

©Коллектив авторов

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ МОЛЕКУЛ миРНК И ЛИПОСОМ НА ОСНОВЕ ЛИПОПЕПТИДОВ

Е.А. Турецкий^{1,2*}, О.О. Колоскова^{1,3}, А.С. Носова^{1,3}, И.П. Шиловский¹, Ю.Л. Себякин³, М.Р. Хаитов¹

¹Государственный научный центр “Институт иммунологии”,
115478, Москва, Каширское шоссе, 24; эл. почта: E.A.Turetskiy@nrcii.ru

²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

³Московский технологический университет (МИТХТ), Москва

Липосомальные векторы на основе липопептидов благодаря их биосовместимости считаются одними из самых безопасных и при этом эффективных систем для внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот, в том числе и молекул миРНК. Целью данной работы было получение нового комплекса, созданного на основе липотрипептида OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ и молекул миРНК, а также изучение его физико-химических свойств. Электронная микроскопия показала, что комплекс миРНК и OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ (м/м 1/10) образует сэндвиче-подобную структуру, что позволяет защищать нуклеиновую кислоту от действия нуклеаз. Данные фотонно-корреляционной спектроскопии свидетельствуют об увеличении размера липосомальных частиц после добавления к ним молекул миРНК, при этом размер полученных частиц комплекса не превышал 300 нм, что является достаточным для успешного его проникновения внутрь клеток-мишеней. В то же время, ζ-потенциал липоплексов уменьшался с 21 до 16 мВ по сравнению с “пустыми” липосомами, это говорит о частичной нейтрализации положительного заряда липосом отрицательным зарядом молекул миРНК. Эти результаты позволяют предположить, что подобный размер и суммарный положительный заряд комплекса липосома/миРНК могут обеспечить эффективный клеточный захват путём эндоцитоза. Такие характеристики созданного комплекса свидетельствуют о перспективности его дальнейшего применения в области генного сайленсинга патогенетически-значимых генов.

Ключевые слова: липотрипептид, липосомы, липоплексы, внутриклеточная доставка нуклеиновых кислот

DOI: 10.18097/PBMC20176305472

ВВЕДЕНИЕ

Липосомы (от греч. *lipos* – жир и *soma* – тело) (липидные везикулы), искусственно получаемые частицы, которые образованы одним или несколькими концентрическими замкнутыми липидными бислоями; внутренний водный объем липосомы изолирован от внешней среды. Несмотря на молекулярную толщину (около 4 нм) липидный бислой отличается исключительной механической прочностью и гибкостью. В жидкокристаллическом состоянии бислоя его компоненты обладают высокой молекулярной подвижностью, так что в целом мембрана ведёт себя как достаточно жидкая, текучая фаза. Благодаря этому липосомы сохраняют целостность при различных повреждающих воздействиях, а их мембрана обладает способностью к восстановлению возникающих в ней структурных дефектов. Вместе с тем гибкость бислоя и его текучесть придают липосомам высокую пластичность. Поэтому липосомы являются многообещающими системами доставки фармацевтических субстанций различной природы [1-3], включая РНК- и ДНК-содержащие субстанции. [4, 5]. Включение нуклеиновых кислот в липосомы может значительно повысить их терапевтическую эффективность, поскольку препарат, находящийся в липосоме, защищен её мембраной от действия неблагоприятных факторов окружающей среды, например, нуклеаз. Применение катионных липосом в качестве носителей, несмотря на множество преимуществ, таких как сравнительная

дешевизна получения и низкая токсичность, а также высокая эффективность, имеет свои трудности.

Во-первых, липосомы должны обладать подходящим зарядом (положительный заряд) и размером (не более 1 мкм) для образования комплексов с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот, называемых липоплексами. Во-вторых, для взаимодействия отрицательно заряженного фосфолипидного бислоя клеточной мембраны с липоплексами, необходимо поддерживать суммарный положительный заряд после их формирования, так как они попадают в клетки путём слияния с плазматической мембраной [6]. Наконец, размер липоплексов должен удовлетворять не только требованиям эффективности трансфекции, но и пределам биологической безопасности для клеток.

