



ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ ДЛЯ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ¹

© 2019 г. А. С. Лулева*, П. А. Пучков*, Е. В. Шмендель*, М. А. Зенкова**, А. Ю. Кузеванова***, А. А. Алимов***, А. В. Карпухин***, М. А. Маслов*,#

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

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

***Медико-генетический научный центр, Россия, Москва, ул. Москворечье, 1

Поступила в редакцию 30.05.2018 г.

После доработки 18.06.2018 г.

Принята к печати 29.06.2018 г.

Катионные липосомы на основе катионного липида 1,26-бис(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7,11,16-2-тетраазагексакозан тетрагидрохлорида (2X3) и липида-хелпера 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламина (DOPE) получены двумя способами: ультразвуковой обработкой и экструзией дисперсии липидов. Изучено влияние способа получения и типа водной фазы на физико-химические характеристики катионных липосом и их биологическую активность. Оптимизация процесса получения катионных липосом позволила определить технологические параметры, обеспечивающие воспроизводимость физико-химических характеристик липосом от серии к серии.

Ключевые слова: генная терапия, липиды, катионные липосомы, трансфекция, доставка нуклеиновых кислот

DOI: 10.1134/S0132342319010093

ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия – это один из перспективных методов лечения наследственных и приобретенных заболеваний человека на молекулярном уровне, который активно развивается в последние годы [1, 2]. Механизм ее действия основан на доставке экзогенных терапевтических нуклеиновых кислот в клетки-мишени. Как правило, генно-терапевтические лекарственные средства состоят из действующего вещества – нуклеиновых кислот (плазмидные ДНК, малые интерферирующие РНК, антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, аптамеры, ДНК-энзимы) и транспортного средства, обеспечивающего их доставку в

клетки-мишени. Для достижения максимального терапевтического эффекта нуклеиновых кислот необходимо создать транспортные средства, которые будут эффективно доставлять генетический материал в клетку, оказывая при этом минимальное токсическое воздействие на организм. Катионные липосомы являются одной из перспективных систем доставки, обладающей рядом преимуществ по сравнению с вирусными системами: они не инфекционны, не иммуногенны, способны переносить короткие и протяженные нуклеиновые кислоты и защищать их от инактивации ферментами [3–5].

На сегодняшний день известны различные типы катионных липосом, обеспечивающих доставку нуклеиновых кислот в клетки. Причем разные нуклеиновые кислоты нуждаются в создании индивидуальных липосом с определенными физико-химическими параметрами. Для решения этих задач необходима разработка оптимальных методов получения катионных липосом и их комплексов с нуклеиновыми кислотами, обеспечивающих высокую эффективность и стабильность полученных частиц.

¹ Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на конференции “Липиды XXI века. Первая четверть”, 22–23 октября 2018 г., г. Москва.

Сокращения: 2X3 – 1,26-бис(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7,11,16-2-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид; DOPE – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин; EGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок; FBS – эмбриональная бычья сыворотка; PBS – фосфатно-солевой буфер, pH 7.6; siРНК – малая интерферирующая РНК; ОДН – олигодезоксирибонуклеотид; пДНК – плазмидная ДНК; ПААГ – полиакриламидный гель.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 600-82-02; эл. почта: maslov@mail.ru).

Таблица 1. Физико-химические характеристики катионных липосом (I–III)

Образец	Дзета-потенциал, мВ	Средний диаметр, нм	Индекс полидисперсности
(I)	50 ± 4	85 ± 1	0.269 ± 0.008
(II)	60 ± 1	154 ± 2	0.179 ± 0.043
(III)	89 ± 5	80 ± 24 329 ± 66	0.332 ± 0.021

Физико-химические характеристики липосом (размер, дзета-потенциал) значительно отличаются в зависимости от липидного состава и способа получения липосом [6, 7]. Размер липосом может варьировать от 25 нм до 2.5 мкм. Однако оптимальный размер наночастиц, предназначенных для системного введения в организм, составляет от 10 до 100 нм, поскольку более крупные частицы захватываются в организме ретикулоэндотелиальной системой, а небольшие частицы (менее 10 нм) быстро выводятся почками [8]. Одним из ключевых параметров, определяющих эффективность доставки катионных липосом в клетки, является их заряд, который должен быть положительным и обеспечивать взаимодействие липосом как с отрицательно заряженной нуклеиновой кислотой, так и последующее взаимодействие положительно заряженных комплексов с отрицательно заряженной мембраной эукариотических клеток [9, 10]. Кроме того, эффективность доставки напрямую зависит от способности катионных липосом обеспечивать компактизацию и полное включение нуклеиновых кислот в состав комплексов.

Целью нашего исследования была оптимизация технологии получения катионных липосом, которая включала исследование их физико-химических характеристик и биологической активности в зависимости от метода получения, типа водной фазы и ряда технологических параметров получения.

