



ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПОСОМ НА ДОСТАВКУ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ¹

© 2021 г. А. А. Михеев*, Е. В. Шмендель**, Г. В. Назаров*, М. А. Маслов**, #

*ФГУП “Научный центр “Сигнал”, Россия, 107014 Москва, ул. Большая Оленья, 8

**Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова,

МИРЭА — Российский технологический университет, Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 31.03.2021 г.

После доработки 04.04.2021 г.

Принята к публикации 06.04.2021 г.

Генная терапия — перспективный метод лечения различных заболеваний путем введения терапевтических нуклеиновых кислот, для доставки которых широкое распространение получили катионные липосомы. Показана способность катионных липосом, состоящих из поликатионного липида 2X3 (1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид) и липида-хелпера DOPE (1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин) при различных соотношениях (2.5 : 1 (L1), 2 : 1 (L2), 1.5 : 1 (L3), 1 : 1 (L4), 1 : 1.5 (L5), 1 : 2 (L6) и 1 : 2.5 (L7)), обеспечивать доставку плазмидной ДНК (пДНК) в клетки НЕК293 с эффективностью выше, чем у коммерческого препарата Липофектамин 2000. Мы обнаружили, что трансфицирующая активность катионных липосом зависит как от их состава, так и от состава комплексов, формируемых катионными липосомами и пДНК (соотношение N/P). Катионные липосомы не проявляют токсичных свойств по отношению к эукариотическим клеткам НЕК293 и при соотношении N/P ≥ 6/1 оказались эффективнее Липофектамина 2000, при этом наибольшая эффективность достигается для образца L2. При более низких значениях N/P = 1/1, 2/1 и 4/1 липосомы L1 обеспечивают активный транспорт нуклеиновых кислот в клетки. Таким образом, для дальнейших экспериментов *in vivo* выбраны нетоксичные и небольшие по размеру липосомы L1 и L2, в которых содержание амфифила 2X3 в 2 и более раз превосходит количество липида-хелпера DOPE. Разработанные катионные липосомы могут успешно использоваться в качестве эффективных трансфицирующих агентов.

Ключевые слова: катионные липиды, трансфекция, липосомы, плазмидная ДНК, невирусные системы доставки

DOI: 10.31857/S0132342321050316

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на большое количество исследований по поиску и оптимизации систем доставки нуклеиновых кислот (НК), их низкая эффективность по-прежнему остается одним из главных факторов, ограничивающих развитие генной те-

рапии. Разработка транспортной системы, способной эффективно переносить НК в клетки-мишени с минимальным риском возникновения побочных эффектов у пациента, — конечная цель исследований по трансфекции — процесса трансформации клеток эукариот экзогенными НК.

Невирусные системы доставки НК обладают такими преимуществами, как простота синтеза, отсутствие ограничений в размере доставляемых НК, возможность модификации состава, низкая цитотоксичность [1, 2]. К невирусным системам доставки относятся полимеры [3, 4], дендримеры [5, 6] и липосомы [7, 8]. Наиболее эффективные среди них — катионные липосомы [9, 10], состоящие из катионных амфифилов (КА) [11–14]. С целью создания безопасных и эффективных липосом структура КА подвергается различным химическим модификациям, таким как изменение катионной группы [15–19], спейсера [20–23],

¹ Статья публикуется по материалам доклада, представленного на конференции “Липиды 2021” (Москва, 11–13 октября 2021 г.).

Сокращения: КА — катионные амфифилы; НК — нуклеиновые кислоты; пДНК — плазмидная ДНК; ЭТ — эффективность трансфекции; DOPC — 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; DOPE — 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин; FBS — эмбриональная бычья сыворотка; НЕК293 — клетки почки эмбриона человека; IC₅₀ — концентрация липосом, при которой происходит ингибирование роста 50% клеток; МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид; 2X3 — 1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид.

Автор для связи: (тел. +7 (916) 386-99-82; эл. почта: mamaslov@mail.ru).

