



СИНТЕЗ И ТРАНСФИЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ДИСУЛЬФИДНЫХ ПОЛИКАТИОННЫХ АМФИФИЛОВ

© 2023 г. И. А. Петухов*, П. А. Пучков*[‡], Н. Г. Морозова*, М. А. Зенкова**[‡], М. А. Маслов*[‡]

*Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова,
МИРЭА – Российский технологический университет, Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

**Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 23.06.2022 г.

После доработки 18.07.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Осуществлен синтез новых поликатионных амфифилов, содержащих в своей структуре дисульфидную группу. На основе полученных соединений и липида-хелпера 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламина сформированы катионные липосомы, которые продемонстрировали отсутствие токсичности для клеток HEK293 и HeLa и высокую эффективность доставки флуоресцентно-меченого олигодезоксирибонуклеотида. Эффективность доставки плазмидной ДНК pEGFP-C2 зависела от клеточной линии и структуры амфифила, при этом липосомы на основе тетракатионных амфифилов оказались наиболее эффективными трансфектантами, которые могут быть использованы для трансфекции эукариотических клеток *in vitro*, а также для проведения дальнейших биологических испытаний *in vivo*.

Ключевые слова: поликатионные амфифилы, катионные липосомы, трансфекция, дисульфидные связи

DOI: 10.31857/S0132342323010232, **EDN:** GHNSNO

ВВЕДЕНИЕ

Быстрое развитие технологии рекомбинантных ДНК, методов переноса плазмидных ДНК в клетку и выяснение молекулярных основ многих заболеваний привело к возникновению новой области медицины – генной терапии. Этот метод лечения наследственных и приобретенных заболеваний основан на введении в клетки терапевтических нуклеиновых кислот (НК) с целью направленного устранения генетических дефектов или придания клеткам новых функций [1]. Главное условие успешного применения генной терапии – эффективная доставка НК в клетки-мишени и создание условий для ее длительного функционирования внутри клеток.

В настоящее время наиболее эффективными системами доставки НК считаются вирусные век-

торы [2], однако они имеют ряд серьезных недостатков. Это стимулирует разработку альтернативных подходов, одним из которых выступает липофекция – метод доставки НК с помощью катионных липосом (КЛ). К преимуществам катионных липосом относятся неинфекционность, способность переносить НК разного размера и защищать их от действия клеточных ферментов, а также стабильность при хранении и экономическая доступность [3]. В настоящее время КЛ, составляющие основу фармацевтических композиций, включающих НК, проходят клинические испытания для лечения ряда заболеваний [4], более того, КЛ используются в качестве платформ при создании мРНК-вакцин против COVID-19 [5]. Существенный недостаток известных на сегодняшний день систем доставки НК на основе липосом – их низкая эффективность, обусловленная наличием внеклеточных и внутриклеточных биологических барьеров [6], которые должен преодолеть НК-липидный комплекс (липоплекс), прежде чем НК проявит свою биологическую активность. К внеклеточным барьерам можно отнести неспецифическое взаимодействие липоплексов с компонентами крови и белками иммунной системы, в результате которых возможны дестабилизация липоплекса и преждевременное вы-

Сокращения: КЛ – катионные липосомы; НК – нуклеиновые кислоты; пДНК – плазмидная ДНК; CDI – 1,1'-карбонилдиимидазол; DOPE – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин; EGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок; FBS – эмбриональная бычья сыворотка; FITC-ODN – олигодезоксирибонуклеотид, меченый флуоресцеином; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид; ТВТУ – 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурион тетрафторборат.

[‡] Автор для связи: (тел.: +7 (499) 246-05-55 доб. 835; эл. почта: puchkov_pa@mail.ru, mamaslov@mail.ru).

свобождение НК, а основными внутриклеточными барьерами, приводящими к снижению эффективности доставки, выступают эндосомальная и ядерная мембраны.

Трансфицирующую активность катионного амфифила, а также его стабильность в биологических системах и токсичность определяет тип связывания гидрофобного и гидрофильного доменов. Устойчивые липиды с простой эфирной связью более токсичны по сравнению с ацильными липидами, которые легко гидролизуются в клетке эндогенными эстеразами. Наиболее удачное сочетание стабильности и токсичности амфифила обеспечивает карбамоильный линкер [7]. Кроме того, для увеличения эффективности высвобождения НК из эндосом и липоплекса в структуру катионных амфифилов вводят лабильные структурные модули, которые разрушаются под действием внутриклеточных факторов и агентов, приводя к дестабилизации липоплекса [8, 9]. Один из типов таких катионных амфифилов – липиды с дисульфидными связями, разрушаемые под действием внутриклеточных восстановителей (NADPH, глутатион, редуктазы) [10, 11].

Ранее в нашей лаборатории был синтезирован поликатионный амфифил **X2**, в структуре которого остаток холестерина был присоединен к первичной аминогруппе спермина через карбамоильный линкер [12]. Целью данной работы стал синтез новых поликатионных амфифилов **S1–S3** – аналогов амфифила **X2**, содержащих в своей структуре дисульфидную группу. Амфифилы **S1–S3** различаются линкером, связывающим спер-

мин и гидрофобный домен (сложноэфирный, карбамоильный), длиной спейсера, а также количеством катионных аммонийных групп (трикатионные и тетракатионные амфифилы). В работе проведена предварительная оценка способности катионных липосом, сформированных из амфифилов **S1–S3** и липида-хелпера 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэаноламина (DOPE), доставлять в эукариотические клетки короткие и протяженные нуклеиновые кислоты – синтетический олигодезоксирибонуклеотид и плазмидную ДНК (пДНК).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания поликатионных амфифилов в качестве основных структурных компонентов были выбраны природные соединения – холестерин и спермин (рис. 1). Известно, что катионные амфифилы, содержащие в качестве гидрофобного остатка холестерин, обладают высокой трансфицирующей активностью, низкой токсичностью и применяются для исследования механизмов слияния искусственных мембран и структурно-функционального изучения сформированных на их основе липоплексов [13]. Природные полиамины, в том числе спермин, способны упаковывать ДНК в тороидальные и стержневые структуры, при этом метиленовые фрагменты, разделяющие атомы азота, играют важную роль во взаимодействии полиамина с двойной спиралью ДНК. Среди липофильных полиаминов производные спермина наиболее эффективно связывают и упаковывают ДНК и поэтому лучше переносят ее в клетки. На

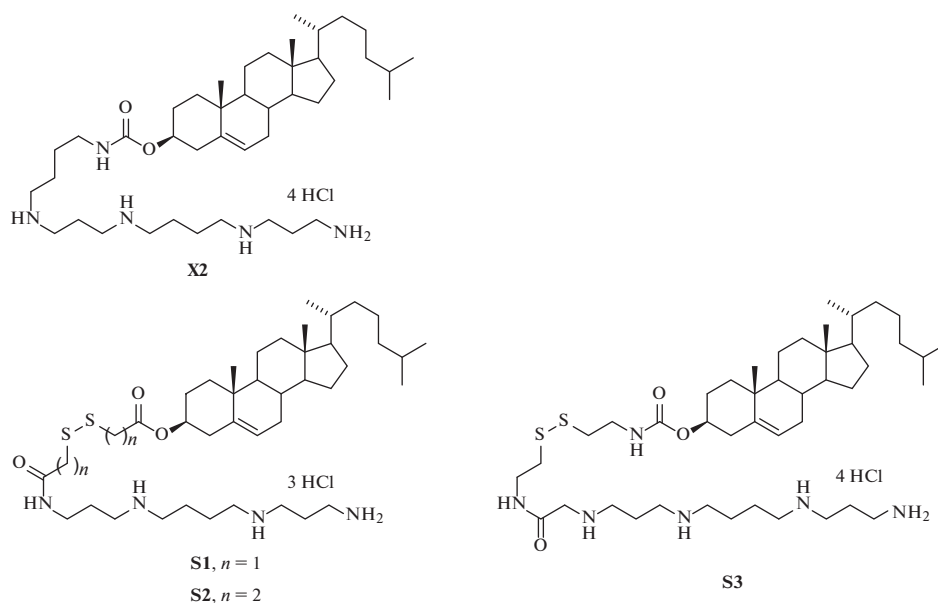


Рис. 1. Поликатионные амфифилы **X2** и **S1–S3** на основе спермина и холестерина.