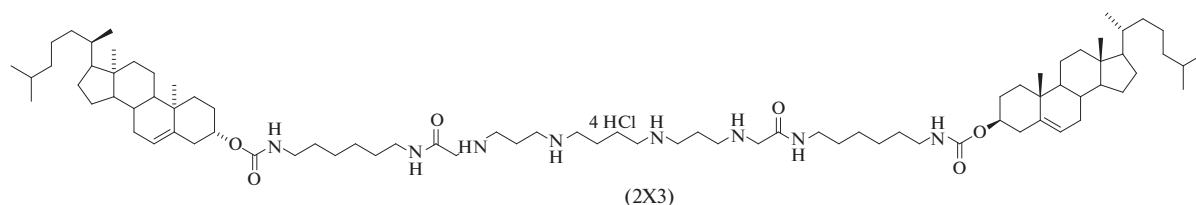
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве компонентов катионных липосом были использованы поликатионный липид 1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16-2-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид

(2X3) (рис. 1) и липид-хелпер 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), который работает как коадъювант трансфекции [11–15]. Для формирования липосом липиды 2X3 и DOPE были взяты в мольном соотношении 1 : 1. В качестве водной фазы использовались стерильная вода или раствор Рингера.

На первом этапе был проведен выбор способа получения липосом и типа водной фазы, поскольку оба эти фактора напрямую влияют на физико-химические и биологические свойства липосом. Липосомы получали двумя способами: ультразвуковой (УЗ) обработкой и экструзией [16]. Первый способ включал в себя УЗ обработку липидной дисперсии, полученной в результате гидратации липидной пленки, второй способ – продавливание (экструзию) липидной дисперсии через поликарбонатные фильтры с размером пор 100 нм. Было получено три образца катионных липосом, а именно: образец (I) приготовлен в стерильной воде методом УЗ обработки, образец (II) приготовлен в стерильной воде методом экструзии, образец (III) приготовлен в растворе Рингера методом УЗ обработки.

С помощью метода динамического лазерного светорассеяния были определены размеры и дзета-потенциалы катионных липосом (I)–(III). Липосомы (I) имели средний размер 85 ± 1 нм, липосомы (II) – 154 ± 2 нм. Индексы полидисперсности этих образцов свидетельствуют об образовании основной фракции частиц с узким распределением по размерам (табл. 1). Образец (III) характеризовался наличием двух фракций частиц (80 ± 24 и 329 ± 66 нм), при этом относительное количество частиц меньшего размера значительно превышало количество частиц большего размера (71.5%). Все липосомы (I)–(III) были положительно заряжены (табл. 1). Разница в

**Рис. 1.** Структурная формула катионного липида (2X3).

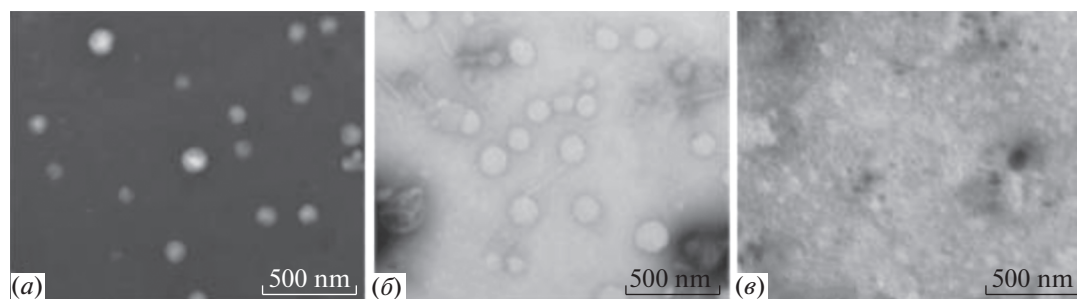


Рис. 2. Электронные микрофотографии образцов катионных липосом: образец (I) приготовлен в стерильной воде методом ультразвуковой обработки (а); образец (II) приготовлен в стерильной воде методом экструзии (б); образец (III) приготовлен в растворе Рингера методом ультразвуковой обработки (в).

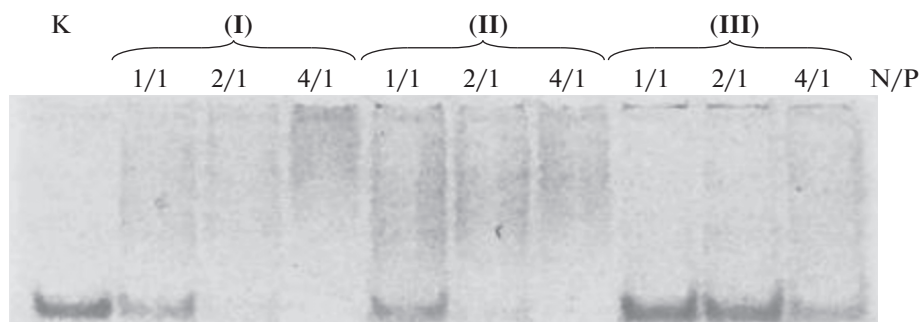


Рис. 3. Связывание катионных липосом с олигодезоксирибонуклеотидом (ОДН) при различных соотношениях N/P. Электрофореграмма 12% нативного ПААГ после разделения комплексов липосомы–ОДН; К – свободный ОДН.