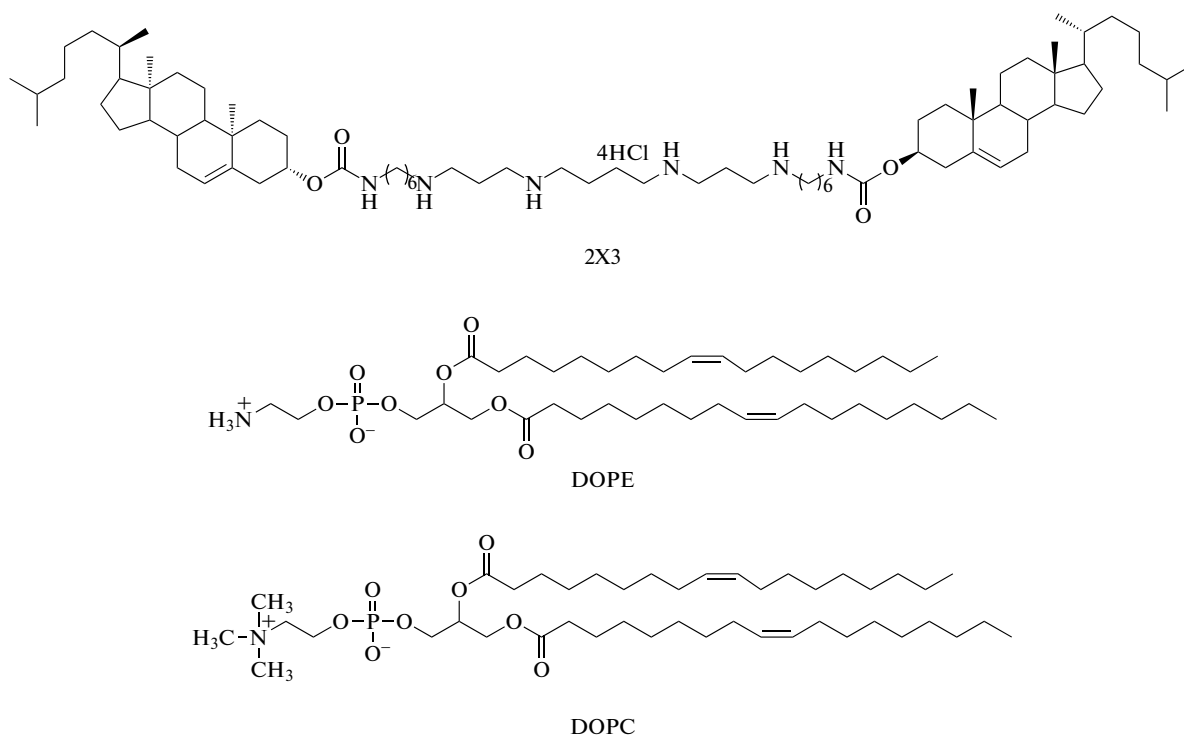


Рис. 1. Строение катионного амфифила 2X3, липидов-хелперов DOPE и DOPC.

гидрофобного заместителя [24, 25], а также линкера [26–30], что, в свою очередь, приводит к изменению эффективности трансфекции (ЭТ) клеток. Несмотря на определенные успехи в области разработки липосомальных систем доставки НК, уровень трансфекции эукариотических клеток, необходимый для практического использования, пока не достигнут. Это связано с недостаточным пониманием закономерностей по влиянию состава катионных липосом на их физико-химические параметры и биологическую активность.

Наиболее перспективные для транспорта НК – КА на основе холестерина и природных полиаминов [15, 31–37]. Так, липосомы на основе амфифила 2X3 (1,26-бис(холест-5-ен-3 β -илокси-карбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид, рис. 1), содержащего спермин, два холестеринных остатка, карбамоильный линкер и гексаметиленовый спейсер, трансфицировали эукариотические клетки *in vitro* эффективнее своих аналогов [32], не теряя своей активности в присутствии эмбриональной бычьей сыворотки (FBS).

В состав липосом помимо КА также могут входить липиды-хелперы, которые увеличивают ЭТ. Среди цвиттер-ионных липидов-хелперов часто используются 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE) [38, 39] и 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DOPC) [40, 41] (рис. 1).

Использование DOPE в составе липосом приводит к эффективной доставке НК по сравнению с DOPC благодаря способности DOPE формировать инвертированную гексагональную фазу в условиях эндосомального закисления [38]. Также было обнаружено, что использование DOPE в качестве липида-хелпера способствует более компактной упаковке НК [29, 41–44]. В составе катионных липосом DOPE может преобладать по содержанию над КА (КА : DOPE, 1 : 4) [34] или находиться в недостатке (КА : DOPE, 7 : 1) [45]. Наиболее часто используемое соотношение между КА : DOPE – соотношение 1 : 1 [32, 33, 35, 41–43, 45].

Другой важный параметр, влияющий на ЭТ, – это состав комплексов, формируемых липосомами и НК, который определяется соотношением количества положительно заряженных атомов азота КА к количеству отрицательно заряженных фосфатных групп НК (N/P). Так, при соотношении N/P = 1/1 катионные липосомы не полностью компактизируют НК, что приводит к низкой ЭТ [46, 47]. Увеличение соотношения N/P увеличивает ЭТ за счет формирования компактных комплексов с избыточным положительным зарядом, обеспечивающим электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженной поверхностью мембраны эукариотических клеток [48, 49]. Однако с увеличением соотношения N/P

Таблица 1. Состав катионных липосом, их физико-химические параметры и цитотоксичность для клеток НЕК293

Липосомы	Соотношение, мольн.		Средний размер липосом, нм	ξ -Потенциал липосом, мВ	Индекс полидисперсности	IC ₅₀ , мкМ
	2X3	DOPE				
L1	2.5	1.0	75.2 ± 0.6	89 ± 1.57	0.264 ± 0.030	>80
L2	2.0	1.0	77.2 ± 1.4	88 ± 2.86	0.266 ± 0.010	>80
L3	1.5	1.0	86.2 ± 0.6	97 ± 2.46	0.259 ± 0.049	>80
L4	1.0	1.0	73.0 ± 1.2	99 ± 2.19	0.231 ± 0.076	>80
L5	1.0	1.5	67.4 ± 0.6	100 ± 2.99	0.290 ± 0.006	>80
L6	1.0	2.0	101.6 ± 1.2	100 ± 2.57	0.260 ± 0.008	>80
L7	1.0	2.5	130.6 ± 0.8	102 ± 2.08	0.335 ± 0.015	>80

также увеличивается цитотоксичность комплексов [50], что диктует необходимость выбора оптимального соотношения N/P, обеспечивающего разумный баланс между ЭТ и безопасностью липосом.

С целью создания эффективных систем доставки нуклеиновых кислот нами изучено влияние состава катионных липосом, сформированных на основе амфифила 2X3 и цвиттер-ионного липида DOPE, а также соотношения N/P, на физико-химические характеристики липосом, их цитотоксичность и ЭТ с целью выявления оптимальных условий для транспорта пДНК в эукариотические клетки *in vitro*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение катионных липосом и изучение их физико-химических характеристик. Катионные липосомы **L1–L7**, состоящие из КА 2X3 и липида-хелпера DOPE (рис. 1) при различном соотношении компонентов (табл. 1), были сформированы с использованием метода гидратации липидной пленки и последующей обработки ультразвуком [46, 47]. Количество DOPE в составе липосом может варьироваться в широком диапазоне значений [44, 45]. Ранее была продемонстрирована высокая эффективность доставки пДНК и siРНК липосомами 2X3-DOPE при мольном соотношении 1 : 1 (**L4**) [33, 46, 47] и 1 : 2 (**L6**) [51, 52], однако в одном эксперименте данные липосомы никогда не сравнивались. Кроме того, с целью поиска оптимального состава катионных липосом было важно исследовать соотношения компонентов.