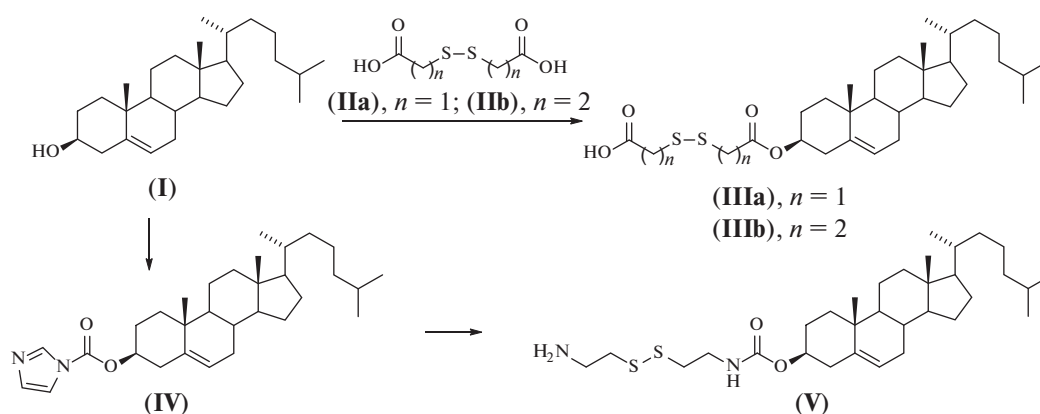


Рис. 2. Схема синтеза аминопроизводного холестерина (V).

основе спермина были созданы некоторые коммерческие препараты для трансфекции [14–16].

Один из наиболее простых способов получения амфифилов с дисульфидной связью заключается в присоединении к молекуле холестерина спейсера, содержащего дисульфидную группу. Такие спейсеры (IIa, b) были получены с количественными выходами окислением перекисью водорода 2-меркаптоуксусной и 3-меркаптопропионовой кислот соответственно [17].

Ацилирование холестерина (I) дитиодипропионовой (IIa) и дитиодипропионовой кислотами (IIb) с использованием в качестве конденсирующего агента *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида (DCC) в присутствии *N,N*-диметиламинопиридина (DMAP) приводило к получению производных холестерина (IIIa, b) со сложноэфирной связью между стероидным остатком и спейсером (рис. 2). Варьирование соотношениями реагентов показало, что использование двухкратного избытка дикарбоновых кислот (IIa, b) и 0.5 экв. DMAP приводит к образованию соединений (IIIa, b) с выходом 67 и 45% соответственно, тогда как при использовании других конденсирующих агентов (BOP, CDI, Вос₂O) выход соединений (IIIa, b) не превышал 10%.

Для создания амфифила с карбамоильным линкером холестерин (I) обрабатывали 1.1-кратным избытком 1,1'-карбонилдиимидазола (CDI), получая имидазолид (IV) [12], дальнейшее взаимодействие которого с избытком цистамина приводило к получению соединения (V) с выходом 59%.

Синтез дисульфидных трикатионных амфифилов (S1 и S2) осуществляли конденсацией три-Вос-защитенного спермина (VI) [18] и карбоксипроизводных холестерина (IIIa, b) с использованием различных активирующих агентов (рис. 3, табл. 1). Наибольший выход соединений (VIIa, b) был достигнут при использовании ТВТУ (2-(1*H*-

бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония тетрафторборат). После удаления Вос-защитных групп действием 4 н. хлористого водорода в диоксане получали трикатионные амфифилы (S1 и S2) с количественным выходом.

Для синтеза тетракатионного амфифила (S3) на первом этапе было получено карбоксипроизводное спермина (IX). Для этого проводили *N*-сульфонирование соединения (VI) под действием 1.2-кратного избытка 2-нитробензолсульфонилхлорида в присутствии триэтиламина, получая соответствующий амид, в результате последующего алкилирования которого метиловым эфиром бромуксусной кислоты получали соединение (VIII) с выходом 77% на две стадии. Последовательное удаление 2-нитробензолсульфонильной группы под действием 10-кратного избытка тиофенола в присутствии карбоната цезия и омыление метилового эфира раствором гидроксида натрия приводило к образованию соединения (IX) с выходом 85% (рис. 3).

Целевой тетракатионный амфифил (S3) получали конденсацией полиаминного синтона (IX) и аминопроизводного холестерина (V) в присутствии ТВТУ. После хроматографической очистки на силикагеле соединение (X) было выделено с выходом 92%. В результате последующего удаления Вос-групп получали целевой амфифил S3 с выходом 81%.

Изучение свойств полученного ряда соединений позволяет оценить влияние структуры дисульфидных катионных амфифилов на их цитотоксичность и трансфицирующую активность. Для этого методом гидратации липидной пленки [19] были получены КЛ, состоящие из поликатионных амфифилов S1, S2 или S3 и липида-хелпера DOPE в соотношении 1 : 1 (мольн.). Описанные ранее катионные липосомы X2-DOPE [20],

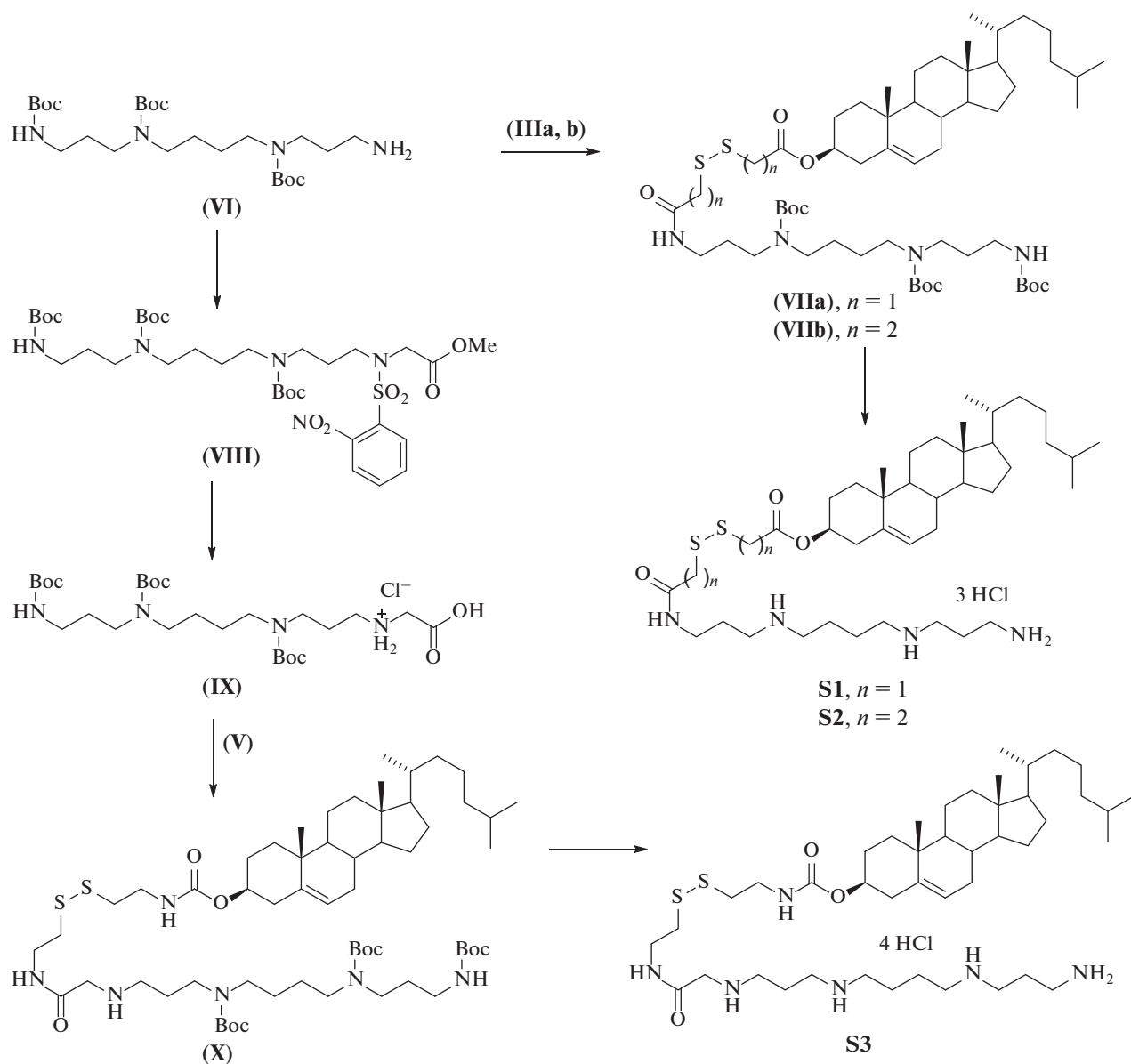


Рис. 3. Схема синтеза дисульфидных поликатионных амфифилов.

не содержащие дисульфидную связь, использовали во всех экспериментах для сравнения.