значениях дзета-потенциалов связана с ионной силой растворов, в которых были приготовлены липосомы.

Коллоидная стабильность липосом в процессе длительного хранения является важным параметром, влияющим на эффективность доставки нуклеиновых кислот в клетки [17]. Согласно мониторингу физико-химических характеристик липосом, образцы (I), (II) оставались стабильными в течение 46 недель. Для липосом (III) наблюдалось увеличение диаметра частиц фракции большего размера до 700 нм, а также увеличение значений индекса полидисперсности в период с 6 по 12 неделю. Нестабильность полученного образца может объясняться агрегированием частиц, обусловленным наличием неорганических солей в растворе Рингера.

Согласно данным трансмиссионной электронной микроскопии, липосомы (I), полученные УЗ обработкой, имели сферическую форму; средний диаметр частиц составлял около 90 нм (рис. 2). Экструзионные липосомы (II) имели средний диаметр около 150 нм. Липосомы (III), приготовленные в растворе Рингера, представляли собой частицы неопределенной формы и размера, при этом наименьший размер частиц составлял около 30 нм.

Для оценки биологической активности полученных образцов липосом необходимо было определить соотношение компонентов комплексов N/P (отношение количества аминогрупп катионного липида к количеству фосфатных групп нуклеиновой кислоты), при котором происходит полное включение нуклеиновой кислоты в комплекс. Способность катионных липосом образовывать комплексы с различными типами нуклеиновых кислот была изучена с помощью метода задержки в геле (гель-электрофорез в нативных условиях) и флуоресцентной спектроскопии [18].

Согласно полученным данным (рис. 3), при соотношении N/P, равном 1/1, не более 50% олигодезоксирибонуклеотида (см. Эксперим. часть) включается в комплекс с катионными липосомами (I) и (II). Увеличение количества липосом (I) и (II) в составе комплекса (N/P = 2/1 и 4/1) приводит к полному включению олигонуклеотида в его состав. В случае липосом (III) включение олигонуклеотида в комплексы при всех использованных соотношениях N/P было лишь незначительным. Аналогичные результаты были получены при исследовании связывания катионных липосом (I)–(III) с плазмидной ДНК (пДНК) (данные не приведены).

При взаимодействии липосом (I)–(III) с ДНК тимуса теленка долю свободной нуклеиновой

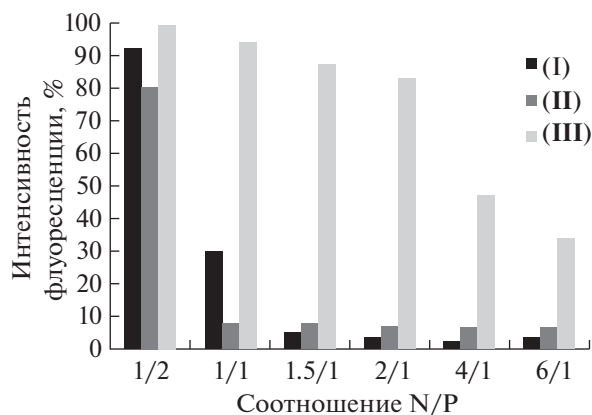


Рис. 4. Связывание катионных липосом с ДНК тимуса теленка при различных соотношениях N/P. Данные флуоресцентного титрования.

кислоты определяли методом флуоресцентной спектроскопии. В качестве интеркалирующей метки использовали этидий бромид. Проведенный анализ показал, что эффективность включения ДНК в состав комплекса определяется как типом препарата, так и соотношением зарядов (N/P). При соотношении N/P = 1/2 и 1/1 количество этидия бромида, связанного с ДНК, оставалось значительным, что свидетельствует о неполном связывании ДНК с липосомами (рис. 4). Увеличение количества катионных липосом приводило к вытеснению метки липосомами и тушению флуоресценции. Для образцов (I) и (II) полное включение ДНК в состав комплексов наблюдалось при соотношении N/P = 1.5/1, в то время как для липосом (III) взаимодействие с ДНК при всех исследуемых соотношениях N/P было незначительным.

