно увеличивало трансфекционную активность комплексов ДНК-D2. Максимальный эффект трансфекции составлял  $25 \pm 1.5\%$ .



**Рис. 7.** Эффективность трансфекции β-галактозидазы (%) клеток HepG2 комплексами ДНК-D2 и ДНК-D2-JTS-1. Зарядовые отношения (без JTS-1) ДНК-D2: 1 : 2 (1); (в присутствии JTS-1) ДНК-D2-JTS-1: 1 : 2 : 0.66 (2); 1 : 2 : 1.33 (3); 1 : 2 : 2 (4); ДНК/Escort<sup>TM</sup> (5).



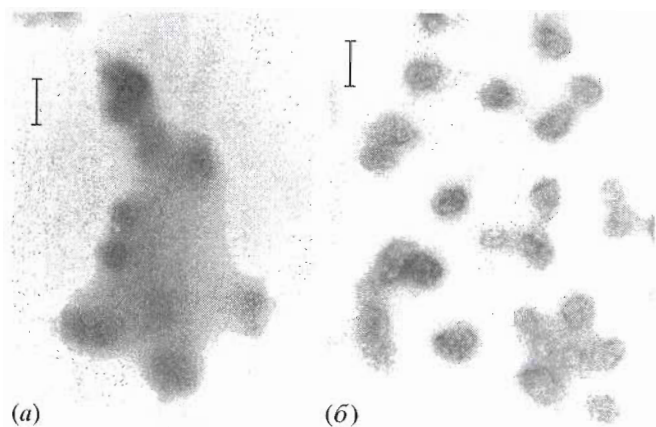


Рис. 8. Электронная фотография комплекса ДНК–D2 (а) и ДНК–D2–JTS-1 (б). Вертикальная черта – размерность – 100 нм.

Уровень экспрессии маркерного гена, обеспечиваемый данными комплексами, практически сравним с эффективностью коммерческого носителя Escort<sup>TM</sup>, использовавшегося в качестве положительного контроля ( $20 \pm 5\%$ ). Трансфекция клеток линии HeLa комплексом ДНК–D2–JTS-1 также была проведена. Оказалось, что эффективность трансфекции на клетках линии HeLa была в 2–2.5 раза ниже, чем на клетках HepG2, что совпадает с нашими предыдущими данными по влиянию типа клеточной линии на трансфекцию [9] (данные не приведены).

Для определения возможной причины повышения трансфекционной активности в присутствии нонадекапептида JTS-1 (помимо приписываемой ему способности разрушать эндосомы [13]) был использован метод электронной спектроскопии. На рис. 8а и б представлены данные по структуре и размерам комплексов ДНК–D2 и ДНК–D2–JTS-1. Обнаруживаемые различия в размерах комплекса ДНК–D2 (100–140 нм, рис. 8а) и комплекса ДНК–D2–JTS-1 (60–80 нм, рис. 8б) не могут существенно влиять на доставку комплексов в клетку, так как эти размеры находятся в пределах средних значений, благоприятных для доставки комплексов в клетку (100–200 нм) [14]. Более существенным, на наш взгляд, является то, что тройной комплекс ДНК–D2–JTS-1 в значительной степени унимодален (рис. 8б), а не представляет из себя набор крупных агрегатов с размерами, значительно большими 200 нм, как это видно на примере комплекса ДНК–D2 (рис. 8а). Отсутствие агрегации является основной причиной высокой трансфекционной активности комплексов ДНК с дендримером D2 в присутствии третьего компонента – нонадекапептида JTS-1 и, по-видимому, именно агрегация часто является причиной низкой трансфекционной активности комплексов ДНК с носителями.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования определены пути оптимизации трансфекционной активности носителей ДНК на основе лизиновых дендримеров. Показано, что увеличение числа генераций дендримеров, так же как добавление к комплексу ДНК–дендример лизосоморазрушающего антибиотика хлорокина, позволяет усилить его трансфекционную активность. Использование тройных комплексов, содержащих в своем составе наряду с ДНК и ДНК-связывающих дендримеров также третий компонент – амфипатический полианионный олигопептид JTS-1, позволяет повысить активность комплекса и получить уровень трансфекции, сопоставимый с уровнем трансфекции при использовании коммерческого липофильного носителя Escort<sup>TM</sup>. Подавление агрегации комплексных частиц, содержащих в своем составе ДНК и ДНК-связывающий компонент, с помощью дополнительного соединения, амфипатического анионного нонадекапептида JTS-1, является, по-видимому, основным фактором, определяющим трансфекционную активность тройного комплекса.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали аминокислоты (*L*-лизин, *L*-аланин), диизопропилкарбодимид, трифторуксусную кислоту, трифторметансульфокислоту, тиоанизол, этандитиол, гидроксibenзтриазол (Fluka, ФРГ), 5-бром-4-хлор-3-индолил-*D*-галактопиранозид, коммерческий носитель Escort<sup>TM</sup> (Sigma, США). Растворители, использованные в работе, были получены из ОАО “Вектон” (Санкт-Петербург) и очищены перед использованием. Электронные фотографии комплексов сделаны в НИИ ОЧБП (Санкт-Петербург).