Первый этап при создании систем доставки НК на основе липосом – изучение их физико-химических параметров. Стабильность таких систем может быть оценена по значениям размера и

поверхностного потенциала частиц методом динамического светорассеяния (табл. 1).

Гидродинамический диаметр катионных липосом **L1–L7** варьирует от 75.2 до 130.6 нм. Небольшое увеличение размера может быть связано с увеличением количества DOPE в их составе (табл. 1). Ранее было показано, что увеличение количества DOPE в составе катионных липосом с амфифилом SPYRIT-7 приводит, наоборот, к уменьшению их размера [20]. Таким образом, размер липосом зависит не только от количества DOPE, но также от природы КА. Поверхностный заряд всех липосом был положительным (88–102 мВ). Значение индекса полидисперсности катионных липосом **L1–L7** указывало на формирование однородных по размеру частиц, за исключением липосом **L7** (индекс полидисперсности 0.335).

Цитотоксичность катионных липосом. Цитотоксичность катионных липосом **L1–L7** (табл. 1) оценивали с помощью МТТ-теста, используя клетки почки эмбриона человека (НЕК293) [46]. Процент гибели клеток зависит от концентрации липосом. Показатель их токсичности – концентрация, при которой выживает 50% клеток (IC₅₀). Значения IC₅₀, полученные с помощью МТТ-теста на клетках НЕК293, не были достигнуты при концентрациях липосом **L1–L7** от 5 до 80 мкМ.

Физико-химические характеристики комплексов катионных липосом и пДНК. Комплексы катионных липосом **L1–L7** и пДНК рGLuc (0.5 мкг/мл) формировали при различных соотношениях N/P (1/1, 2/1, 4/1, 6/1, 8/1, 10/1) путем смешивания эквивалентных объемов растворов катионных липосом и пДНК в среде DMEM. Ранее было показано, что небольшие по размеру (40–80 нм) комплексы обеспечивают более высокую ЭТ в условиях *in vivo*, в то время как частицы с размером 200–400 нм оптимальны для трансфекции клеток *in vitro* [53, 54].

По сравнению с индивидуальными липосомами (табл. 1), при соотношениях $N/P = 1/1$ и $2/1$ гидродинамический диаметр комплексов пДНК с липосомами, содержащими избыток КА ($2X3 > 1$), увеличивался до значений 200–300 нм (рис. 2а). В случае липосом с соотношением компонентов $2X3/DOPE \leq 1$ диаметр комплексов достигал значений 400–600 нм. Дальнейшее увеличение количества липосом в комплексах ($N/P = 4/1$) приводило к компактизации пДНК и образованию частиц размером 100–280 нм. Начиная с $N/P = 6/1$, размер комплексов практически не изменялся и не превышал 200 нм.

Все исследуемые комплексы катионных липосом с пДНК при соотношении $N/P = 1/1$ имели отрицательный заряд, который изменялся на положительный, начиная с $N/P = 2/1$ для липосом **L1**, **L2**, **L4**, **L6**, **L7** и с $N/P = 4/1$ для липосом **L3** и **L5** (рис. 2б). Аналогичные закономерности нами наблюдались ранее как для катионных липосом **L6**, так и для адресных липосом на их основе [35].

Доставка пДНК катионными липосомами различного состава. С целью оценки эффективности доставки пДНК рGLuc в эукариотические клетки НЕК293 с помощью катионных липосом **L1–L7** определяли уровень экспрессии люциферазы с помощью люминесцентного анализа, оценивая среднюю интенсивность люминесценции в клеточной популяции. ЭТ сравнивали с коммерческим препаратом Липофектамин 2000, который состоит из смеси поликатионного липида 2,3-диолеилокси-*N*-[2-(сперминкарбоксамидо)этил]-*N,N*-диметил-1-пропиламмоний трифторацетата и DOPE и считается “золотым стандартом” среди трансфицирующих реагентов *in vitro* [55].

Для определения состава катионных липосом и комплексов, оптимальных для доставки пДНК, проводили оценку трансфицирующей активности при разных соотношениях N/P (рис. 3). При соотношении $N/P = 1/1$ или $2/1$ низкая ЭТ наблюдалась для всех исследуемых липосом. Следует отметить, что при соотношении $N/P = 2/1$ катионные липосомы **L1** и **L2** с соотношением компонентов $2X3/DOPE \geq 2$ формировали небольшие по размеру комплексы (рис. 2) и более эффективно доставляли пДНК (рис. 3) относительно других липосом. При соотношении $N/P = 4/1$ все комплексы катионных липосом приобретали положительный заряд (ζ -потенциал > 40 мВ) и компактизовали пДНК до 80–160 нм (рис. 2), что способствовало более эффективной доставке НК (рис. 3). Однако только липосомы **L2** превосходили по эффективности коммерческий препарат Липофектамин 2000. При соотношениях $N/P \geq 6/1$ все исследуемые липосомы были эффективнее Липофектамина 2000: так, при $N/P = 8/1$ или $10/1$ ин-

тенсивность значений люминесценции были от 1.3 до 2 раз выше, чем для Липофектамина 2000. Наибольшие значения наблюдались при соотношении $N/P = 10/1$ для липосом **L2** и **L3**, содержащих избыток амфифила 2X3. При этом следует отметить, что для липосом **L1**, **L6** и **L7** увеличение соотношения N/P , начиная с $6/1$, незначительно влияло на ЭТ.

Сравнительную оценку ЭТ катионных липосом проводили по отношению к ранее изученным липосомам **L4** [33, 46, 47] (рис. 4а) и **L6** [51, 52] (рис. 4б). Было обнаружено, что наибольшие различия в ЭТ отмечаются при соотношениях $N/P = 1/1$, $2/1$ и $4/1$ (рис. 4). При более высоких соотношениях N/P ЭТ исследуемых липосом **L1–L7** была статистически неразличимой.