Оценку трансфицирующей активности катионных липосом (I)–(III) проводили в ходе эксперимента по доставке малой интерферирующей РНК (siРНК), мишенью которой является мРНК гена *LIVIN*, в клетки карциномы НТ-29. Продукт гена *LIVIN* – один из ингибиторов апоптоза – экспрессируется в злокачественных опухолях и рассматривается в качестве перспективной мишени для таргетной терапии с использованием siРНК [19]. Анализ эффективности доставки показал, что при соотношениях N/P, равных 4/1 и выше (рис. 5), при которых зафиксировано полное включение нуклеиновых кислот в состав комплексов по данным электрофореза и флуоресцентной спектроскопии, наибольшей активностью обладали катионные липосомы (I). Они доставляли siРНК в 90% клеток. Эффективность липосом (II) и (III) была в 2–4 раза ниже, несмотря на способность липосом (III) образовывать комплексы с нуклеиновой кислотой. Дальнейшие исследования проводили с липосомами (I), которые

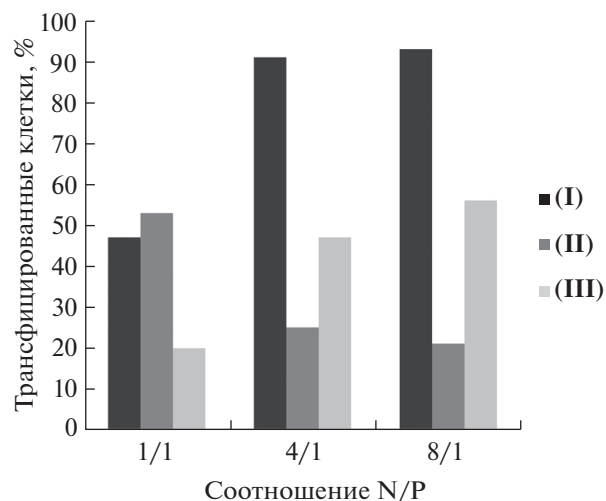


Рис. 5. Трансфекция клеток НТ-29 комплексами катионных липосом (I)–(III) с siРНК при различных соотношениях N/P.

проявили наибольшую трансфицирующую активность среди образцов липосом (I)–(III).

На втором этапе работы проводили оценку влияния на физико-химические характеристики образующихся частиц таких технологических параметров получения липосом (I) как температура и время УЗ обработки. Мы показали, что увеличение времени озвучивания от 5 до 20 мин приводит к уменьшению среднего диаметра липосом от 147 до 90 нм (рис. 6а). Для дальнейшей оптимизации нами были выбраны два режима озвучивания: 10 и 15 мин. Увеличение температуры озвучивания в пределах одного временного интервала, начиная с 65°C, не влияло на размер образующихся липосом, а наименьшим размером обладали липосомы, приготовленные УЗ обработкой в течение 15 мин (рис. 6б, в). С помощью трансмиссионной электронной микроскопии была установлена и подтверждена морфология катионных липосом (рис. 6г), которые представляли собой сферические частицы диаметром от 30 до 90 нм.

Для оценки влияния времени и температуры озвучивания на трансфицирующую активность катионных липосом проводили эксперименты по доставке плазмидной ДНК (пДНК) pEGFP-C2, кодирующей усиленный зеленый флуоресцентный белок, в клетки НЕК 293, а также по доставке siРНК, направленной к мРНК EGFP, в трансгенные клетки ВНК IR780, стабильно экспрессирующие усиленный зеленый флуоресцентный белок. Эффективность доставки пДНК или siРНК анализировали с помощью проточной цитометрии, в первом случае определяя количество EGFP-положительных клеток в популяции, то есть тех клеток, в которые была доставлена пДНК и прошла экспрессия белка EGFP, и средние значе-