**Оборудование.** Дендримеры синтезировали на полуавтоматическом пептидном синтезаторе NPS 4000 (Neosystem, Франция). Обращенно-фазовую ВЭЖХ выполняли на приборе Waters 600E (США) с использованием аналитической колонки Nucleosil C-18 (4.6 × 150 мм) и препаративной колонки Vydac C-18 (22 × 250 мм) (Supelco, США). Аминокислотный анализ проводили на анализаторе ААА Т339 М (Microtechna, Прага, Чехословакия). Клетки анализировали с использованием микроскопов Leica и Opton Axioscop (ФРГ). Спектры <sup>13</sup>С-ЯМР снимали на спектрометре Bruker AC-500 (Германия), в качестве растворителя использовали D<sub>2</sub>O. Обработку данных вели при помощи программы WIN-NMR.

**Электронная микроскопия комплексов.** Препараты комплексов дендример–ДНК смешивали с контрастером в соотношении 1 : 1, смесь наносили на опорную пленку, инкубировали 1 мин, избыток влаги удаляли фильтровальной бумагой.

В качестве контрастера использовали 1% раствор фосфорновольфрамовой кислоты (рН 7.0). Анализ комплексов выполнен при помощи просвечивающего электронного микроскопа JEM-100С (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Фотографирование проводили при 50000-кратном увеличении.

**Синтез дендримерных носителей ДНК и нонадекапептида JTS-1** проводили с использованием полимерного носителя – *para*-метилбензгидриламминной смолы (Neosystem Laboratoires, Франция) с применением Вос-стратегии, DIC/НОВt в качестве конденсирующей смеси и трифторуксусной кислоты на стадии деблокирования. В синтезе на 1 г *para*-метилбензгидриламминной смолы (емкость 0.5 ммоль/г) использовали следующий протокол: (1) деблокирование, 70% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл), 15 мин; (2) промывка, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл × 2), DMF (10 мл × 2); (3) депротонирование, 10% Et<sub>3</sub>N/DMF (10 мл × 2); (4) промывка, DMF (10 мл × 2); (5) конденсация, Вос-аминокислота (1.5 ммоль), DIC (15 ммоль), НОВt (1.5 ммоль)/DMF (10 мл); (6) промывка, DMF (10 мл × 2), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл × 2); нингидриновый тест. При неполной конденсации (наличие положительной нингидринной реакции) протокол повторяли с этапа (3).

Полное деблокирование и снятие дендримера и пептида 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. Выпавшие соединения растворили в 30 мл трифторуксусной кислоты, фильтровали для удаления смолы и высаживали в 300 мл сухого эфира. Очистку соединений проводили методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-10 в 10% уксусной кислоте. Соответствующим фракции лиофилизировали. Аминокислотный анализ дендримера **D3** показал соотношение аминокислот Lys : Ala = 63 : 3, что близко к расчетному (64 : 3). Препаративную очистку и анализ дендримера проводили методом ВЭЖХ. Анализ и выделение нонадекапептида JTS-1 осуществляли методом ВЭЖХ в соответствии с работой [13]. Его аминокислотный анализ соответствовал теоретическому.

#### *Биологическое тестирование носителей*

**Генетическая конструкция.** В работе была использована плазмидная ДНК – конструкция pCMV-nls-LacZ, 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 [9].

**Клеточные линии.** Эксперименты по трансфекции выполняли на клеточных культурах эпителиальной карциномы человека HeLa и HepG2-линии (коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Культивирование осуществляли на среде RPMI, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков – пенициллин и стрептомицин в концентрации 100 ед./мл.

**Сборка комплексов дендример–pCMV-nls-LacZ.** К серии проб, содержащих различные количества дендримера (0.5–6 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 [9].

**Сборка комплексов Escort<sup>TM</sup>-pCMV-nls-LacZ.** Получение комплекса Escort<sup>TM</sup>-pCMV-nls-LacZ проводилось согласно протоколу фирмы-производителя “Sigma”. Для этого 5 мкг плазмидной ДНК в 200 мкл среды RPMI смешивали с 50 мкл Escort, инкубировали 15 мин при комнатной температуре и использовали для введения.

**Эффективность трансфекции клеток HeLa комплексами дендример–pCMV-nls-LacZ [9].** Для каждого носителя было проведено сравнение эффективности трансфекции их комплексов с pCMV-nls-LacZ, 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 ДНК) комплексов, растворенных в 100 мкл культуральной среды RPMI. Смесь перемешивали и планшеты с клетками инкубировали при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Через 24 или 72 ч клетки промывали культуральной средой, затем PBS (рН 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-D-галактопиранозид, 5 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 5 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 2 mM MgCl<sub>2</sub> 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 pCMV-nls-LacZ являлся % клеток, экспрессирующих бактериальную β-галактозидазу.