Наибольшее различие наблюдалось при соотношении $N/P = 2/1$ для катионных липосом **L1** ($2X3/DOPE = 2.5$) с максимальным содержанием амфифила 2X3, они оказались в 10^4 раз эффективнее липосом **L4** ($2X3/DOPE = 1$) и **L6** ($2X3/DOPE = 0.5$). Ранее нами было показано, что соотношение $N/P = 2/1$ — одно из главных условий для адресной доставки НК фолат-содержащими катионными липосомами на основе **L6** [51], поэтому увеличение количества поликатионного амфифила 2X3 в составе адресных липосом до 2.5 мольных эквивалентов может привести к значительному усилению экспрессии белка и повысить эффективность направленной доставки в опухолевые клетки. Также следует отметить, что именно липосомы **L1** формируют при соотношении $N/P = 2/1$ самые маленькие комплексы (~200 нм, рис. 2а) с зарядом ~40 мВ (рис. 2б). Дальнейшее увеличение количества липосом в комплексах ($N/P = 4/1$) приводит как к уменьшению их размера, так и к увеличению их поверхностного заряда, что нивелирует различие в ЭТ между исследуемыми липосомами (рис. 4а, 4б).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение липосом. Катионный амфирил 2X3 (чистота $>95\%$) синтезировали по описанной ранее методике [31]. В работе использовали цвиттер-ионный фосфолипид DOPE (Avanti Polar Lipids, США) и коммерчески доступный препарат Липофектамин 2000 (Invitrogen, США).

Чистоту синтезированного КА определяли на высокоэффективном жидкостном хроматографе Ultimate 3000, соединенном с масс-спектрометром LCQ Fleet (Thermo Scientific, США). Хроматографирование осуществляли на колонке Thermo Scientific Hypersil Gold C-8 (50×2.1 мм, 1.9 мкм) в режиме градиентного элюирования: фаза А — 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в деиони-

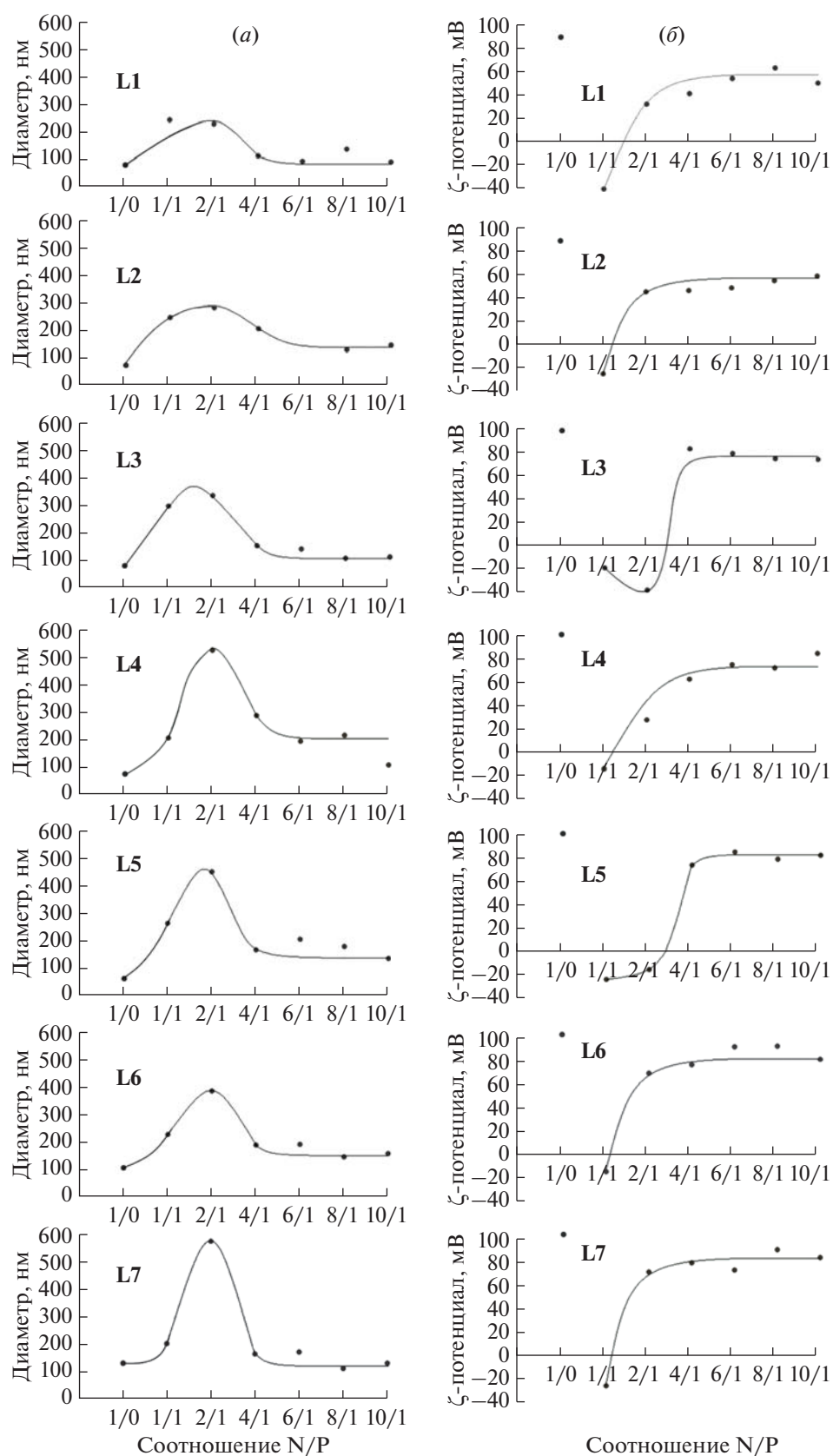


Рис. 2. Гидродинамический диаметр (а) и ζ -потенциал (б) комплексов катионных липосом L1–L7 и пДНК rGLuc, сформированных при различных соотношениях N/P.