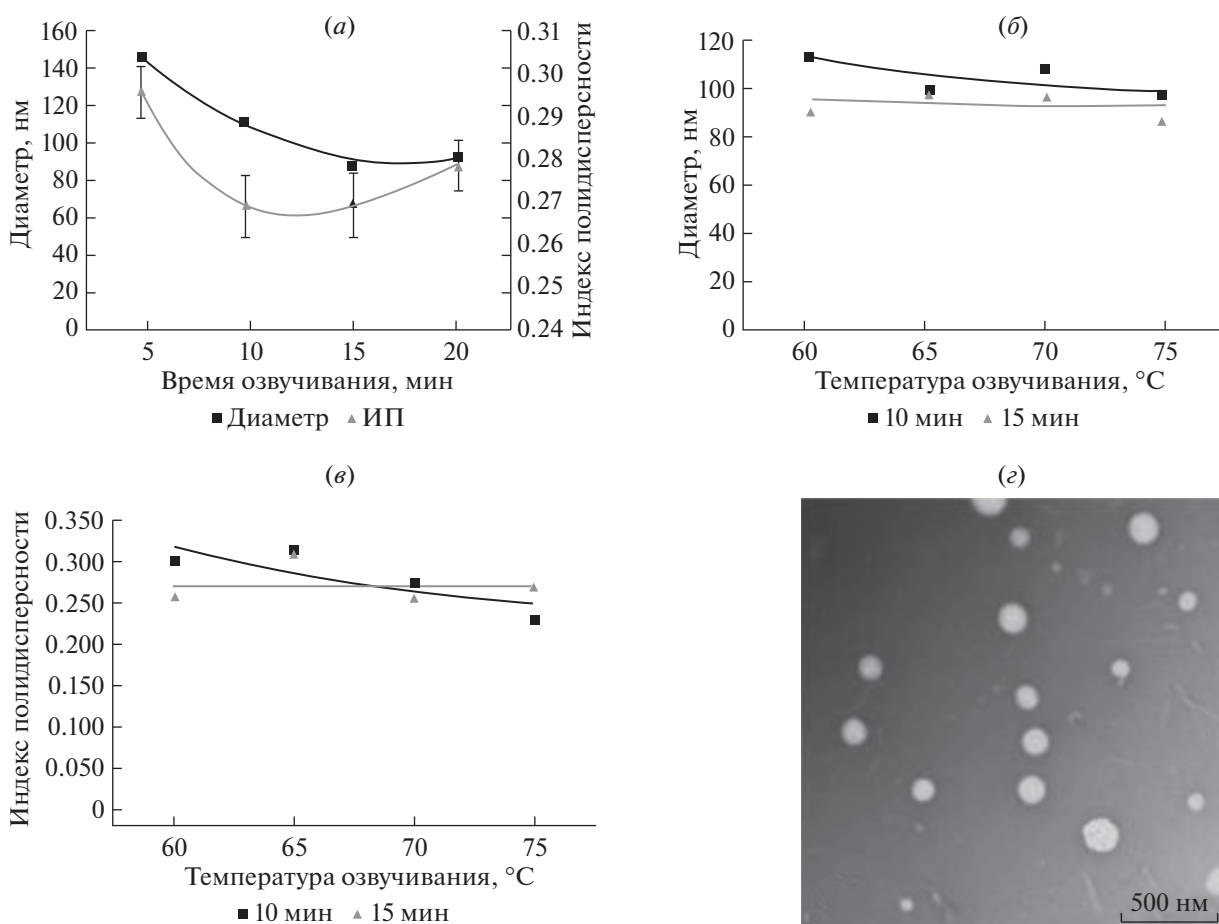


Рис. 6. Влияние времени (а, б) и температуры озвучивания (б, в) на средний диаметр (а, б) и индекс полидисперсности (а, в) липосом. Электронная микрофотография катионных липосом, полученных ультразвуковой обработкой в течение 15 мин при 75°C (д).

ния интенсивности флуоресценции клеток в популяции, которые соответствуют уровню экспрессии EGFP. В случае доставки siРНК, эффективность доставки определяли по уровню подавления экспрессии EGFP по сравнению с контролем – необработанными клетками ВНК IR780. Трансфицирующую активность липосом сравнивали с активностью коммерческого препарата Lipofectamine 2000 (Lf 2000, Invitrogen Inc.).

Эффективность трансфекции клеток комплексами пДНК с катионными липосомами, полученными при различных условиях, увеличивалась с ростом соотношения N/P (рис. 7а, б). Однако в пределах одного соотношения N/P образцы липосом (Ia), (Iб), (Iв), (Iг), (Id) (для расшифровки см. подпись к рис. 7) показали сходные или превосходящие Lipofectamine 2000 результаты.

При изучении эффективности доставки siРНК также было выявлено, что подавление экспрессии белка усиливалось с ростом количества липосом в составе комплекса. При этом варьирование

времени и температуры озвучивания при получении катионных липосом не привело к значительному изменению эффективности трансфекции (рис. 7е).

Таким образом, нами получены образцы катионных липосом на основе катионного липида (2X3) и нейтрального липида (DOPE) и показано, что физико-химические характеристики и биологические свойства катионных липосом зависят от способа их получения и типа водной фазы. Наименьшим размером и дзета-потенциалом обладали катионные липосомы (I), полученные в стерильной воде УЗ обработкой. Результаты трансфекции эукариотических клеток показали, что липосомы (I) обеспечивали максимальную эффективность доставки нуклеиновых кислот. Проведена оптимизация технологии получения катионных липосом путем варьирования двух параметров – температуры и времени озвучивания. Показано, что при ультразвуковой обработке в течение 15 мин при 65–75°C образуются липосо-