Цитотоксичность КЛ оценивали с помощью МТТ-теста на трех линиях эукариотических клеток (НЕК293, HeLa и ВНК21). Клетки инкубировали с КЛ в диапазоне концентраций 2.5–40.0 мкМ в течение 24 ч в присутствии 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS). Для клеток НЕК293 и HeLa значение IC_{50} (концентрация КЛ, при которой наблюдается гибель 50% клеток в популяции) было достигнуто только для липосом X2-DOPE (табл. 2). Клетки ВНК21 оказались более чувствительны к цитотоксическому действию КЛ, особенно S1-DOPE и S3-DOPE, тогда как наимень-

Таблица 1. Оптимизация условий синтеза соединений (VIIa, b)

Карбоксильная компонента	Конденсирующий агент	Выход соединений (VIIa, b), %
(IIIa)	ВОР	28
	DCC/DMAP	27
	ТВТУ	60
(IIIb)	ТВТУ	82

шей цитотоксичностью в отношении всех использованных линий клеток обладали липосомы S2-DOPE, содержащие трикатионный амфирил с более длинным спейсером.

Способность КЛ образовывать липоплексы при различных соотношениях N/P (отношение количества аминогрупп катионного амфирила к количеству фосфатных групп НК) — это важная характеристика, которая может оказывать значительное влияние на эффективность трансфекции. Для изучения эффективности связывания КЛ с НК был использован метод задержки в геле [21]. Для всех КЛ при соотношении N/P 2/1 наблюдалось неполное включение плазмидной ДНК рEGFP-C2, кодирующей усиленный зеленый флуоресцентный белок, в состав липоплекса, о чем свидетельствует наличие полосы свободной ДНК, мигрирующей в геле (рис. 4). При увеличении соотношения N/P до 4/1 для липосом X2-DOPE и S3-DOPE наблюдалось полное связывание пДНК, тогда как для липосом S1-DOPE и S2-DOPE полное связывание пДНК происходило при соотношениях N/P 6/1 и 8/1 соответственно. Таким образом, наименьшей эффективностью связывания обладают липосомы S2-DOPE: для этих КЛ полное связывание пДНК происходило только при N/P 8/1.

В качестве объектов для доставки в эукариотические клетки были выбраны неспецифичный короткий 25-звенный олигодезоксирибонуклеотид, меченный флуоресцеином по 5'-концу (FITC-ODN), и пДНК рEGFP-C2. Липоплексы формировали при разных соотношениях N/P, а эффективность накопления/доставки НК в клетках анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии, определяя и количество трансфицированных клеток, и уровень интенсивности флуоресценции клеток в популяции. Эксперименты проводили в присутствии 10% FBS в ростовой среде, поскольку известно, что наличие FBS в среде может влиять и на стабильность липоплек-

Таблица 2. Цитотоксичность катионных липосом

КЛ	IC ₅₀ , мкМ		
	HEK293	HeLa	ВНК21
X2-DOPE	37.8 ± 0.1	29.6 ± 2.0	18.8 ± 1.3
S1-DOPE	н.д.	н.д.	2.9 ± 0.3
S2-DOPE	н.д.	н.д.	31.1 ± 5.5
S3-DOPE	н.д.	н.д.	9.4 ± 0.5

Примечание: н.д. — значение IC₅₀ не было достигнуто в диапазоне концентраций 2.5–40.0 мкМ.

сов, образованных липосомами, и на их взаимодействие с клетками [22]. Эффективность доставки НК в клетки сравнивали с коммерческим препаратом Липофектамином 2000 (Lf2000).

В случае доставки FITC-ODN увеличение соотношения N/P приводило к увеличению числа трансфицированных клеток: наибольшую эффективность трансфекции проявляли липосомы S2-DOPE и S3-DOPE при соотношении N/P 3/1 (рис. 5). Следует отметить, что процент клеток, трансфицированных FITC-ODN, и в случае дисульфидных липосом (S2-DOPE и S3-DOPE), и в случае липосом X2-DOPE, нечувствительных к восстановлению, был примерно одинаковым, а средняя интенсивность флуоресценции в случае липосом S3-DOPE была существенно выше по сравнению со всеми остальными композициями, что говорит о более эффективном накоплении FITC-ODN в клетках.

Результаты трансфекции клеток HEK293 пДНК показали, что КЛ на основе дисульфидных трикатионных амфирилов S1 и S2 неэффективно доставляют пДНК в клетки (рис. 6а, 6б). Наибольшая трансфицирующая активность наблюдалась для липосом S3-DOPE и X2-DOPE при N/P 6/1, а дальнейшее увеличение количества ам-

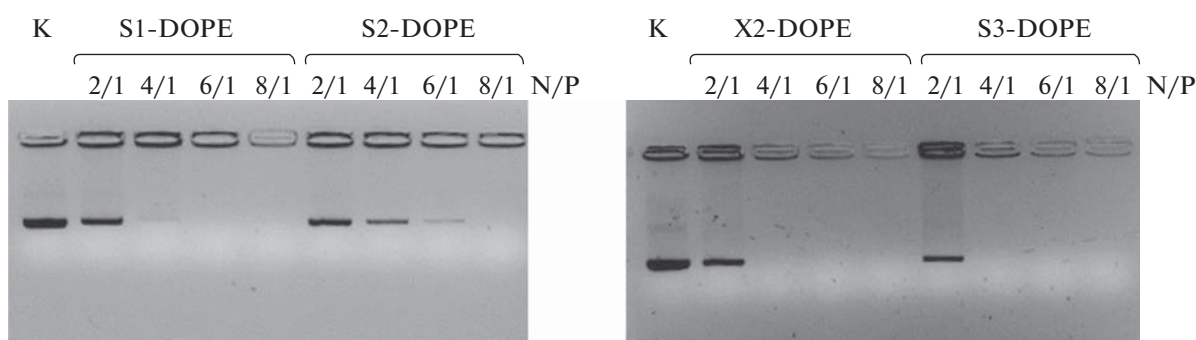


Рис. 4. Связывание катионных липосом с пДНК при разных соотношениях N/P, определенное методом задержки в геле. Электрофореграмма 1.5%-ного агарозного геля после разделения комплексов липосом с пДНК. Окрашивание бромистым этидием. К — свободная пДНК.

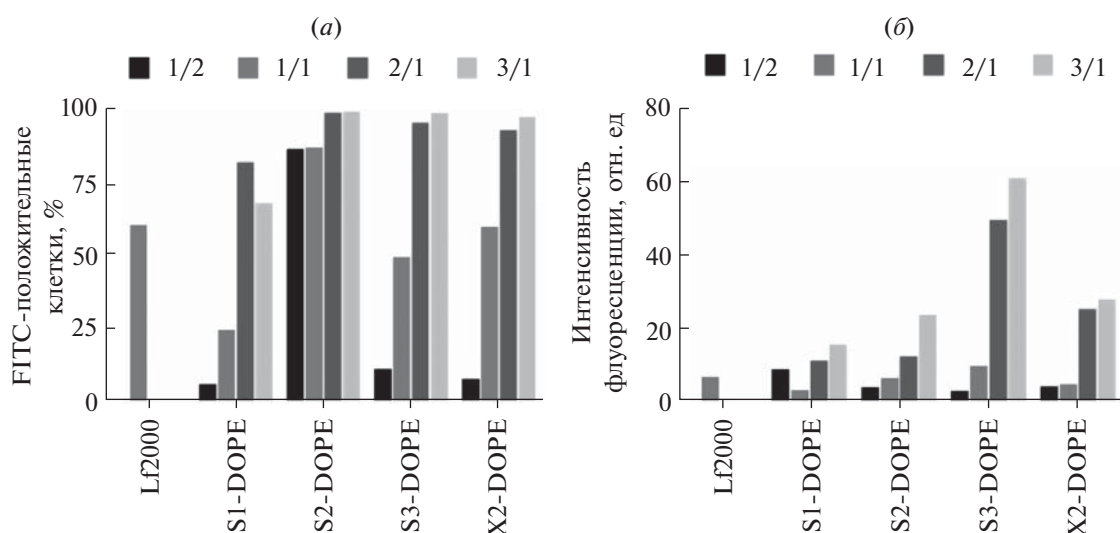


Рис. 5. Накопление флуоресцентно-меченого олигонуклеотида в клетках HEK293 в составе комплексов с катионными липосомами при различных соотношениях N/P в присутствии сыворотки крови в ростовой среде. Процент трансфицированных клеток (а) и средняя интенсивность флуоресценции клеток в популяции (б) определяли методом проточной цитометрии. Стандартное отклонение не превышало 7–9%.

фифила в липоплексе приводило к снижению эффективности доставки.