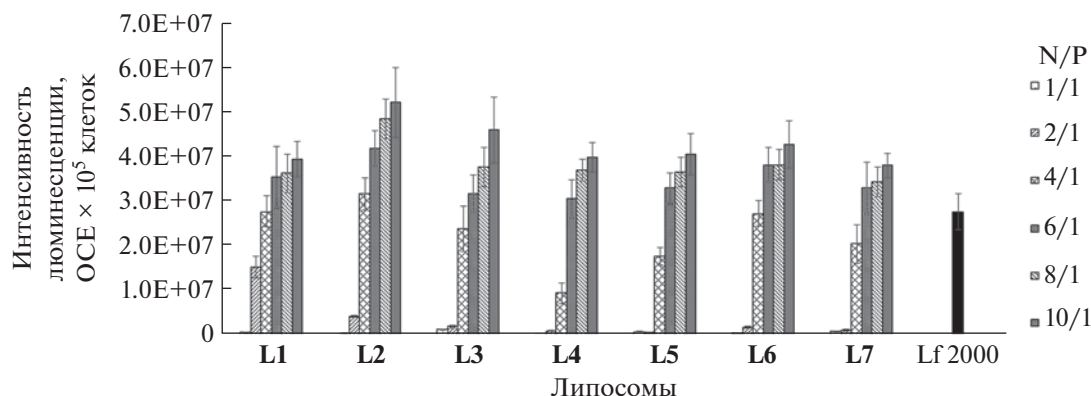


Рис. 3. Доставка пДНК с помощью катионных липосом в клетки HEK293. Клетки инкубировали с комплексами, сформированными рGLuc (0.5 мкг на лунку) и катионными липосомами **L1–L7** при различных соотношениях N/P. Уровень средней интенсивности люминесценции клеток измеряли методом люминесцентного анализа через 72 ч после инкубации клеток с комплексами. Результаты 12 экспериментов представлены как среднее трех повторов. Доставку рGLuc с помощью Липофектина 2000 (Lf2000) осуществляли в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

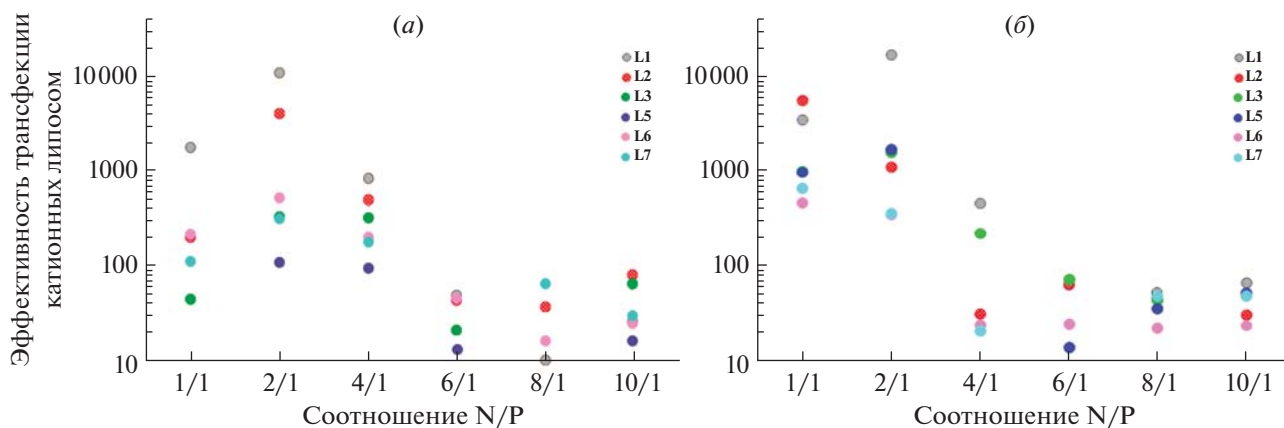


Рис. 4. Сравнительная оценка эффективности трансфекции катионных липосом **L1–L3** и **L5–L7** по отношению к липосомам **L4** (а) и катионных липосом **L1–L5** и **L7** по отношению к липосомам **L6** (б).

зированной воде; фаза В – 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил/изопропиловый спирт в соотношении 80/20 (V/V).

Для получения липосом к раствору 2X3 в системе хлороформ–метанол (5/1, V/V) добавляли раствор DOPE в хлороформе при различных соотношениях (табл. 1) и затем осторожно удаляли растворитель под вакуумом на ротационном испарителе. Полученную липидную пленку сушили в вакууме масляного насоса (0.01 торр) в течение 4 ч, гидратировали в воде для инъекций (Solopharm, Россия) при 50–60°C в течение 10 мин. Липидные дисперсии обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин при 60–65°C в ультразвуковой бане (Bandelin Sonorex Digitec DT 52H, Германия) с последующим фильтрованием через стерильный фильтр (Chromafil CA-45/25 (S), Macherey-Nagel,

Германия) с размером пор 450 нм. Полученные катионные липосомы **L1–L7** с концентрацией 1 мМ по амфифилу 2X3 хранили при 4°C в атмосфере аргона.

Нуклеиновые кислоты. В экспериментах для оценки эффективности доставки гена *GLuc* использовали плазмиду *psGLuc-N1* (4544 п.н.) полученную на основе *pEGFP-N1* (4733 п.н.; Clontech Laboratories, США, GenBank U55762) путем клонирования в нее гена *GLuc* из плазмиды *pNEBR-X1GLuc* (4821 п.н.; New England BioLabs, США).

Получение комплексов катионных липосом с пДНК. Для экспериментов по трансфекции были сформированы комплексы катионных липосом с пДНК в среде DMEM (Invitrogen, США) без сыворотки путем смешивания 50 мкл раствора

пДНК (0.5 мкг) в DMEM и 50 мкл раствора липосом **L1–L7** в DMEM при соотношениях N/P = 1/1, 2/1, 4/1, 6/1, 8/1, 10/1 с последующей инкубацией в течение 20 мин при комнатной температуре.