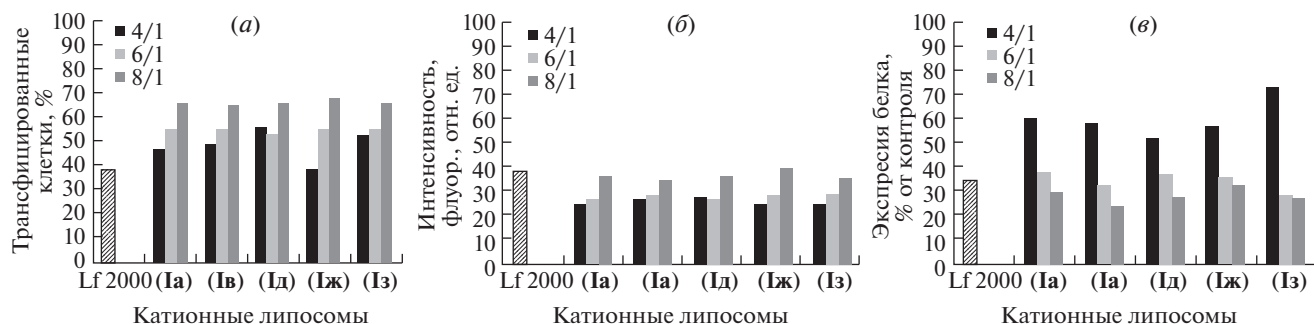


Рис. 7. Доставка пДНК рEGFP-C2 в клетки НЕК 293 (а, б) и siРНК в клетки ВНК IR780 (е), опосредуемая катионными липосомами при различных соотношениях N/P. Для пДНК рEGFP-C2 определяли процент трансфицированных клеток (а) и среднюю интенсивность флуоресценции клеток в популяции (б), для siРНК – подавление экспрессии EGFP (е). (Ia) – озвучивание в течение 10 мин при 60°C, (Iб) – озвучивание в течение 10 мин при 70°C, (Iв) – озвучивание в течение 15 мин при 60°C, (Iг) – озвучивание в течение 15 мин при 70°C, (Iд) – озвучивание в течение 15 мин при 75°C.

мы наименьшего размера. При этом достоверного различия в биологической активности липосом, полученных при варьировании указанных технологических параметров, не обнаружено.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез 1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16-2-тетраазагексакозан тетрагидрохлорида (**2X3**) был осуществлен согласно описанному ранее методу [20].

Приготовление катионных липосом. Навески катионного липида и липида-хелпера (DOPE, Avanti Polar Lipids, США) растворяли в смеси CHCl_3 – MeOH (5 : 1 об.) и в CHCl_3 соответственно. Полученные растворы смешивали в соотношении 1 : 1 (мольн.). Растворители удаляли в вакууме водоструйного насоса, образовавшуюся липидную пленку сушили 4 ч в вакууме масляного насоса (0.01 Торр). К сухой пленке добавляли необходимое количество стерильной воды или раствора Рингера (концентрация по липиду (**2X3**) 1 мМ) и диспергировали при 50–60°C до полного отслоения пленки со стенок колбы. Образовавшуюся дисперсию обрабатывали на ультразвуковой бане (Vandelin Sonorex Digitec DT 52H, Германия) 15 мин при температуре 70°C для получения образцов (I), (III) или пропускали через экструдер (LiposoFast-Basic, Avestin, Канада) 13 раз (размер пор поликарбонатной мембраны 100 нм) для получения образца (II). Дисперсии катионных липосом фильтровали через стерильный фильтр (Chromafil CA-45/25 (S), Macherey-Nagel, Германия) с размером пор 450 нм и хранили при температуре 4°C.

Определение размера и поверхностного потенциала липосом. Гидродинамический диаметр и дзета-потенциал липосом измеряли с помощью метода динамического лазерного светорассеяния на приборе Delsa Nano C (Beckman Coulter,

США). Измерения проводили при концентрации 0.05 мМ при температуре 25°C в трех повторах.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Исследование морфологии липосом проводили на трансмиссионном электронном микроскопе Zeiss LIBRA®120 PLUS (Германия), с ускоряющим напряжением 80 кВ. Образцы получали нанесением исследуемой липидной суспензии (15–20 мкл 0.3 мМ или 1 мМ) на покрытую углеродной пленкой медную сетку, с последующим негативным контрастированием уранилацетатом (15–20 мкл 2% водный раствор). Через 2 мин после каждого добавления избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой.

Нуклеиновые кислоты. 25-звенный олигонуклеотид (ОДН) с аминокетильным линкером на 3'-конце (5'-TACAGTGGAAATTG-TATGCСТАТТАТ-3') синтезировали твердофазным фосфитамидным методом и выделяли с помощью ВЭЖХ). Чистота олигонуклеотида, согласно анализу с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ в денатурирующих условиях, составляла 95–98%. Концентрацию олигонуклеотида определяли на спектрофотометре BioMate 3 (Termo Electron Corporation, США).

siРНК к мРНК гена *LIVIN* получали путем отжига двух комплементарных олигорибонуклеотидов как описано ранее [19].

В экспериментах использовали пДНК рEGFP-C2 (Clontech, Германия), кодирующую EGFP. siРНК-EGFP последовательности 5'-GAACGG-CAUCAAGGUGAACTT-3' (смысловая цепь) и 5'-GUUCACCUUGAUGCCGUUCTT-3' (антисмысловая цепь) была получена, как описано ранее [21]. Отжиг цепей siРНК проводили при концентрации 50 мкМ в 30 мМ HEPES-KOH (pH 7.4), 100 мМ ацетата натрия, 2 мМ ацетата магния, 90°C, 5 мин, затем раствор РНК в течение 1 ч охлаждали до комнатной температуры. Полученные дуплексы siРНК анализировали электро-

форезом в 15% ПААГ в нативных условиях. Полученный раствор siРНК хранили при -20°C .