**Эффективность трансфекции клеток HepG2 тройным комплексом – pCMV-nls-LacZ–D2–JTS-1.** К серии проб, содержащих 5 мкг плазмидной

ДНК, добавляли эквивалентные объемы водного раствора дендримера **D2** (20 мкл) в зарядовом соотношении 1 : 2 и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. К образовавшемуся комплексу дендример–ДНК добавляли водный раствор пептида JTS-1 (рН 8, подведен  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) в различных зарядовых соотношениях, смесь быстро перемешивали, оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Упаковку ДНК считали завершенной, если происходила полная задержка связанной ДНК при гель-электрофорезе.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (“Научные школы РФ” № 00-15-97318 и 02-04-49329). Авторы благодарят Потокина И.Л. (Лаборатория электронной микроскопии ВНИИ ОЧБП) за предоставление электронных микрофотографий образцов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Polland H., Remy J.-S., Loussouarn G., Demolombe S. // *Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 7507–7511.
2. Boletta A., Benigni A., Lutz J., Remuzzi G., Soria M.S., Monaco L. // *Human Gene Ther.* 1997. V. 8. P. 1243–1251.
3. Faneca H., Simões S., Pedroso de Lima M.C. // *BBA.* 2002. V. 1567. P. 23–33.
4. Behr J.P., Deminea B., Loeffler J.P., Perez-Mutul J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 6982–6986.
5. Kukowska-Latallo J.F., Bielinska A.U., Johnson J., Spindler R., Tomalia D.A., Baker Jr., J.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 4897–4902.
6. 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.
7. Ohsaki M., Okuda T., Wada A., Hirayama T., Niidome T., Aoyagi H. // *Bioconjug. Chem.* 2002. V. 13. P. 510–517.
8. Okuda T., Kidoaki S., Ohsaki M., Koyama Y., Yoshikawa K., Niidome T., Aoyagi H. // *Biomol. Chem.* 2003. V. 1. P. 1270–1273.
9. Власов Г.П., Корольков В.И., Панкова Г.А., Тарасенко И.И., Баранов А.Н., Глазков П.В., Киселев А.В., Остапенко О.В., Лесина Е.А., Баранов В.С. // *Биоорганическая химия.* 2004. Т. 30. С. 15–24.
10. Okuda T., Sugiyama A., Niidome T., Aoyagi H. // *Biomaterials.* 2004. V. 25. P. 537–544.
11. Newkome G.R., Moorefield C.N., Vogtle F. *Dendritic Molecules (Concepts, Synthesis, Perspectives).* Weinheim–New York–Basel–Cambridge–Tokyo: VCH, 1996.
12. De Smedt S.C., Demeester J., Hennink W.E. // *Pharm. Res.* 2000. V. 17. P. 113–126.
13. 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.
14. Smith I.C., Duguid J., Wadhwa M.S., Logan M.J., Tung C.-H., Edwards V., Sparrow J.T. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998. V. 30. P. 115–131.

## Optimization of Transfection Properties of DNA–Lysine Dendrimer Complexes

G. P. Vlasov<sup>\*,#</sup>, E. A. Lesina<sup>\*\*</sup>, V. I. Korol'kov<sup>\*</sup>, I. A. Gur'yanov<sup>\*</sup>,  
N. V. Bayanova<sup>\*</sup>, A. N. Baranov<sup>\*\*</sup>, A. V. Kiselev<sup>\*\*</sup>, and V. S. Baranov<sup>\*\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (812) 323-1050; e-mail: gpvlasov@hq.macro.ru

<sup>\*</sup>Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,  
Bol'shoi prouezd 31, St. Petersburg, 119004 Russia

<sup>\*\*</sup>Ott Institute of Obstetrics and Gynecology, Russian Academy of Medical Sciences,  
St. Petersburg, 199034 Russia

We studied the possibility of optimizing the DNA transfection properties of carriers based on lysine dendrimers of the third and the fifth generation, including those containing a chloroacetyl or a lipophilic palmitoyl moiety at C-end. The use of lysosome-destroying antibiotic chloroquine and an amphipathic polycationic nonadecapeptide JTS-1 was found to enhance the DNA transfecting properties of the lysine dendrimers. The triple complex including DNA, a lysine dendrimer of the third generation modified with lipophilic moieties of palmitic acid at its C-end, and JTS-1 was shown to be comparable in its transfecting activity to a complex containing Escort<sup>TM</sup>, a commercial cationic liposome carrier. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* chloroacetic acid, chloroquine, DNA, lysine dendrimers, palmitic acid, transfection