Аналогичный эксперимент по трансфекции клеток HeLa показал схожие результаты – наиболее эффективными были липосомы S3-DOPE и X2-DOPE на основе тетракаатионных амфифилов, причем эффективность доставки пДНК возрастала с увеличением количества катионных липосом в липоплексе. Тем не менее трансфицирующая активность КЛ S3-DOPE и X2-DOPE была ниже таковой для Липофектамина 2000. Доставка пДНК в клетки ВНК21 была менее эффективной. Возможно, это связано с меньшей скоростью деления клеток ВНК21 по сравнению с клетками HEK293 и HeLa [23]. В случае клеток ВНК21 только липосомы S3-DOPE обеспечивали сопоставимый с Липофектамином 2000 уровень трансфекции по числу EGFP-положительных клеток, но меньшую среднюю интенсивность флуоресценции клеточной популяции.

Влияние длины спейсера (амфифила S1 и S2) на эффективность доставки пДНК не было однозначно установлено. Различия в эффективности доставки разных типов НК обусловлены тем, что для FITC-ODN фиксируется сигнал флуоресценции после его проникновения в составе комплексов через плазматическую мембрану, тогда как для пДНК регистрируется интенсивность флуоресценции экспрессированного клетками белка EGFP после проникновения комплекса в цитозоль, высвобождения из эндосом и транспорта пДНК в ядро клетки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали растворители отечественного производства, а также DMF, карбонат калия, метиловый эфир бромуксусной кислоты, 2-нитробензолсульфонилхлорид, триэтиламин, 4 н. раствор HCl в диоксане (Aldrich, США); TBUTU, карбонат цезия (Fluka, США); тиофенол (Merck, Германия). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) в следующих системах: CHCl₃–MeOH, 10 : 0.6 (А), 40 : 1 (Б), 10 : 1 (В); CHCl₃–MeOH–PrⁿNH₂, 4 : 1 : 2 (Г); CHCl₃–MeOH–CH₃COOH, 200 : 1 : 0.3 (Д); CHCl₃–MeOH–CH₃COOH, 1 : 0.16 : 0.05 (Е); 1 : 0.12 : 0.05 (Ж). Пятна на хроматограммах обнаруживали с использованием раствора фосформolibденовая кислота–сульфат церия(IV) с последующим прогреванием при 120°C, паров хлора с последующим опрыскиванием раствором *o*-толуидина или при УФ-облучении (254 нм). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (0.040–0.063 мм; Merck, Германия). Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР регистрировали на импульсном Фурье-спектрометре DPX-300 (Bruker, Германия) в CDCl₃, если не указано иное (внутренний стандарт – тетраметилсилан). Значения химических сдвигов (δ) приведены в миллионных долях (м.д.), КССВ (*J*) – в герцах (Гц). Масс-спектры получали на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex (Bruker, Германия) методом лазерной десорбции/ионизации с использованием в качестве матрицы 2,5-дигидроксибензойной кислоты.

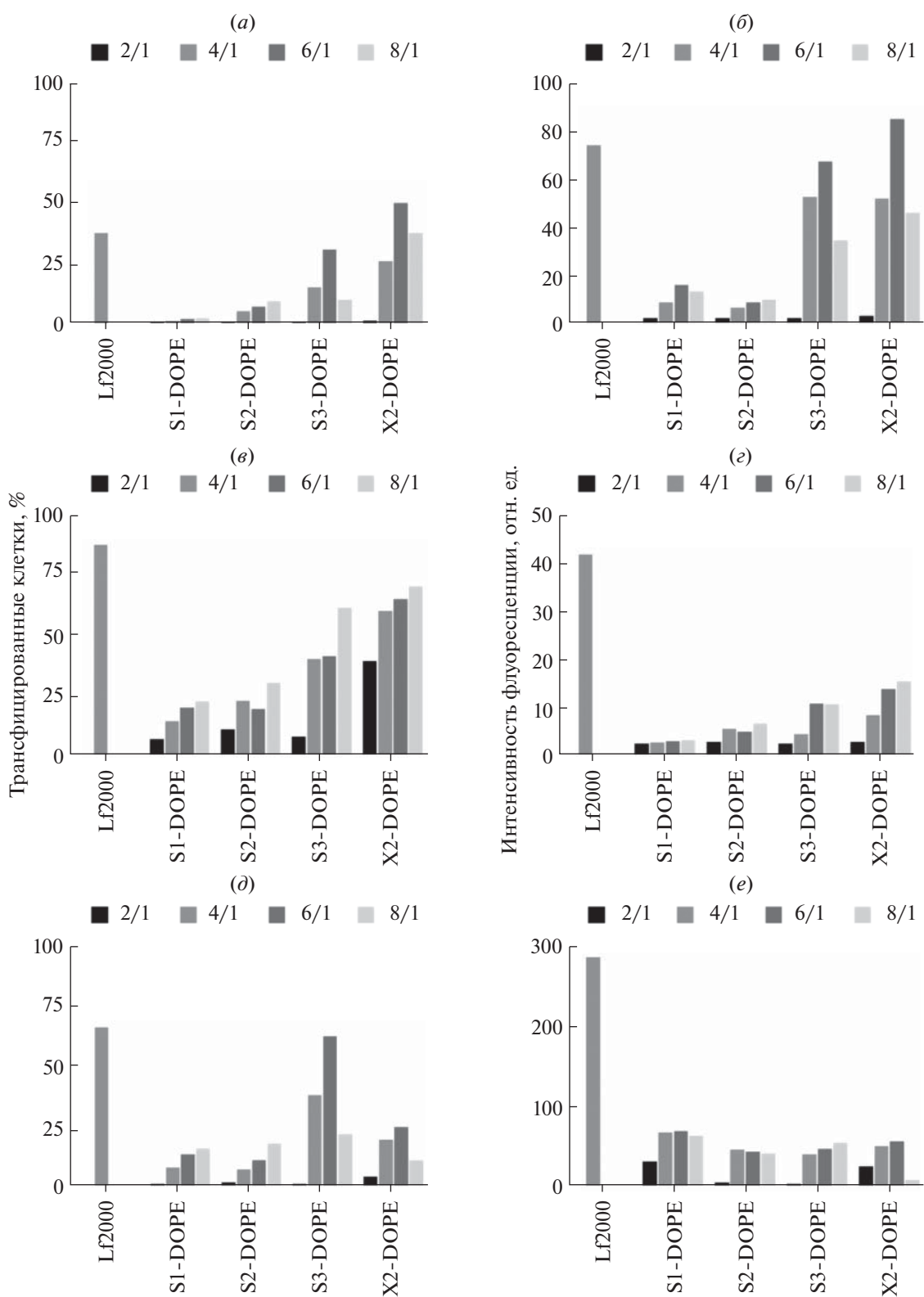


Рис. 6. Трансфекция клеток HEK293 (а, б), HeLa (в, г) и ВНК21 (д, е) комплексами катионных липосом с пДНК (pEGFP-C2) при различных соотношениях N/P. Процент трансфицированных клеток (а, в, д) и среднюю интенсивность флуоресценции клеток в популяции (б, г, е) определяли методом проточной цитометрии через 44 ч после трансфекции клеток по уровню экспрессии EGFP. Стандартное отклонение не превышало 7–9%.

Синтез имидазолида (IV) [12], N^1, N^4, N^9 -трет-бутоксикарбонил-1,12-диамино-4,9-дизадодекана (VI) [18], соединения (IIIa) [24] и амфифила X2 [12] осуществляли согласно описанным ранее методам.

3-[3-(Холест-5-ен-3 β -илоксикарбонил)пропил]дитиопропионовая кислота (IIIb). К раствору холестерина (I) (1.0 г, 2.59 ммоль) в безводном этилацетате (40 мл), охлажденному до 0°C, добавляли в атмосфере аргона дитиодипропионовую кислоту (1.09 г, 5.17 ммоль), DCC (1.067 мг, 5.17 ммоль), а затем DMAP (0.158 мл, 1.29 ммоль) и Et₃N (0.54 мл, 3.88 ммоль). Через 12 ч реакционную массу фильтровали, промывали 3%-ным водным раствором соляной кислоты (3 \times 30 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали, растворители удаляли в вакууме. После хроматографии на силикагеле (CHCl₃–MeOH–CH₃COOH, 25 : 0.1 : 0.03) получили соединение (IIIb) в виде кристаллов белого цвета (0.681 г, 45%). R_f 0.40 (Д). Масс-спектр, m/z : 601.217 [$M + Na$]⁺, вычислено для C₃₃H₅₄O₄S₂ 578.346 [M]⁺. Спектр ¹H-ЯМР: 0.67 (с, 3H, C(13)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.6, C(25)Me), 0.86 (д, 3H, J 6.6, C(25)Me), 0.91 (д, 3H, J 6.5, C(20)Me), 1.01 (с, 3H, C(10)Me), 0.95–1.70 (м, 21H, протоны Chol), 1.75–2.10 (м, 5H, протоны Chol), 2.26–2.40 (м, 2H, H₂C(4)), 2.70 (т, 2H, J 7.1, CH₂COOChol), 2.79 (т, 2H, J 7.5, CH₂COOH), 2.92 (т, 2H, J 7.1, CH₂S), 2.92 (т, 3H, J 7.5, CH₂S), 4.52–4.78 (м, 1H, H(3)), 5.30–5.45 (м, 1H, H(6)). Спектр ¹³C-ЯМР: 11.83, 18.69, 19.28, 21.00, 22.54, 22.80, 23.81, 24.26, 27.73, 27.98, 28.20, 31.82, 31.87, 32.70, 33.31, 33.86, 34.42, 35.76, 36.16, 36.54, 36.92, 38.04, 39.49, 39.69, 49.98, 56.11, 56.65, 74.54, 122.74, 139.45, 171.08, 177.59.