Для измерения физико-химических характеристик 50 мкл липосом смешивали с 950 мкл дистиллированной воды (Milli-Q). Для измерения физико-химических характеристик комплексов 50 мкл пДНК pGLuc в дистиллированной воде (Milli-Q) смешивали с 50 мкл катионных липосом **L1–L7** в дистиллированной воде (Milli-Q), при соответствующих соотношениях N/P = 1/1, 2/1, 4/1, 6/1, 8/1 и 10/1, инкубировали в течение 20 мин при 25°C и добавляли 950 мкл дистиллированной воды (Milli-Q).

Физико-химические характеристики липосом и их комплексов с пДНК. Размер и ζ -потенциал липосом и их комплексов с пДНК измеряли на приборе динамического лазерного светорассеивания Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Великобритания; угол 173°, вязкость 0.890 сП, температура 25°C, время равновесия 2 мин, показатели преломления для воды и липосом 1.33 и 1.46 соответственно). Средний гидродинамический диаметр (нм) по количеству частиц регистрировали как среднее значение трех измерений.

Клеточная линия. Клеточную линию HEK293 (ATCC, США) культивировали в среде DMEM в присутствии 10% FBS с антибиотиком (5000 ед./мл пенициллина и 5000 мкг/мл стрептомицина) в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37°C.

Тест на жизнеспособность клеток. Клетки HEK293 культивировали в 96-луночных планшетах (плотность посадки 2×10^5 клеток на лунку, инкубация в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37°C в течение 24 ч). В день проведения эксперимента клеточную среду DMEM + 10% FBS с антибиотиком заменяли растворами липосом **L1–L7** с концентрациями 5, 10, 20, 40 и 80 мкМ в DMEM (суммарный объем 150 мкл на лунку) в отсутствие FBS и инкубировали в атмосфере 5%-ного CO₂ в течение 4 ч при 37°C, после чего добавляли 16 мкл FBS и дополнительно инкубировали 20 ч при 37°C.

По окончании инкубации к клеткам без смены среды добавляли 10 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромида (МТТ) (Sigma, США) с концентрацией 5 мг/мл. Через 4 ч культуральную среду удаляли, кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО, 200 мкл на лунку) и определяли разницу между оптической плотностью при 620 и 570 нм (Multiscan RC, Labsystems, Финляндия) [53]. Из экспериментальных данных вычисляли значение IC₅₀. Результаты были выражены как средние значе-

ния для трех параллельных измерений и были статистически обработаны с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Трансфекция клеток. Клетки HEK293 культивировали в 24-луночных планшетах (плотность посадки 2×10^5 клеток на лунку, инкубация в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37°C в течение 24 ч). Перед проведением трансфекции в планшетах заменяли культуральную среду DMEM + 10% FBS с антибиотиком на среду DMEM + 10% FBS без антибиотика. Комплексы катионных липосом с пДНК объемом 100 мкл добавляли к клеткам. Для равномерного распределения раствора комплексов по всему объему лунки планшет помещали для перемешивания на ротационный миксер, а затем выдерживали в течение 4 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Далее заменяли среду на свежую DMEM + 10% FBS с антибиотиком и оставляли в CO₂-инкубаторе на 68 ч.

Для определения ЭТ использовали люминесцентный анализ на планшетном люминометре GloMax Multi plus (Promega, США) с автоматическим вводом 50 мкл субстрата BioLux Gaussia Luciferase (New England Biolabs, США), устанавливая параметры по протоколу производителя (5 с интегрирования, 37 с задержки). Все экспериментальные точки были измерены в трех повторях и статистически обработаны с использованием *t*-критерия Стьюдента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были получены катионные липосомы **L1–L7** разного состава на основе амфифила 2X3 и цвиттер-ионного липида DOPE, которые оказались не токсичными в отношении эукариотических клеток HEK293, обладали оптимальными физико-химическими характеристиками и могут быть использованы в качестве систем доставки НК. Для обеспечения более эффективной доставки пДНК содержание поликатионного амфифила 2X3 должно быть больше, чем липида-хелпера DOPE для всех исследуемых соотношений N/P. При соотношении N/P > 4/1 формируются небольшие по размеру положительно заряженные комплексы пДНК с катионными липосомами, которые эффективнее коммерческого препарата Липофектамин 2000. При этом при соотношениях N/P = 8/1 и 10/1 липосомы **L2**, содержащие 2.0 мольных эквивалента поликатионного амфифила 2X3, обеспечивают максимальный уровень трансфекции клеток. При соотношении N/P = 2/1 липосомы **L1**, содержащие 2.5 мольных эквивалента амфифила 2X3, оказались эффективнее липосом **L2–L7**, что

может быть использовано для направленного транспорта пДНК.

