

ОГЛЯДИ

УДК 547.03+547.562+547.298+575.113+577.113.7

ЗАСТОСУВАННЯ КАЛІКСАРЕНІВ ДЛЯ ТРАНСФЕКЦІЇ ДНК У КЛІТИНИ

Р. В. РОДІК

Інститут органічної хімії НАН України, Київ;
e-mail: dms0@ukr.net

В огляді проаналізовано та представлено перші результати використання неіонних та полікатіонних каліксаренів для генної трансфекції. У загальному вигляді наведено стан досліджень з пошуку нових невірусних векторів та показано перспективність супрамолекулярного підходу для їх дизайну. Виявлено деякі взаємозв'язки між властивостями каліксаренів та їх здатністю до трансфекції, а саме: створення супрамолекулярних самоасоціацій у водному середовищі сприяє ієрархічному формуванню агрегатів із молекулами ДНК. Утворені частинки здатні ефективно транспортувати ДНК у клітини, якщо вони є нанорозмірними та позитивно зарядженими.

Ключові слова: каліксарен, трансфекція, самоасоціація, плазміда, цитотоксичність.

Метод контрольованої та ефективної доставки генів у живі клітини є особливо актуальним як для фундаментальної науки, так і для практичної медицини. Гени, які знаходяться в плазмідах ДНК, забезпечують джерело терапевтичних протеїнів і РНК, якщо вони можуть увійти в клітину та досягнути її ядра. Згідно з дослідженнями *in vitro* та *in vivo*, гола плазміда ДНК може трансфектувати клітини, але вона легко розкладається нуклеазами, що містяться у біологічних рідинах, тож ефективність її трансфекції є дуже низькою. Тому дизайн ДНК-транспортерів є однією з фундаментальних проблем у генотерапії.

Відомо, що віруси здатні упаковувати у нанорозмірні (30–100 нм) об'єкти поодинокі молекули ДНК або РНК. Незважаючи на це, FDA (Food and Drug Administration of USA, Управління із санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США) до теперішнього часу не схвалило будь-якої ДНК-транспортувальної системи на основі вірусів у зв'язку з їхньою високою імуногенністю, онкогенністю та потенційними проблемами з рекомбінації вірусів.

В останні роки проводиться активний пошук нових невірусних агентів для трансфекції ДНК [1, 2, 12–15]. Завдяки розвитку нанотехнологій була запропонована велика кількість нанорозмірних систем доставки генів, а саме: дендримери [3, 4], наночастин-

ки золота [5], силікагелі [6], наногелі [7, 8], вуглецеві нанотрубки [9], нановолокна [10], органічні наночастинки [11].

Невірусні вектори, такі як катіонні ліпіди та полімери, здатні конденсувати ДНК у великі мультимолекулярні комплекси (відповідно ліпоплекси та поліплекси). Ці частинки розмірами 100–10 000 нм є позитивно зарядженими і легко осаджуються з розчинів на негативно заряджені поверхні клітин ракових ліній та поглинаються ними [12–15]. Модифікації таких ліпо- та поліплексів певними лігандами, біосумісними олігомерами, фузіогенними пептидами та сигналами ядерної локалізації спрямовані на подолання клітинного бар'єру та захисної імунної відповіді, на зменшення побічних ефектів або для трансфекції специфічних клітин. Ці комплекси, зазвичай, вискоєфективні в культурі клітин (*in vitro*), але завеликі для використання у генотерапії (*in vivo*), де потрібні частинки розмірами до 100 нм.

Ефективне зв'язування ДНК є лише першим етапом у процесі її трансфекції. Інтерналізація через клітинну мембрану, вихід із лізосом у клітину, дисоціація комплексу ДНК-переносника, транспорт ДНК в ядро клітини, транскрипція привнесеної ДНК та продукування протеїну – це основні процеси, які мають відбуватись із високою ефективністю для успішної трансфекції. На даний час немає повної інформації, що відбувається із штуч-

ними частинками, які містять ДНК, після їх взаємодії з мембранами клітин.

Одна із проблем, яку треба вирішити у разі створення нових хімічних агентів для трансфекції, є контроль агрегації цих агентів із ДНК у нанооб'єкти визначеної будови та архітектури [1, 12–14, 16–19]. У низці робіт [15, 20–22] для досягнення цієї мети пропонують супрамолекулярний підхід із використанням раніш організованих «будівельних блоків» для конструювання – високоорганізованих супрамолекулярних систем [20, 23–25].

Найпридатнішими в цьому разі будівельними блоками є макроциклічні молекули, які мають достатньо великі розміри і здатні до хімічної модифікації. Було показано, що фулерени, модифіковані амонієвими групами, добре зв'язують ДНК у міцні комплекси [26, 27]. Але фулерени є досить токсичними, а їх комплекси з ДНК не завжди виявляють ген-трансфектуючу активність [28].