(Холест-5-ен-3 β -ил)-N-{2-[(2-аминоэтил)дитио]этил}карбамата гидрохлорид (V). К суспензии цистамина (1.98 г, 13.00 ммоль) в безводной смеси растворителей CH₂Cl₂–Et₃N–диоксан (30 : 10 : 10 мл) добавляли имидазолид (IV) (0.782 г, 1.63 ммоль) и перемешивали при кипении в течение 35 ч. Реакционную смесь фильтровали, промывали 3%-ным водным раствором HCl (3 \times 30 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали, растворители удаляли в вакууме. После хроматографии на силикагеле (CHCl₃–MeOH, 10 : 1) получили соединение (V) в виде кристаллов светло коричневого цвета (0.580 г, 59%). R_f 0.30 (В). Масс-спектр, m/z : 565.456 [$M - Cl$]⁺, вычислено для C₃₂H₅₇N₂O₂S₂: 565.386 [$M - Cl$]⁺. Спектр ¹H-ЯМР: 0.61 (с, 3H, C(13)Me), 0.79 (д, 3H, J 6.6, C(25)Me), 0.80 (д, 3H, J 6.6, C(25)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.2, C(20)Me), 0.94 (с, 3H, C(10)Me), 0.87–1.62 (м, 21H, протоны Chol), 1.65–2.07 (м, 5H, протоны Chol), 2.17–2.40 (м, 2H, H₂C(4)), 2.70–2.90 (м, 2H, CH₂NH₂), 2.79

(т, 2H, J 7.5, CH₂COOH), 2.92 (т, 2H, J 7.1, CH₂S), 2.92 (т, 3H, J 7.5, CH₂S), 2.90–3.17 (м, 2H, CH₂NHCOOChol), 3.17–3.60 (м, 4H, 2 CH₂S), 4.20–4.58 (м, 1H, H(3)), 5.22–5.40 (м, 1H, H(6)), 5.43–5.70 (м, 1H, NHCO), 7.00–7.50 (м, 3H, NH₂). Спектр ¹³C-ЯМР: 11.98, 18.84, 19.49, 21.19, 22.65, 22.90, 24.06, 24.41, 28.09, 28.35, 32.00, 35.81, 35.95, 36.34, 36.68, 37.14, 38.21, 38.75, 39.29, 39.63, 39.89, 50.11, 56.39, 56.81, 74.69, 122.65, 139.89, 156.44.

(Холест-5-ен-3 β -ил)-N¹¹, N¹⁶, N¹⁹-три-(трет-бутилоксикарбонил)-19-амино-6-оксо-3,4-дитиа-7,11,16-триазадодеканоат (VIIa). К раствору соединения (VI) (99 мг, 0.198 ммоль) в ДМФА (2.5 мл) последовательно добавляли соединение (IIIa) (0.131 г, 0.238 ммоль), ТВТУ (0.076 мг, 0.238 ммоль) и Et₃N (0.033 мл, 0.238 ммоль). Через 1 ч растворители удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью CHCl₃–MeOH, 100 : 1. Получили соединение (VIIa) в виде кристаллизующегося бесцветного масла (0.122 г, 60%). R_f 0.35 (Б). Спектр ¹H-ЯМР: 0.68 (с, 3H, C(13)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.86 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.91 (д, 3H, J 6.5, C(20)Me), 1.02 (с, 3H, C(10)Me), 0.90–2.10 (м, 34H, протоны Chol, 2 NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂(CH₂)₂CH₂N), 1.43 (с, 9H), 1.45 (с, 9H) и 1.50 (с, 9H, 3 C(CH₃)₃), 2.29–2.40 (м, 2H, H₂C(4)), 3.02–3.35 (м, 12H, 6 CH₂N), 3.47 (с, 2H, SCH₂COOChol), 3.54 (с, 2H, SCH₂CONH), 4.35–4.75 (м, 1H, H(3)), 5.27–5.40 (м, 1H, H(6)). Спектр ¹³C-ЯМР: 11.85, 18.72, 19.27, 21.05, 22.53, 22.77, 23.83, 24.27, 25.91, 27.70, 27.99, 28.19, 28.44, 28.47, 29.67, 31.88, 31.91, 33.94, 35.77, 36.20, 36.60, 36.95, 37.68, 38.00, 39.52, 39.75, 41.04, 41.71, 42.67, 44.11, 46.85, 49.14, 50.08, 56.20, 56.72, 75.76, 79.64, 122.99, 139.31, 156.01, 167.95, 169.08.

(Холест-5-ен-3 β -ил)-N¹³, N¹⁸, N²¹-три-(трет-бутилоксикарбонил)-21-амино-8-оксо-4,5-дитиа-9,13,18-триазагептаноат (VIIb). Получали как соединение (VIIa), исходя из соединения (VI) (0.158 г, 0.314 ммоль), соединения (IIIb) (0.218 г, 0.377 ммоль), ТВТУ (0.121 г, 0.377 ммоль) и Et₃N (0.053 мл, 0.377 ммоль). Получили соединение (VIIb) в виде кристаллизующегося бесцветного масла (0.178 г, 82%). R_f 0.4 (Б). Спектр ¹H-ЯМР: 0.68 (с, 3H, C(13)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.86 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.91 (д, 3H, J 6.5, C(20)Me), 1.02 (с, 3H, C(10)Me), 0.91–2.05 (м, 34H, протоны Chol, 2 NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂(CH₂)₂CH₂N), 1.46 (уш. с, 27H, 3 C(CH₃)₃), 2.27–2.37 (м, 2H, H₂C(4)), 2.58 (т, 2H, J 7.1, SCH₂CH₂COOChol), 2.70 (т, 2H, J 7.1, SCH₂CH₂CONH), 2.87–3.00 (м, 4H, 2 SCH₂), 3.07–3.40 (м, 12H, 6 CH₂N), 4.55–4.72 (м, 1H, H(3)), 5.33–5.40 (м, 1H, H(6)). Спектр ¹³C-ЯМР: 11.82, 18.67, 19.28, 20.98, 22.54, 22.80, 23.78, 24.24, 25.94, 27.17,

27.64, 27.72, 27.98, 28.19, 28.33, 28.41, 31.79, 31.86, 33.11, 33.82, 34.40, 35.75, 35.97, 36.13, 36.54, 36.91, 38.05, 39.47, 39.66, 42.94, 43.31, 46.66, 46.81, 49.95, 56.06, 56.63, 74.46, 79.92, 80.33, 122.74, 139.46, 157.02, 157.51, 170.66, 171.13.

(Холест-5-ен-3 β -ил)-19-амино-6-оксо-3,4-дигиа-7,11,16-триазадодеканоат тригидрохлорид (S1). К раствору соединения (VIIa) (0.055 г, 0.053 ммоль) в 3 мл CH_2Cl_2 добавляли 4 н. HCl в диоксане (1 мл) и перемешивали 1 ч при 24°C. Растворители удаляли в вакууме, остаток промывали CHCl_3 . Получили соединение S1 в виде аморфных бежевых кристаллов (0.030 г, 67%). R_f 0.85 (Г). Масс-спектр, m/z : 735.623 [$M - 3\text{HCl} + \text{H}$]⁺, вычислено для $\text{C}_{41}\text{H}_{77}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$: 735.528 [$M - 3\text{HCl} + \text{H}$]⁺. Спектр ¹H-ЯМР (CDCl_3 - CD_3OD , 1 : 5): 0.67 (с, 3H, C(13)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.86 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.92 (д, 3H, J 6.5, C(20)Me), 1.03 (с, 3H, C(10)Me), 0.91–2.05 (м, 34H, протоны Chol, 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.30–2.41 (м, 2H, $\text{H}_2\text{C}(4)$), 2.91–3.21 (м, 12H, 6 CH_2N), 3.46 (с, 2H, $\text{SCH}_2\text{COOChol}$), 3.55 (с, 2H, SCH_2CONH), 4.36–4.76 (м, 1H, H(3)), 5.28–5.41 (м, 1H, H(6)).