Разработанные катионные липосомы могут успешно использоваться в качестве эффективных трансфицирующих агентов. Для дальнейших экспериментов *in vivo* могут быть выбраны нетоксичные, небольшие по размеру липосомы **L1** и **L2**, в которых содержание амфифила 2ХЗ в 2 и более раз превосходит количество липида-хелпера DOPE.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0706-2020-0019) с использованием оборудования Центра коллективного пользования МИРЭА — Российского технологического университета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yin H., Kanasty R.L., Eltoukhy A.A., Vegas A.J., Dorkin J.R., Anderson D.G. // *Nat. Rev. Genet.* 2014. V. 15. P. 541–555.
<https://doi.org/10.1038/nrg3763>
2. Li S.D., Huang L. // *J. Control. Rel.* 2007. V. 123. P. 181–183.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.004>
3. Eliyahu H., Barenholz Y., Domb A.J. // *Molecules.* 2005. V. 10. P. 34–64.
<https://doi.org/10.3390/10010034>
4. Saad M., Garbuzenko O.B., Ber E., Chandna P., Khandare J.J., Pozharov V.P., Minko T. // *J. Control. Rel.* 2008. V. 130. P. 107–114.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.024>
5. Chaplot S.P., Rupenthal I.D. // *J. Pharm. Pharmacol.* 2014. V. 66. P. 542–556.
<https://doi.org/10.1111/jphp.12104>
6. Wu J., Huang W., He Z. // *Sci. World J.* 2013. V. 29. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1155/2013/630654>
7. Petrilli R., Eloy J.O., Souza M.C., Barcellos J.P.A., Marchetti J.M., Yung B., Lee R.J. // *Nanobiomat. Drug Del.* 2016. V. 9. P. 78–109.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42866-8.00003-4>
8. Allen T.M., Cullis P.R. // *Adv. Drug Del. Rev.* 2013. V. 65. P. 36–48.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
9. Shim G., Kim M.G., Park J.Y., Oh Y.K. // *Asian J. Pharm. Sci.* 2013. V. 8. P. 72–80.
<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.009>
10. Elhissi A., Hassan I.U., Papapanou A., Zeb N., Taylor K.M.G. // *Adv. Plan. Lip. Bil. Liposom.* 2014. V. 19. P. 53–66.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418699-6.00002-3>
11. Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. P. 7413–7417.
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413>
12. Martin B., Sainlos M., Aissaoui A., Oudrhiri N., Hauchecorne M., Vigneron J.P., Lehn J.M., Lehn P. // *Curr. Pharm. Design.* 2005. V. 11. P. 375–394.
<https://doi.org/10.2174/1381612053382133>
13. Maslov M.A., Sycheva E.V., Morozova N.G., Serebrennikova G.A. // *Russ. Chem. Bull.* 2000. V. 3. P. 385–400.
<https://doi.org/10.1007/bf02494765>
14. Mintzer M.A., Simanek E.E. // *Chem. Rev.* 2009. V. 109. P. 259–302.
<https://doi.org/10.1021/cr800409e>
15. Zhi D., Zhang S., Cui S., Zhao Y., Wang Y., Zhao D. // *Bioconjugate Chem.* 2013. V. 24. P. 487–519.
<https://doi.org/10.1021/bc300381s>
16. Biswas J., Mishra S.K., Kondaiah P., Bhattacharya S. // *Org. Biomol. Chem.* 2011. V. 9. P. 4600–4613.
<https://doi.org/10.1039/c0ob00940g>
17. Niyomtham N., Apiratikul N., Chanchang K., Opanasopit P., Yingyongnarongkul B.E. // *Biol. Pharm. Bull.* 2014. V. 37. P. 1534–1542.
<https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00349>
18. Ojeda E., Puras G., Agirre M., Zarate J., Grijalvo S., Eritja R., Martinez-Navarrete G., Soto-Sanchez C., Diaz-Tahoces A., Aviles-Trigueros M., Fernandez E., Pedraz J.L. // *Biomaterials.* 2016. V. 77. P. 267–279.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.017>
19. Puchkov P.A., Shmendel E.V., Luneva A.S., Morozova N.G., Zenkova M.A., Maslov M.A. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016. V. 26. P. 5911–5915.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.005>
20. Sharma V.D., Lees J., Hoffman N.E., Brailoiu E., Madesh M., Wunder S.L., Ilies M.A. // *Mol. Pharmaceutics.* 2014. V. 11. P. 545–559.
<https://doi.org/10.1021/mp4005035>
21. Cho S.M., Lee H.Y., Kim J.C. // *Korean J. Chem. Eng.* 2008. V. 25. P. 390–393.
<https://doi.org/10.1007/s11814-008-0066-6>
22. Rao N.M. // *Chem. Physic. Lip.* 2010. V. 163. P. 245–252.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.01.001>
23. Puchkov P.A., Kartashova I.A., Shmendel E.V., Luneva A.S., Morozova N.G., Zenkova M.A., Maslov M.A. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017. V. 27. P. 3284–3288.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.06.026>