Применение катионных липоплексов для доставки нуклеиновых кислот в соматические клетки стало очень востребованным благодаря их низкой токсичности и высокой эффективности в экспериментах *in vitro* [7]. Одним из первых разработанных коммерчески доступных липоплексов для доставки нуклеиновых кислот был Липофектин. Этот комплекс на основе катионных липосом, образованных DOTMA и DOPE липидами, показал высокий уровень трансфекции миРНК на широком спектре клеточных линий. Также была проведена успешная трансфекция молекулами миРНК на линиях клеток человека [8]. В последнее время наиболее привлекательными являются катионные липосомы на основе аминокислот и пептидов. Алифатические

производные пептидов способны самостоятельно формировать бислойные агрегаты в водной среде, являются нетоксичными, биосовместимыми и биodeградируемыми, кроме того, аминокислотные последовательности в их структуре являются хорошими ДНК-связывающими агентами [7, 9-13].

Задачей данной работы было описание физико-химических свойств комплекса, состоящего из липосом на основе липотрипептида состава OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ и молекул миРНК, с целью прогнозирования эффективности их внутриклеточного транспорта.

МЕТОДЫ

Получение липосом

Сухую навеску (2 г) OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ растворяли в хлороформе. Затем растворитель отгоняли на вакуумном ротационном испарителе до образования тонкой липидной пленки. Плёнку дополнительно выдерживали на вакууме в течение 3 ч. Затем добавляли 1 мл дистиллированной воды и оставляли колбу для гидратации пленки на 1 ч при комнатной температуре. После встряхивания и перемешивания полученную дисперсию озвучивали на ультразвуковой бане (3×15 мин) при 65°C. Для гомогенизации частиц и стерилизации дисперсии её пропускали через миниэкструдер с поликарбонатными фильтрами (диаметр пор – 100 нм).

Электронная микроскопия

Исследования морфологии частиц комплекса липосома/миРНК проводили с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1200EX (“JEOL”, Япония) с ускоряющим напряжением 80 кВ. Каплю исследуемой дисперсии помещали на медные сетки с покрытием формвар и выдерживали в течение 2 мин. Избытки образца удаляли фильтровальной бумагой. После высушивания образец обрабатывали 0,3% водным раствором уранил ацетата (рН 4,0) для негативного контрастирования.

Фотонно-корреляционная спектроскопия

Распределение частиц по размерам оценивали методом фотонно-корреляционной спектроскопии, основанном на принципах динамического светорассеяния, на анализаторе размеров частиц “Photocor Compact-Z”. ζ-Потенциал измеряли методом электронного светорассеяния. Образцы липосомальных дисперсий готовили в количестве 2 мл, с концентрацией липопептида OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ 0,1 мг/мл.

Электрофорез

Образование комплексов между водной дисперсией липопептида OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ и плазмидной ДНК изучали с помощью электрофореза на 1% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл этидиум бромид. Возрастающее количество липопептида (0,12-61,4 мкг) инкубировали с неизменным количеством плазмидной ДНК (30 нг). Электрофорез проводили при 100 В в течение 45 мин. Гель визуализировали в УФ свете при помощи Gel Imager-2 (“BioRad”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Системы доставки миРНК должны быть достаточно малыми, чтобы свободно проникать в клетки и ядро, а также легко освобождаться из эндосом (лизосом). Трансфекционная эффективность липopleксов в основном зависит от следующих факторов: химическая структура катионных липидов, размер и состав комплексов [11]. На структуру формируемых комплексов в значительной степени также влияет соотношение положительных зарядов липида и отрицательных зарядов РНК. Изучение структур как “пустых” липосом, так и их комплексов с нуклеиновыми кислотами позволяет сделать вывод о возможном уровне трансфекционной активности [13].

Структура формируемых липopleксов при взаимодействии полученных липосом OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ с молекулами миРНК изучалась посредством электронной микроскопии. Было показано, что сконструированные липосомы в комплексе с миРНК формируют “сэндвичевые” структуры. При этом “пустые” липосомальные частицы имеют сферическую или почти сферическую форму (рис. 1).

Методом фотонно-корреляционной спектроскопии установлено, что наиболее характерным размером для пустых липосом на основе липотрипептида OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ является 95±7 нм. После добавления миРНК происходит увеличение размера полученного комплекса, по сравнению с “пустыми” липосомами, и его значение для липopleксов достигает 208±27 нм.

В то же время, образование комплексов приводило к уменьшению ζ-потенциала примерно на 25% (таблица).

Результаты электрофоретического исследования показали, что липосомы на основе липотрипептида OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ полностью связывают плазмидную ДНК при соотношении Р:Н=1:8–16 и полностью вытесняют бромистый этидий при соотношении Р:Н=1:32 и выше (рис. 2). Эти данные свидетельствуют о прочности связывания OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ и нуклеиновыми кислотами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Был получен катионный комплекс, состоящий из липосомы на основе липотрипептида OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ и молекул миРНК.