Існують вдалі приклади використання циклодекстринів для трансфекції генів [29, 30]. Амфільні циклодекстрини, функціоналізовані чотирнадцятьма протонуваними первинними аміногрупами та сімома додецильними залишками, здатні утворювати із плазмідною ДНК позитивно заряджені частинки розмірами 40–47 нм [31]. Виявилось, що такі частинки проявляють значну трансфекційну активність і мають низьку цитотоксичність. Разом із тим, хімічна модифікація циклодекстринів, особливо регіоселективна, є складною, а модифіковані циклодекстрини бувають достатньо токсичними [32].

Наразі з'явилися роботи з використання для цих цілей неіонних та полікатионних калікс[4]аренів та глікокалікс[4]

резорцинаренів. Серед переваг каліксаренів можна відзначити їх синтетичну доступність, низьку токсичність та можливість модифікації різноманітними функціональними групами. У цьому огляді наведено дослідження зі зв'язування із ДНК каліксаренів і калікс[4]резорцинаренів та промотованої ними трансфекції. Робота демонструє перспективність використання каліксаренів для створення нових невірусних систем доставки генів.

Глікокаліксрезорцин[4]арени

Група японських вчених синтезувала ряд калікс[4]резорцинаренів **1–3**, модифікованих вісьмома дисахаридними групами: мальтозними, лактозними та целобіозними, здатними до утворення системи міжмолекулярних водневих зв'язків із молекулами ДНК [33, 34]. Дисахаридні угруповання є добре відомими групами, які взаємодіють із протеогліканами на поверхні живих клітин під час розпізнавання «своїх» протеїнів організму [35]. Синтетичний шлях для сполук **1–3** складає 5–6 стадій із загальним виходом цільових продуктів 16–20%.

Дослідження водних розчинів сполук **1–3** виявили утворення стабільних наночастинок із діаметром 4,3–4,8 нм у діапазоні концентрацій від 0,1 до 10,0 мМ та агрегаційним числом – 6 (кількість молекул на частинку). Утворення асоціатів автори пояснюють гідрофобними взаємодіями ундецильних груп та міжмолекулярними водневими зв'язками вуглеводних залишків. Згідно з даними лазерної кореляційної спектроскопії (ЛКС), внаслідок додавання надлишку фосфат-іонів відбувається укрупнення агрегатів до розмірів 50–300 нм.

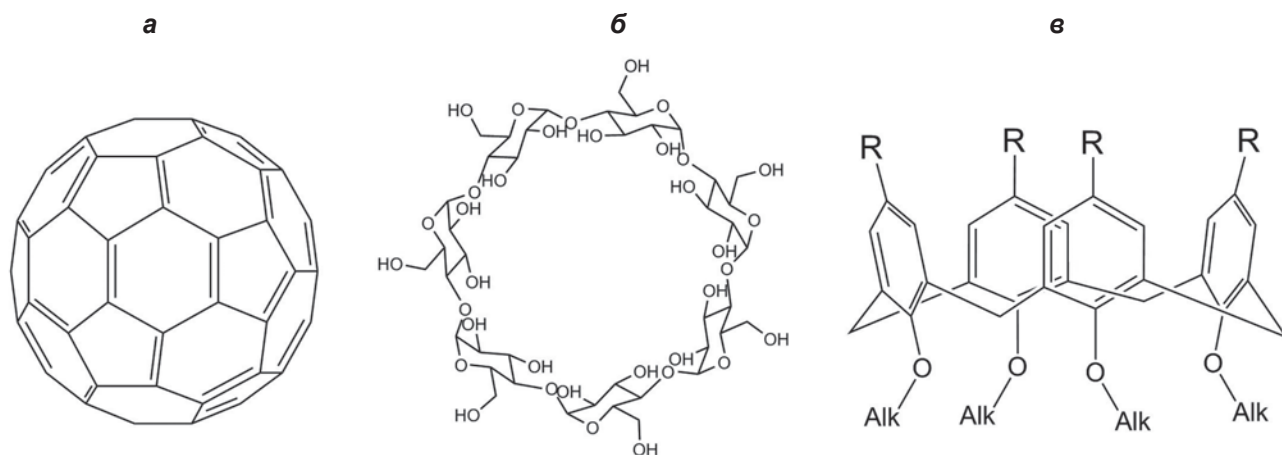
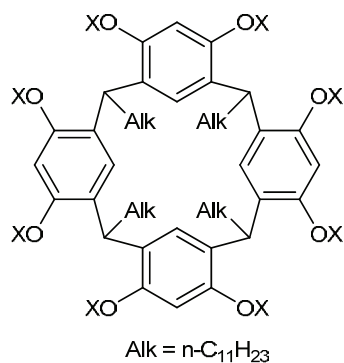
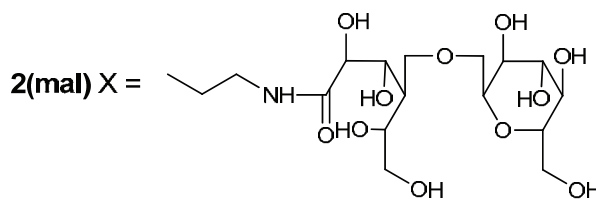
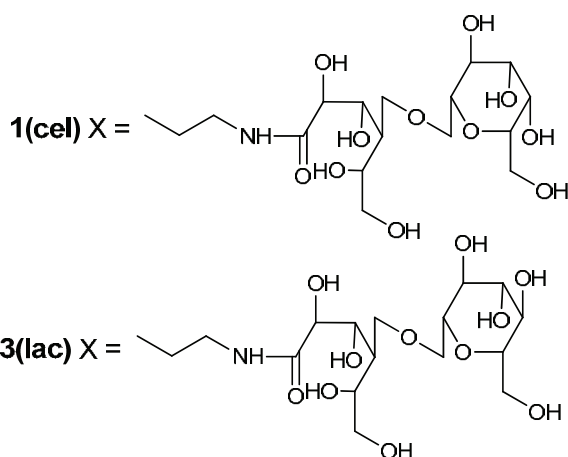