Клеточные культуры. Культуру клеток карциномы толстой кишки HT-29 пассировали стандартным образом. Для культивирования использовали среду RPMI-1640® с глутамином, 10% FBS и антибиотики пенициллин/стрептомицин.

Клетки почки эмбриона человека НЕК 293 получены из банка клеточных культур института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Генетически модифицированные клетки ВНК IR780, экспрессирующие EGFP, любезно предоставлены профессором В.С. Прасоловым (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарта РАН, Москва).

Клетки НЕК 293 и ВНК IR780 культивировали в среде DMEM, в присутствии 10% FBS, антибиотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина) в атмосфере 5%-го CO_2 при 37°C , и регулярно пассировали для поддержания экспоненциального роста.

Приготовление комплексов катионных липосом с нуклеиновыми кислотами. Для проведения трансфекции клеток HT-29 комплексы готовили следующим образом: растворы катионных липосом и siРНК-LIVIN в концентрациях, соответствующих необходимым соотношениям N/P, смешивали в среде RPMI-1640® с добавлением 1% FBS и инкубировали 20 мин при 24°C .

Для проведения трансфекции клеток НЕК 293 и ВНК IR780 растворы катионных липосом (25 мкл) и соответствующей нуклеиновой кислоты (25 мкл) в концентрациях, соответствующих необходимым соотношениям N/P, смешивали в среде Opti-MEM® и инкубировали 20 мин при 24°C .

Электрофорез в ПААГ в нативных условиях. Для анализа комплексов ОДН – липосомы использовали электрофорез в 12%-ном ПААГ при соотношении акриламид – N,N' -метиленабисакриламид (20 : 1) в трис-боратном электродном буфере (ТВЕ) при 20°C и напряженности электрического поля 30–45 В/см. Гель фотографировали при визуализации в ультрафиолетовом свете.

Флуоресцентная спектроскопия. Измерения флуоресценции проводили на флуоресцентном спектрометре Cary Eclipse (Varian, США), в кювете объемом 2 мл из полиметакрилатного материала 1×1 см, полосы пропускания (щели) возбуждения и испускания 10 нм, длина волны возбуждения 510 нм, испускания 590 нм. Концентрация этидий бромид составляла 400 нг/мл, концентрация ДНК тимуса теленка (Sigma-Aldrich, США) – 10 мкг/мл. Расчет процента связывания ДНК проводили по формуле:

$$\% \text{ Связывания} = \frac{F_x - F_{\text{фон}}}{F_0 - F_{\text{фон}}} \times 100\%,$$

где F_x – интенсивность флуоресценции ДНК после добавления катионных липосом, $F_{\text{фон}}$ – интенсивность флуоресценции этидий бромид в водном растворе, F_0 – максимальная интенсивность флуоресценции этидий бромид в растворе ДНК [18].

Трансфекция клеток комплексами, сформированными катионными липосомами и нуклеиновыми кислотами. За 2 дня до трансфекции клетки HT-29 высевали в 24-луночные планшеты в концентрации 2.0×10^4 клеток в 1 мл среды. Перед трансфекцией среду культивирования с 10%-ной FBS заменяли на среду с 1%-ной FBS. Полученные комплексы вносили в культуру клеток и выдерживали 16 ч в стандартных условиях в атмосфере 5% CO_2 при 37°C .

Клетки НЕК 293 и ВНК IR780 высаживали в 24-луночные планшеты (при плотности посадки 0.1×10^5 клеток на лунку для ВНК IR780 и 1.2×10^5 клеток на лунку для НЕК 293) и инкубировали в течение 24 ч. В день трансфекции культуральную среду заменяли на среду DMEM (200 мкл) с 10%-ной FBS (без антибиотиков). К клеткам добавляли комплексы пДНК (2 мкг/мл) или siРНК (50 нМ) с катионными липосомами, сформированные при различных соотношениях N/P, и инкубировали в стандартных условиях в течение 4 ч, затем заменяли среду на свежую DMEM с 10% FBS (500 мкл) и дополнительно инкубировали при 37°C в течение 44 ч в случае пДНК и 68 ч в случае siРНК.

Проточная цитометрия. Для оценки эффективности доставки siРНК клетки HT-29 обрабатывали трипсином, промывали PBS и анализировали при помощи проточной цитометрии согласно рекомендациям производителя.