Изучение физико-химических свойств данного комплекса с помощью различных методов, таких как электронная микроскопия, фотонно-корреляционная микроскопия и электрофорез показало, что нуклеиновые кислоты способны прочно связываться с OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂, суммарный заряд комплекса положительный (около 16 мВ), а его размер составляет порядка 200 нм. Данные физико-химические характеристики позволяют прогнозировать, что созданный прочный комплекс благодаря положительному заряду и оптимальному размеру будет успешно проникать внутрь клеток-мишеней. Тем не менее, требуется продолжение исследований биологической активности созданного комплекса в экспериментах *in vitro* с использованием культур клеток.

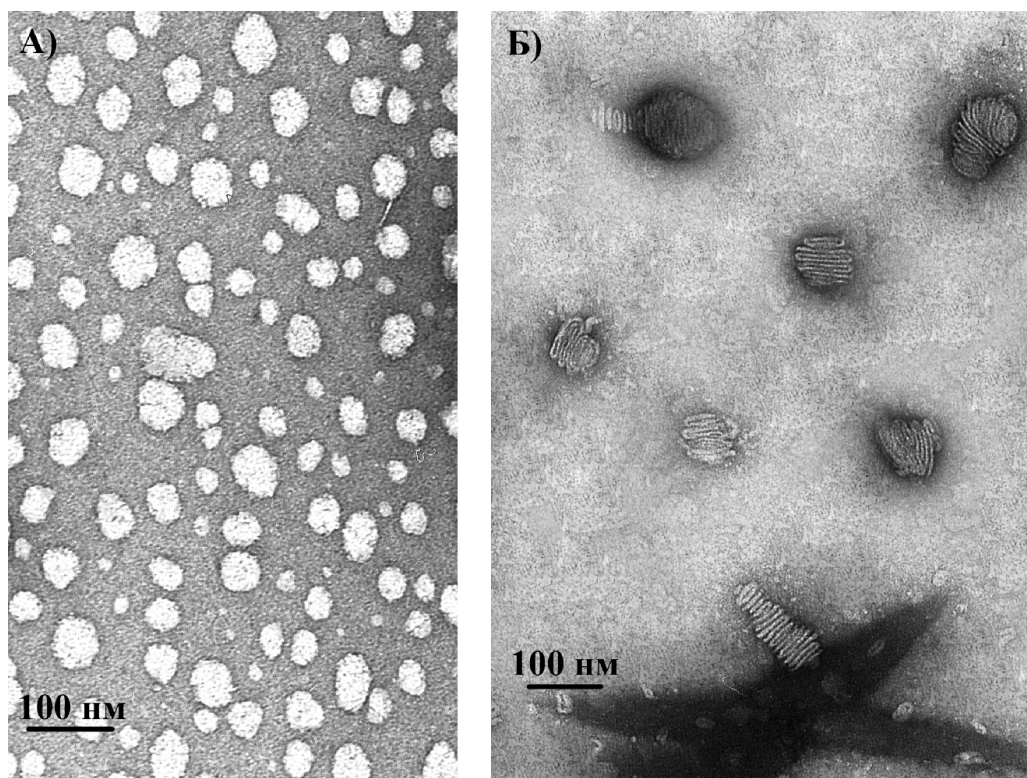


Рисунок 1. Структура липосомальных частиц (А) и липосомальных комплексов с молекулами миРНК (Б).

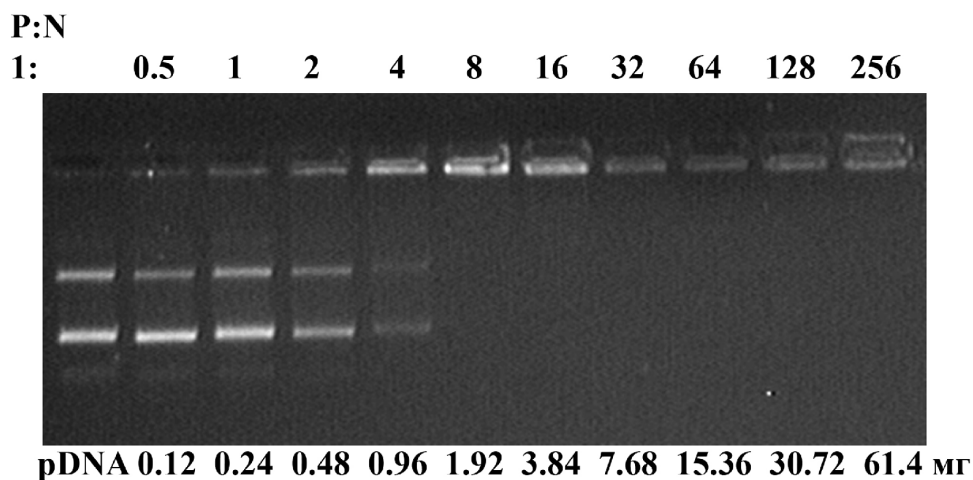


Рисунок 2. Результаты электрофоретического исследования.