(Холест-5-ен-3 β -ил)-21-амино-8-оксо-4,5-дигиа-9,13,18-триазагенэйкозаноат тригидрохлорид (S2). Получали как соединение S1, исходя из соединения (VIIb) (0.05 г, 0.073 ммоль). Получили соединение S2 в виде аморфных белых кристаллов (0.048 г, 76%). R_f 0.86 (Г). Масс-спектр, m/z : 763.725 [$M - 3\text{HCl} + \text{H}$]⁺, вычислено для $\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$: 763.560 [$M - 3\text{HCl} + \text{H}$]⁺. Спектр ¹H-ЯМР (CDCl_3 - CD_3OD , 1 : 5): 0.68 (с, 3H, C(13)Me), 0.84 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.90 (д, 3H, J 6.5, C(20)Me), 1.01 (с, 3H, C(10)Me), 0.90–2.06 (м, 34H, протоны Chol, 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.27–2.37 (м, 2H, $\text{H}_2\text{C}(4)$), 2.59 (т, 2H, J 7.1, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{COOChol}$), 2.71 (т, 2H, J 7.1, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.88–3.21 (м, 16H, 2 SCH_2 , 6 CH_2N), 4.55–4.72 (м, 1H, H(3)), 5.33–5.40 (м, 1H, H(6)).

Метил- N' -[N^4, N^9, N^{12} -три-(*трет*-бутоксикарбонил)-12-амино-4,9-диазадодец-1-ил]- N' -(2-нитрофенилсульфонил)аминоацетат (VIII). К охлажденному до 0°C раствору соединения (VI) (0.431 г, 0.858 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (5 мл) добавляли молекулярные сита 4 Å (1.0 г) Et_3N (0.239 мл, 1.716 ммоль) и 2-нитробензолсульфонилхлорид (0.228 г, 1.02 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 24°C. Молекулярные сита отфильтровывали, промывали CH_2Cl_2 , растворители удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью CHCl_3 - MeOH (50 : 1). Получили N^4, N^9, N^{12} -три-

(*трет*-бутоксикарбонил)- N' -(2-нитрофенилсульфонил)-1,12-диамино-4,9-диазадодекан в виде кристаллизующегося масла (0.507 г, 88%). Масс-спектр, m/z : 710.295 [$M + \text{Na}$]⁺, вычислено для $\text{C}_{31}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{NaO}_{10}\text{S}$: 710.341 [$M + \text{Na}$]⁺. Спектр ¹H-ЯМР: 1.27 (уш. с, 3H, 3 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ и $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.52–1.71 (м, 4H, 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.92–3.11 (м, 8H, 4 NCH_2), 3.11–3.30 (м, 4H, 2 NHCH_2), 7.59–7.71 (м, 2H), 7.71–8.89 (м, 1H) и 8.00–8.11 (м, 1H, C_6H_4). Спектр ¹³C-ЯМР: 25.96, 28.54, 28.59, 28.93, 37.91, 41.03, 43.78, 44.23, 46.82, 47.05, 79.16, 79.74, 80.02, 125.25, 130.93, 132.68, 133.51, 148.29, 156.17.

К раствору N^4, N^9, N^{12} -три-(*трет*-бутоксикарбонил)- N' -(2-нитрофенилсульфонил)-1,12-диамино-4,9-диазадодекана (0.271 г, 0.394 ммоль) в безводном ДМФА (3 мл) последовательно добавляли Cs_2CO_3 (0.128 г, 0.394 ммоль) и метиловый эфир бромуксусной кислоты (0.149 мл, 1.58 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 3 ч при 75°C. К реакционной смеси добавляли 15 мл CH_2Cl_2 , промывали 5%-ной лимонной кислотой (3 × 20 мл), сушили над Na_2SO_4 , упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью CHCl_3 - MeOH (175 : 1). Получили соединение (VIII) в виде кристаллизующегося масла желтоватого цвета (0.270 г, 90%). R_f 0.51 (Б). Спектр ¹H-ЯМР: 1.26–1.46 (м, 4H, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.32 (с, 18H), 1.35 (с, 9H, 3 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.46–1.60 (м, 2H), 1.60–1.75 (м, 2H, 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.90–3.23 (м, 10H, 2 CH_2NCH_2 , NHCH_2), 3.23–3.37 (м, 2H, NCH_2CH_2), 3.54 (с, 3H, OCH_3), 4.10 (с, 2H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2$), 7.46–7.68 (м, 3H), 7.87–8.02 (м, 1H, C_6H_4). Спектр ¹³C-ЯМР: 25.87, 26.92, 28.46, 28.48, 37.63, 43.96, 44.49, 46.42, 46.75, 47.81, 52.27, 78.96, 79.59, 124.20, 130.86, 131.74, 133.13, 133.70, 148.04, 155.46, 156.07, 169.14.

2-[N^4, N^9, N^{12} -Три-(*трет*-бутоксикарбонил)-12-амино-4,9-диазадодец-1-ил]аминоуксусной кислоты гидрохлорид (IX). К раствору соединения (VIII) (0.178 г, 0.235 ммоль) в ДМФА (2 мл) при перемешивании добавляли K_2CO_3 (0.036 г, 0.258 ммоль), а затем PhSH (0.241 мл, 2.35 ммоль). Через 1 ч к реакционной массе добавляли 10 мл CH_2Cl_2 , промывали водой (15 мл), сушили над Na_2SO_4 , упаривали. После хроматографии на силикагеле CHCl_3 - MeOH -25%-ный водный NH_3 (5 : 0.1 : 0.01) получили метил- N' -[N^4, N^9, N^{12} -три-(*трет*-бутоксикарбонил)-12-амино-4,9-диазадодец-1-ил]аминоацетат в виде кристаллизующегося масла (0.116 г, 86%). R_f 0.33 (А). Масс-спектр, m/z : 575.456 [$M + \text{H}$]⁺, вычислено для $\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_8$: 575.404 [$M + \text{H}$]⁺. Спектр ¹H-ЯМР: 1.25–1.48 (м,

4H, NCH₂(CH₂)₂CH₂N), 1.34 (с, 9H), 1.35 (с, 9H), 1.36 (с, 9 H, 3 C(CH₃)₃), 1.48–1.70 (м, 4H, 2NCH₂CH₂CH₂N), 2.51 (т, 2H, J 7.0, NHCH₂CH₂), 2.91–3.25 (м, 10H, 2 CH₂NCH₂, NHCH₂), 3.31 (с, 2H, ОС(О)CH₂), 3.63 (с, 3H, ОСН₃). Спектр ¹³С-ЯМР: 25.52, 25.93, 28.39, 28.93, 37.36, 43.75, 44.10, 44.82, 46.80, 50.73, 51.66, 78.77, 79.20, 79.43, 155.51, 155.99, 172.79.

К раствору метил-*N*'-[*N*⁴,*N*⁹,*N*¹²-три-(*трет*-бутоксикарбонил)-12-амино-4,9-диазадодец-1-ил]аминоацетата (0.100 г, 0.174 ммоль) в MeOH (3 мл) при перемешивании добавляли NaOH (0.031 г, 0.783 ммоль) в 0.5 мл воды. Через 2 ч к реакционной массе добавляли 10 мл CH₂Cl₂, промывали 3%-ным водным раствором HCl (15 мл), сушили над Na₂SO₄, упаривали. Получили соединение (IX) в виде кристаллов белого цвета (105 мг, 100%). R_f 0.33 (E). Масс-спектр, *m/z*: 561.476 [*M* – Cl]⁺, вычислено для C₂₇H₅₃N₄O₈: 561.386 [*M* – Cl]⁺. Спектр ¹H-ЯМР (CD₃OD–CDCl₃, 1 : 5): 1.17–1.40 (уш. с, 31H, NCH₂(CH₂)₂CH₂N, 3 C(CH₃)₃), 1.40–1.60 (м, 2H), 1.70–1.93 (м, 2H, 2 NCH₂CH₂CH₂N), 2.63–2.82 (м, 2H, CH₂NH₂CH₂CO), 2.83–3.18 (м, 10H, 2 CH₂NCH₂, NHCH₂), 3.30 (с, 2H, ОС(О)CH₂). Спектр ¹³С-ЯМР: 24.21, 25.10, 27.59, 27.64, 28.16, 36.74, 42.78, 43.29, 43.67, 44.19, 45.79, 46.29, 49.07, 78.47, 79.18, 79.60, 155.73, 155.80, 155.85, 169.73.