Клетки НЕК 293 и ВНК IR780 промывали PBS и обрабатывали раствором трипсина в PBS (0.5 мг/мл) в течение 2 мин при 37°C для открепления клеток с поверхности лунки. Открепившиеся клетки суспендировали в среде с FBS для ингибирования дальнейшего действия трипсина, переносили в пробирки и осаждали центрифугированием (Contron T42K, Centricon Instruments) при 1000 об./мин (200 g) в течение 10 мин. Супернатант убирали, клетки дважды промывали PBS и фиксировали 2%-ным раствором формальдегида в PBS (600 мкл). Количество трансфицированных клеток и среднее значение интенсивности флуоресценции в клеточной популяции измеряли на цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием программы CXP analysis. В каждом образце анализировали не менее 20000 клеток. Все экспериментальные точки были получены в результате трех независимых экспериментов. Стандартное отклонение не превышало 5–7%.

БЛАГОДАРНОСТИ

А.С. Алексеевой (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук) за регистрацию электронных микрофотографий катионных липосом.

Исследование выполнено при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, программа “УМНИК” (договор № 11527ГУ/2017 от 19.05.2017 г.), а также в рамках федеральной целевой программы “Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу” (государственный контракт № 14411.2049999.19.046).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jellema R.K., Bomans P., Deckers N., Ungethum L., Reutelingsperger C.P.M., Hofstra L. Frederik P.M. // *J. Lipos. Res.* 2010. V. 20. P. 258–267.
2. Wang Y., Miao L., Satterlee A., Huang L. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015. V. 87. P. 68–80.
3. Godbey W.T., Mikos A.G. // *J. Control. Release.* 2001. V. 72. P. 115–125.
4. Torchilin V.P. // *Nature Rev.* 2005. V. 4. P. 145–160.
5. Ju J., Huan M.-L., Wana N., Hou Y.-L., Maa X.-X., Jia Y.-Y., Li C., Zhou S.-Y., Zhang B.-L. // *Bioorg. Med. Chem.* 2016. V. 26. P. 2401–2407.
6. Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.-W., Zarghami N. // *Nanoscale Res. Lett.* 2013. V. 8. P. 102.
7. Tarahovsky Y.S. // *Biochemistry.* 2009. V. 74. P. 1293–1304.
8. Petros R.A., DeSimone J.M. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010. V. 9. P. 615–627.
9. Verma A., Stellacci F. // *Nanomaterial–Cell Interactions.* 2010. V. 6. P. 12–21.
10. Cullis P.R., Kruijff B.D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. V. 559. P. 399–420.
11. Farhood H., Serbina N., Huang L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1235. P. 289–295.
12. Hafez I.M., Cullis P.R. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001. V. 47. P. 139–148.
13. Hafez I.M., Maurer N., Cullis P.R. // *Gene Ther.* 2001. V. 8. P. 1188–1196.
14. Koltover I. // *Science.* 1998. V. 281. P. 78–81.
15. Richardson E.S., Woodbury D.J., Pitt W.G. // *Biophys. J.* 2007. V. 93. P. 4100–4107.
16. Cho N.J., Hwang L.Y., Solandt J.J.R., Frank C.W. // *Materials.* 2013. V. 6. P. 3294–3308.
17. Jafari M., Soltani M., Naahidi S., Karunaratne D.N., Chen P. // *Cur. Med. Chem.* 2012. V. 19. P. 197–208.
18. Findeis M.A. // *Meth. Mol. Med.* 2001. P. 135–136.
19. Bavykin A.S., Korotaeva A.A., Poyarkov S.V., Syrtsev A.V., Tjulandin S.A., Karpukhin A.V. // *Onco Targets Ther.* 2013. V. 6. P. 1333–1340.
20. Petukhov I.A., Maslov M.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A. // *Rus. Chem. Bull.* 2010. V. 59. P. 260–268.
21. Ui-Tei K., Naito Y., Takahashi F., Haraguchi T., Ohki-Hamazaki H., Juni A., Ueda R., Saigo K. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 936–948.

Optimization of Cationic Liposomes Preparation Technology for Nucleic Acids Delivery

A. S. Luneva*, P. A. Puchkov*, E. V. Shmendel*, M. A. Zenkova**, A. Yu. Kuzevanova***, A. A. Alimov***, A. V. Karpukhin***, and M. A. Maslov*.*

*Phone: +7-499-600-8202; e-mail: mamaslov@mail.ru

*Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University, Vernadsky ave. 86, Moscow, 119571 Russia

**Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Lavrentiev ave. 8, Novosibirsk, Russia

***Research Centre of Medical Genetics, Moskvorechie st. 1, Moscow, Russia

Cationic liposomes based on the cationic lipid 1,26-bis(cholest-5-en-3 β -yloxy-carbonylamino)-7,11,16-2-tetraazageksakozan tetrahydrochloride (2X3) and the lipid-helper 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE) were prepared by two different methods: ultrasonication and extrusion. The effect of the preparation and the type of liquid phase on the physicochemical characteristics of cationic liposomes and their biological activity was studied. Optimization of cationic liposomes preparation made it possible to estimate technological parameters providing the reproduction of physicochemical characteristics of batch-to-batch consistency of liposomes.

Keywords: gene therapy, lipids, cationic liposomes, transfection, nucleic acid delivery