Таблица. Значения ζ -потенциала “пустых” липосом и комплексов с миРНК

Соединение	Zeta Potential, mV
«Пустые» липосомы	21±0
Комплекс липосом с миРНК	16±0

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 17-34-80170.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mahler S., Roy I. (2015) J. Chem. Technol. Biotechnol., **90**(7), 1167-1168.
2. Shim G., Kim M.G., Park J.Y., Oh Y.K. (2013) Asian J. Pharmaceut. Sci., **8**(2), 120-128.
3. Wang J., Lu Z., Wientjes M.G., Au J.L.-S. (2010) AAPS J., **12**(4), 492-503.
4. Хаитов М.Р., Литвин Л.С., Шиловский И.П., Башкатова Ю.Н., Файзулов Е.Б., Зверев В.В. (2010) Иммунология, **31**(2), 69-76.
5. Шиловский И.П., Сундукова М.С., Гайсина А.Р., Ласкин А.А., Смирнов В.В., Бабахин А.А., Хаитов М.Р. (2016) Экспер. клин. фармакол., **79**(4), 35-44.

6. *Almofti M.R., Harashima H., Shinohara Y., Almofti A., Li W., Kiwada H.* (2003) *Mol. Membr. Biol.*, **20**, 35-43.
7. *Koloskova O.O., Nikonova A.A., Budanova U.A., Shilovskiy I.P., Koftadi I.A., Ivanov A. V., Smirnova O.A., Zverev V.V., Sebaykin Y.L., Andreev S.M., Khaitov M.R.* (2016) *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.*, **102**, 159-167.
8. *Zhang S., Zhi D., Huang L.* (2012) *J. Drug Targeting*, №7, 1-12.
9. *Сумина А.М., Колоскова О.О., Сарычев Г.А., Буданова У.А., Себякин Ю.Л.* (2013) *Биофармацевтический журнал*, **5**(4), 35-38.
10. *Колоскова О.О., Сумина А.М., Буданова У.А., Себякин Ю.Л.* (2012) *Биофармацевтический журнал*, **4**(6), 31-36.
11. *Tiera M.J., Winnik F.M., Fernandes J.C.* (2006) *Curr. Gene Ther.*, **6**, 59-71.
12. *Zhang X., Lamanna C.M., Kohman R.E., Mcintosh T.J., Han X., Grinsta M.W.* (2013) *Soft Matter*, **9**, 4472-4479.
13. *Lamanna C.M., Lusic H., Camplo M., Mcintosh T.J., Barth P., Grinstaff M.W.* (2012) *Accounts Chem. Res.*, **45**(7), 1026-1038.

Поступила: 31. 08. 2017.
Принята к печати: 14. 09. 2017.

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF LIPOPEPTIDE-BASED LIPOSOMES AND THEIR COMPLEXES WITH siRNA

E.A. Turetskiy^{1,2}, O.O. Koloskova^{1,3}, A.S. Nosova^{1,3}, I.P. Shilovskiy¹, Yu.L. Sebyakin³, M.R. Khaitov¹

¹NRC Institute of Immunology, Moscow, Russia; e-mail: EA.Turetskiy@nrcii.ru

²Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

³Moscow Technological University (campus MITHT), Moscow, Russia

siRNA/cationic liposome complexes are efficient systems for transmembrane delivery. The aim of this study was to prepare a novel complex consisted of lipotriptide OrnOrnGlu(C₁₆H₃₃)₂ and siRNA molecule and examined their physicochemical properties. Electron microscopy study has shown that the siRNA/liposome complex (m/m 1/10) tends to form sandwich-like structures that may protect nucleic acid from nuclease degradation. Photon correlation spectroscopy data indicate that the particle size increased after siRNA adding, but did not exceed 300 nm in diameter, while ζ-potential of lipoplexes decreased from 22 mV to 14 mV, compared to the empty liposomes thus indicating positive charge neutralization by negatively charged siRNA. These data allow to hypothesize that such size and total positive charge could provide efficient cellular uptake by endocytosis. That may have good prospects for gene silencing therapy.

Key words: lipotriptide, liposome, lipoplex, intracellular delivery of nucleic acids