***N*¹⁴,*N*¹⁹,*N*²²-Три-(*трет*-бутоксикарбонил)-*N*¹-(холест-5-ен-3β-илоксикарбонил)-1,22-диамино-8-оксо-3,4-дитиа-7,10,14,19-тетраазадокозан (X).** К охлажденному до 0°C раствору соединения (IX) (100 мг, 0.167 ммоль) в ДМФА (5 мл) последовательно добавляли ТВТУ (0.134 мг, 419 ммоль), раствор соединения (V) (0.302 мг, 0.502 ммоль), DIEA (0.146 мл, 0.837 ммоль) в ДМФА (2.5 мл). Через 2 ч к реакционной массе добавляли 20 мл CH₂Cl₂, промывали 3%-ным водным раствором HCl (2 × 15 мл), сушили над Na₂SO₄, упаривали. После хроматографии на силикагеле CHCl₃–MeOH (80 : 1) получили соединение (X) в виде кристаллизующегося масла (0.176 г, 92%). R_f 0.57 (Ж). Масс-спектр, *m/z*: 1107.867 [*M* – Cl]⁺, вычислено для C₅₉H₁₀₇N₆O₉S₂: 1107.754 [*M* – Cl]⁺. Спектр ¹H-ЯМР: 0.64 (с, 3H, C(13)Me), 0.83 (д, 3H, J 6.6, C(25)Me), 0.84 (д, 3H, J 6.6, C(25)Me), 0.88 (д, 3H, J 6.5, C(20)Me), 0.97 (с, 3H, C(10)Me), 0.85–1.70 (м, 36H, протоны Chol, NCH₂(CH₂)₂CH₂N, NCH₂CH₂CH₂NH₂CH₂CO), 1.40 (с, 9H), 1.41 (с, 9H) и 1.42 (с, 9H, 3 C(CH₃)₃), 1.70–2.07 (м, 7H, протоны Chol, NHCH₂CH₂CH₂N), 2.20–2.39 (м, 2H, H₂C(4)), 2.55 (т, 2H, J 6.5, CH₂NH₂CH₂CO), 2.76–2.84 (м, 4H, 2 CH₂S), 3.01–3.32 (м, 10H, 2 CH₂NCH₂,

NHCH₂), 3.21 (с, 2H, CH₂NH₂CH₂CO), 3.44 (кв, J 6.2, 2H, CH₂NHCOOChol), 3.57 (кв, J 6.3, 2H, CH₂OCONHCH₂), 4.30–4.58 (м, 1H, H(3)), 5.25–5.50 (м, 1H, H(6)). Спектр ¹³С-ЯМР: 11.93, 18.80, 19.40, 21.12, 22.63, 22.88, 23.91, 24.36, 25.98, 28.06, 28.25, 28.29, 28.52, 28.54, 28.56, 31.97, 31.98, 35.85, 36.27, 36.64, 37.08, 37.82, 37.94, 38.51, 38.64, 39.59, 39.83, 44.11, 46.73, 47.07, 50.12, 56.24, 56.78, 74.57, 79.07, 79.53, 79.64, 122.56, 139.87, 156.17, 156.18, 156.19.

1,22-Диамино-*N*¹-(холест-5-ен-3β-илоксикарбонил)-8-оксо-3,4-дитиа-7,10,14,19-тетраазадокозан (S3). К раствору соединения (X) (0.200 г, 0.146 ммоль) в 4 мл THF добавляли 4 н. HCl в диоксане (3 мл) и перемешивали 3 ч при 24°C. Растворители удаляли в вакууме, остаток промывали MeOH. Получили соединение S3 в виде белых кристаллов (0.155 г, 81%). R_f 0.35 (Г). Масс-спектр, *m/z*: 807.654 [*M* – 4HCl + H]⁺, вычислено для C₄₄H₈₆N₆O₃S₂: 807.597 [*M* – 4HCl + H]⁺. Спектр ¹H-ЯМР (D₂O): 0.65 (с, 3H, C(13)Me), 0.84 (д, 3H, J 6.6, C(25)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.6, C(25)Me), 0.87 (д, 3H, J 6.5, C(20)Me), 0.96 (с, 3H, C(10)Me), 0.85–1.70 (м, 38H, протоны Chol, NCH₂(CH₂)₂CH₂N, NCH₂CH₂CH₂NH₂CH₂CO), 1.70–2.07 (м, 5H, протоны Chol), 2.21–2.40 (м, 2H, H₂C(4)), 2.54 (т, 2H, J 6.5, CH₂NH₂CH₂CO), 2.77–2.84 (м, 4H, 2 CH₂S), 2.94–3.25 (м, 14H, 7 CH₂N), 3.45 (кв, J 6.2, 2H, CH₂NHCOOChol), 3.56 (кв, J 6.3, 2H, CH₂OCONHCH₂), 4.31–4.59 (м, 1H, H(3)), 5.24–5.49 (м, 1H, H(6)).

Катионные липосомы. К раствору поликатионного амфифила в смеси растворителей CHCl₃–MeOH (4 : 1 об.) добавляли раствор 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтанолamina (DOPE, Avanti Polar Lipids, США) в хлороформе в соотношении поликатионный амфирил–DOPE 1 : 1 (мольн.). Растворители удаляли в вакууме водоструйного насоса, образовавшуюся липидную пленку сушили 3 ч в вакууме масляного насоса (0.01 Торр), после чего добавляли деионизированную воду и гидратировали 4 ч при 24°C (концентрация по поликатионному амфирилу составляла 1 мМ). Образовавшуюся дисперсию обрабатывали на ультразвуковой бане (Bandelin Sonorex Digitec DT 52H, Германия) 15 мин при 60–65°C. Полученные катионные липосомы хранили при 4°C в атмосфере аргона.

Нуклеиновые кислоты. 25-Звенный олигодезоксирибонуклеотид с аминогексильным линкером на 5'-конце (5'-TACAGTGGGAATTGTATG-CСТАТТАТ-3') синтезировали фосфорамидатным методом и очищали с помощью ВЭЖХ (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск). Чи-

стоту олигонуклеотида проверяли с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ с 8 М мочевиной, она составляла 95–98%. FITC-мечение олигонуклеотида проводили, как описано ранее [25]. FITC-ODN выделяли с помощью ВЭЖХ (Alliance, США), используя колонку Waters XTerra и линейный градиент концентрации ацетонитрила (0–30%) в 50 мМ NaClO₄. Чистоту FITC-ODN проверяли с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ с 8 М мочевиной, она составляла 95–98%. Концентрацию олигонуклеотида измеряли с помощью спектрофотометра BioMate 3 (Thermo Electron Corporation, США). Раствор FITC-ODN хранили при –20°C.

В экспериментах по доставке плазмидной ДНК использовали плазмиду pEGFP-C2 (Clontech, Германия), кодирующую усиленный зеленый флуоресцентный белок.

Комплексы катионных липосом с нуклеиновыми кислотами. Для проведения трансфекции эукариотических клеток комплексы получали следующим образом: растворы катионных липосом (25 мкл) и нуклеиновых кислот (25 мкл) с концентрацией, соответствующей определенному соотношению N/P, смешивали в среде Opti-MEM® (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали 20 мин при 24°C.

Образование комплексов с ДНК исследовали с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле в нативных условиях при напряжении электрического поля 20 В/см в течение 30–45 мин. Гель окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете (254 нм).

Клеточные культуры. Клетки почки эмбриона человека HEK293 и цервикальной аденокарциномы HeLa были получены из Банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки почки эмбриона хомячка ВНК21 были любезно предоставлены профессором В.С. Прасоловым (Институт молекулярной биологии РАН, Москва). Клеточные линии HEK293, HeLa и ВНК21 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 100 ед./мл пеницилина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина, в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37°C. Клетки высаживали в 96-луночные (HeLa и ВНК21 – по 3 × 10³ клеток на лунку, HEK293 – по 1 × 10⁴ клеток на лунку) или 24-луночные планшеты (HeLa и ВНК21 – по 10⁵ клеток на лунку, HEK293 – по 1.2–1.7 × 10⁵ клеток на лунку) и давали им прикрепиться в течение 24 ч.

Цитотоксичность катионных липосом (МТТ-тест). Клетки HEK293, HeLa и ВНК21 культивировали в 96-луночных планшетах, как описано выше. Через 24 ч клеточную среду заменяли рас-

творами липосом в DMEM (150 мкл) в отсутствие сыворотки и инкубировали в атмосфере 5%-ного CO₂ в течение 4 ч при 37°C, после чего в лунки добавляли по 16 мкл FBS и дополнительно инкубировали 20 ч при 37°C. По окончании инкубации к клеткам без смены среды добавляли раствор МТТ (Sigma, США) до концентрации 0.5 мг/мл. Через 4 ч культуральную среду удаляли, кристаллы формазана растворяли в DMSO (100 мкл на лунку), определяли разницу между оптической плотностью при 620 и 570 нм (Multiscan RC, Labsystems, Финляндия). Поглощение в контроле (инкубация клеток в отсутствие КЛ) принимали за 100% живых клеток, количество живых клеток определяли относительно контроля. Значения IC₅₀ (концентрация липосом, при которой наблюдается гибель 50% клеток) определяли путем экстраполяции концентрационной зависимости. Результаты представлены как средние значения для трех независимых экспериментов.