24. *Ui-Tei K., Naito Y., Takahashi F., Haraguchi T., Ohki-Hamazaki H., Juni A., Ueda R., Saigo K.* // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. 936–948.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh247>
25. *Chen H.M., Li Y.H., Wu S.H.* // PNAS. 2007. V. 104. P. 3318–3323.
<https://doi.org/10.1073/pnas.061119104>
26. *Choi J.S., Lee E.J., Jang H.S., Park J.S.* // Bioconjugate Chem. 2001. V. 12. P. 108–113.
<https://doi.org/10.1021/bc000081o>
27. *Liu D., Hu J., Qiao W., Li Z., Zhang S., Cheng L.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005. V. 15. P. 3147–3150.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.04.010>
28. *Liu D., Qiao W., Li Z., Chen Y., Cui X., Li K., Yu L., Yan K., Zhu L., Guo Y., Cheng L.* // Chem. Biol. Drug Des. 2008. V. 71. P. 336–344.
<https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00644.x>
29. *Fujiwara T., Hasegawa S., Hirashima N., Nakanishi M., Ohwada T.* // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1468. P. 396–402.
[https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00278-9](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00278-9)
30. *Puchkov P.A., Shmendel E.V., Luneva A.S., Zenkova M.A., Maslov M.A.* // Chem. Select. 2020. V. 5. P. 4509–4514.
<https://doi.org/10.1002/slct.201904879>
31. *Petukhov I.A., Maslov M.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A.* // Russ. Chem. Bull. 2010. V. 59. P. 260–268.
<https://doi.org/10.1007/s11172-010-0071-x>
32. *Maslov M.A., Kabilova T.O., Petukhov I.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A.* // J. Control. Release. 2012. V. 160. P. 182–193.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.023>
33. *Markov O.V., Mironova N.L., Maslov M.A., Petukhov I.A., Morozova N.G., Vlassov V.V., Zenkova M.A.* // J. Control. Release. 2012. V. 160. P. 200–210.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.034>
34. *Ju J., Huan M.L., Wan N., Hou Y.L., Ma X.X., Jia Y.Y., Li C., Zhou S.Y., Zhang B.L.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2016. V. 26. P. 2401–2407.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.007>
35. *Markov O.V., Mironova N.L., Shmendel E.V., Serikov R.N., Morozova N.G., Maslov M.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A.* // J. Control. Release. 2015. V. 213. P. 45–56.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.028>
36. *Niyomtham N., Apiratikul N., Suksen K., Opanasopit P., Yingyongnarongkul B.E.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015. V. 25. P. 496–503.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.043>
37. *Mikheev A.A., Shmendel E.V., Zhestovskaya E.S., Nazarov G.V., Maslov M.A.* // Fine Chem. Technol. 2020. V. 15. P. 7–27.
<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-1-7-27>
38. *Zuidam N.J., Barenholz Y.* // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1368. P. 115–128.
[https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(97\)00187-9](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(97)00187-9)
39. *Zuidam N.J., Hirsch-Lerner D., Margulies S., Barenholz Y.* // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1411. P. 207–220.
[https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00069-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00069-3)
40. *Balazs D.A., Godbey W.T.* // J. Drug Del. 2011. V. 2011. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2011/326497>
41. *Pisani M., Mobbili G., Bruni P.* // Non-Viral Gene Therapy. 2011. P. 319–348.
<https://doi.org/10.5772/21283>
42. *Gao X., Huang L.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. V. 179. P. 280–285.
[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)91366-k](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91366-k)
43. *Leventis R., Silvius J.R.* // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1023. P. 124–132.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90017-i](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90017-i)
44. *Hassan Farhood H., Natalya Serbina N., Leaf Huang L.* // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1235. P. 289–295.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)80016-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)80016-9)
45. *Mochizuki S., Kanegae N., Nishina K., Kamikawa Y., Koiwai K., Masunaga H., Sakurai K.* // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1828. P. 412–418.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.017>
46. *Luneva A.S., Puchkov P.A., Shmendel E.V., Zenkova M.A., Kuzevanov A.Yu., Alimov A.A., Karpukhin A.V., Maslov M.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 724–731.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019010084>
47. *Shmendel E.V., Bakhareva S.A., Makarova D.M., Chernikov I.V., Morozova N.G., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Maslov M.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 1250–1260.
<https://doi.org/10.1134/S106816202006031X>
48. *Perrie Y., Gregoriadis G.* // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1475. P. 125–132.
[https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(00\)00055-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(00)00055-6)
49. *Ma B., Zhang S., Jiang H., Zhao B., Lv H.* // J. Control. Rel. 2007. V. 123. P. 184–194.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.08.022>
50. *Nguyen L.T., Atobe K., Barichello J.M., Ishida T., Kiwada H.* // Biol. Pharm. Bull. 2007. V. 30. P. 751–757.
<https://doi.org/10.1248/bpb.30.751>
51. *Kabilova T.O., Shmendel E.V., Gladkikh D.V., Chernolovskaya E.L., Markov O.V., Morozova N.G., Maslov M.A., Zenkova M.A.* // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2018. V. 123. P. 59–70.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.11.010>
52. *Shmendel E.V., Kabilova T.O., Morozova N.G., Zenkova M.A., Maslov M.A.* // J. Drug Del. Sci. Technol. 2020. V. 57. P. 101609.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101609>
53. *Carmichael J., De Graff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B.* // Cancer Res. 1987. V. 47. P. 936–942.
54. *Zhdanov R.I., Podobed O.V., Vlasov V.V.* // Bioelectrochem. 2002. V. 58. P. 53–64.
[https://doi.org/10.1016/s1567-5394\(02\)00132-9](https://doi.org/10.1016/s1567-5394(02)00132-9)
55. *Dalby B., Cates S., Harris A., Ohki E.C., Tilkins M.L., Price P.J., Ciccarone V.C.* // Methods. 2004. V. 33. P. 95–103.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.11.023>

Influence of Liposome Composition on Plasmid DNA Delivery to Eukaryotic Cells

A. A. Mikhnev*, E. V. Shmendel**, G. V. Nazarov*, and M. A. Maslov**, #

#Phone: +7 (916) 386-99-82; e-mail: mamaslov@mail.ru

*Federal State Unitary Enterprise "Scientific Center "Signal", ul. Bolshaya Olenya 8, Moscow, 107014 Russia

**Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

Gene therapy is a promising method for the treatment of various diseases by introducing therapeutic nucleic acids, for the delivery of which cationic liposomes are widely used. This work demonstrates the ability of cationic liposomes consisting of a polycationic lipid 2X3 (1,26-bis(cholest-5-en-3 β -yloxy-carbonylamino)-7,11,16,20-tetraazagehexacosane tetrahydrochloride) and helper lipid DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine) at various ratios (2.5 : 1 (**L1**); 2 : 1 (**L2**); 1.5 : 1 (**L3**); 1 : 1 (**L4**); 1 : 1.5 (**L5**); 1 : 2 (**L6**); 1 : 2.5 (**L7**)) mediate the delivery of plasmid DNA (pDNA) into HEK293 cells with an efficiency higher than that of the commercial transfectant Lipofectamine 2000. We found that transfection activity of cationic liposomes depends on their composition and lipoplex composition (N/P ratio). Cationic liposomes were non-toxic into eukaryotic HEK293 cells and were more effective than Lipofectamine 2000 at the N/P ratios $\geq 6/1$. In this case, the highest efficiency was achieved for liposomes **L2**. At lower N/P ratios = 1/1, 2/1 and 4/1 liposomes **L1** can be used for provide targeted NA delivery into cells. Thus, for further *in vivo* experiments, non-toxic and small-size liposomes **L1** and **L2** in which the amount of lipid 2X3 was 2 or more times higher than that of lipid helper DOPE were selected.

Keywords: cationic lipids, transfection, liposomes, pDNA, non-viral delivery vehicles