Трансфекция клеток липopleксами, сформированными катионными липосомами и нуклеиновыми кислотами. Клетки высаживали в 24-луночные планшеты, как описано выше, и давали им прикрепиться в течение 24 ч. В день трансфекции культуральную среду заменяли на среду DMEM (200 мкл) с 10%-ной сывороткой крови (без антибиотиков). К клеткам добавляли комплексы пДНК (конечная концентрация 2 мкг/мл) или FITC-ODN (конечная концентрация 1 мкМ) с катионными липосомами, сформированными при различных соотношениях N/P, в 50 мкл OPTI-MEM и инкубировали в атмосфере 5%-ного CO₂ в течение 4 ч при 37°C. В случае FITC-ODN клетки анализировали сразу, в случае пДНК через 4 ч среду заменяли на DMEM с 10%-ной FBS (500 мкл) и дополнительно инкубировали при 37°C в течение 44 ч. Доставку нуклеиновых кислот с помощью Липофектамина 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) осуществляли согласно протоколу производителя (www.thermofisher.com).

Проточная цитометрия. Эффективность трансфекции клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. После инкубации клетки промывали фосфатно-солевым буфером, обрабатывали раствором трипсина в этом же буфере (0.5 мг/мл) в течение 2 мин при 37°C для открепления с поверхности лунки и суспендировали в среде сывороткой для ингибирования действия трипсина. Затем клетки переносили в пробирки, осаждали центрифугированием (Contron T42K, Centricon Instruments, Италия) при 1000 об/мин (200 g) в течение 10 мин, удаляли среду и дважды промывали фосфатно-солевым буфером. Затем клетки фиксировали в 600 мкл 2%-ного раствора формальдегида. Количество трансфицированных клеток и

среднее значение интенсивности флуоресценции в клеточной популяции измеряли на цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием программы СХР Analysis (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали не менее 20 тыс. клеток. Все экспериментальные точки были получены в результате трех независимых экспериментов. Стандартное отклонение не превышало 7–9%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы новые дисульфидные амфифилы на основе холестерина и спермина, отличающиеся способом присоединения спермина к гидрофобному домену (сложноэфирный или карбамоильный линкер), длиной спейсера, а также количеством катионных аммонийных групп. Катионные липосомы на основе полученных соединений оказались нетоксичными для клеток НЕК293 и HeLa и полностью связывали плазмидную ДНК в НК-липидном комплексе. Липосомы S3-DOPE, содержащие тетракационный дисульфидный амфифил, продемонстрировали высокую трансфицирующую активность, которая в зависимости от клеточной линии была сопоставима с эффективностью Липофектамина 2000 и липосом X2-DOPE, нечувствительных к восстановлению, или превышала таковую. Липосомы S3-DOPE могут быть использованы для трансфекции эукариотических клеток *in vitro*, а также проведения дальнейших биологических испытаний *in vivo*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования РТУ МИРЭА в рамках Соглашения № 075-15-2021-689 от 01.09.2021.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (проект № 0706-2020-0019) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-03-00995а).

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. Sung Y.K., Kim S.W. // *Biomater. Res.* 2019. V. 23. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1186/S40824-019-0156-z>
2. Ni R., Zhou J., Hossain N., Chau Y. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. V. 106. P. 3–26.
<https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2016.07.005>
3. Lan T., Que H., Luo M., Zhao X., Wei X. // *Mol. Cancer.* 2021. V. 21. P. 71.
<https://doi.org/10.1186/s12943-022-01550-8>
4. Beltrán-Gracia E., López-Camacho A., Higuera-Ciappara I., Velázquez-Fernández J.B., Vallejo-Cardona A.A. // *Cancer Nanotechnol.* 2019. V. 10. P. 1–40.
<https://doi.org/10.1186/S12645-019-0055-Y>
5. Patel R., Kaki M., Potluri V.S., Kahar P., Khanna D. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2022. V. 18. P. 2002083.
<https://doi.org/10.1080/21645515.2021.2002083>
6. Gottfried L.F., Dean D.A. // *Extracellular and Intracellular Barriers to Non-Viral Gene Transfer. In Novel Gene Therapy Approaches / Ed. Wei M. London: Intech, 2013. P. 75–88.*
7. Puchkov P.A., Maslov M.A. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. P. 920.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060920>
8. Yu C., Li L., Hu P., Yang Y., Wei W., Deng X., Wang L., Tay F.R., Ma J. // *Adv. Sci.* 2021. V. 8. P. 2100540.
9. Zhang X.X., McIntosh T.J., Grinstaff M.W. // *Biochimie.* 2012. V. 94. P. 42–58.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.05.005>
10. Chen X., Yang J., Liang H., Jiang Q., Ke B., Nie Y. // *J. Mater. Chem. B.* 2017. V. 5. P. 1482–1497.
<https://doi.org/10.1039/C6TB02945K>
11. Liu J., Chang J., Jiang Y., Meng X., Sun T., Mao L., Xu Q., Wang M. // *Adv. Mater.* 2019. V. 31. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1002/adma.201902575>
12. Петухов И.А., Маслов М.А., Морозова Н.Г., Серебряникова Г.А. // *Известия Академии наук. Серия химическая.* 2010. № 1. С. 254–261.
13. Sebyakin Y.L., Budanova U.A., Guryeva L.Y. // *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2007. V. 1. P. 212–218.
<https://doi.org/10.1134/S1990747807030038>
14. Goyal P., Goyal K., Kumar S.G.V., Singh A., Katare O.P., Mishra D.N. // *Acta Pharm.* 2005. V. 55. P. 1–25.
15. Masotti A., Mossa G., Cametti C., Ortaggi G., Bianco A., Grosso N.D., Malizia D., Esposito C. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2009. V. 68. P. 136–144.
<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2008.09.017>
16. Byk T., Haddada H., Vainchenker W., Louache F. // *Hum. Gene Ther.* 1998. V. 9. P. 2493–2502.
<https://doi.org/10.1089/hum.1998.9.17-2493>
17. Shen G., Rajan R., Zhu J., Bell C.E., Pei D. // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. P. 3003–3011.
<https://doi.org/10.1021/jm060047g>
18. Miller K.A., Kumar E.V.K.S., Wood S.J., Cromer J.R., Datta A., David S.A. // *J. Med. Chem.* 2005. V. 48.

- P. 2589–2599.
<https://doi.org/10.1021/jm049449j>
19. *Elsana H., Olusanya T.O.B., Carr-Wilkinson J., Darby S., Faheem A., Elkordy A.A.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51065-4>
20. *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>
21. *Aljaberi A., Spelios M., Kearns M., Selvi B., Savva M.* // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2007. V. 57. P. 108–117.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.01.012>
22. *Sebastiani F., Yanez Arteta M., Lindfors L., Cárdenas M.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2022. V. 610. P. 766–774.
<https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2021.11.117>
23. *Ivanković M., Čukušić A., Gotić I., Škrobot N., Matijašić M., Polančec D., Rubelj I.* // *Biogerontology.* 2007. V. 8. P. 163–172.
<https://doi.org/10.1007/s10522-006-9043-9>
24. *Tang F., Hughes J.A.* // *Bioconjug. Chem.* 1999. V. 10. P. 791–796.
<https://doi.org/10.1021/BC990016I>
25. *Yong-Hee K., You Han Bae, Sung Wan Kim* // *J. Control. Release* 1994. V. 28. P. 143–152.
[https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)90161-9](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)90161-9)

Synthesis and Transfection Efficiency of Disulfide Polycationic Amphiphiles

I. A. Petukhov*, P. A. Puchkov*, #, N. G. Morozova*, M. A. Zenkova**, and M. A. Maslov*, #

Phone: +7 (499) 246-05-55 ad. 835; e-mail: puchkov_pa@mail.ru, mamaslov@mail.ru

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

**Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
prosp. Akad. Lavrentyeva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

The synthesis of new polycationic amphiphiles containing a disulfide group in their structure has been carried out. Cationic liposomes were formed on the basis of the obtained compounds and helper lipid 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine, which demonstrated the absence of toxicity to HEK293 and HeLa cells and high delivery efficiency of fluorescently labeled oligodeoxyribonucleotide. The efficiency of plasmid DNA delivery depended on the cell line and structure of the amphiphile, with liposomes based on tetracationic amphiphiles being the most effective transfectants. These liposomes may be used for *in vitro* transfection of eukaryotic cells as well as for further *in vivo* biological tests.

Keywords: polycationic amphiphiles, cationic liposomes, transfection, disulfide bonds