Рис. 1. Макроциклічні каркаси фулерену (а), циклодекстрину (б) та каліксаренів (в)

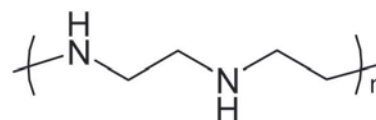


1-3



Наступним етапом дослідження водних розчинів макроциклів **1–3** було вивчення їх взаємодії із плазмідною ДНК методом ЛКС. У разі макроциклу **1** з 8-ма целобіозними фрагментами утворювались наночастинки розміром 54 нм, які автори назвали «штучними гліковірусами». Мальтозні (**2**) та лактозні (**3**) похідні утворюють в цих умовах частинки розміром 200–300 нм. Цікаво, що під час зв'язування ДНК відбувається компенсація заряду останньої, тож, незважаючи на її великий від'ємний заряд, «гліковіруси» мають ζ -потенціал $-5-0$ В, тобто вони практично незаряджені [34, 36].

Експерименти із трансфекції проводили на двох клітинних лініях *Hela* та *HepG2*. Ефективність трансфекції для менших за розмірами целобіозних «гліковірусів» (**1**) була в 3–20 разів вища, ніж для лактозних (**3**), та на 3 порядки вища, ніж для мальтозних (**2**). Целобіозні наночастинки також були на порядок ефективнішими, ніж ліпофектамін [37], і лише у 2–3 рази менш ефективними, ніж поліетиленімін JetPEI у порівнянні із стандартними тестами.



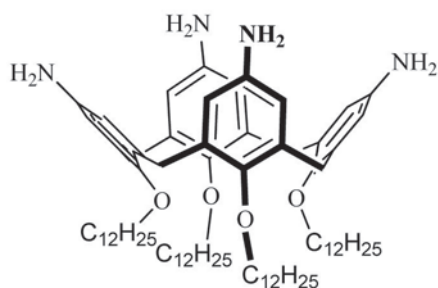
JetPEI, поліетиленімін лінійної будови

Наведена в роботах інформація про цитотоксичність цих макроциклів є неповною, для найефективнішого октацелобіозного каліксрезорцин[4]арену **1** виживаність клітин складає 85% у разі використання його у вигляді агрегатів із плазмідною ДНК під час трансфекції [38, 39].

Неіонні амінокаліксарени

Амфифільний тетраамінотетрадодецилкаліксарен **4** був синтезований за простою схемою і досліджений фізико-хімічними методами [40]. Каліксарен **4** і йому подібні сполуки утворюють ліпоподібні наночастинки (SLN) на поверхні розділу фаз повітря–вода в діапазоні концентрацій від 0,05 до 0,5 мМ [41, 42]. Завдяки протонуванню високоосновних атомів азоту каліксарену **4**, поверхня частинок набуває позитивного заряду (ζ -потенціал + 44 мВ), їх

розмір дорівнює 155 нм і вони є унімодальними, тобто практично усі одного розміру, про що свідчить індекс полідисперсності (pDI) – 0,15. Вивчення зв'язування із плазмідами ДНК проводили методами гель-електрофорезу та ЛКС [43]. Автори довели, що ДНК повністю вкриває поверхню наночастинки, і її заряд зменшується практично до нуля. Але одержані частинки нездатні промотувати трансфекцію.



4

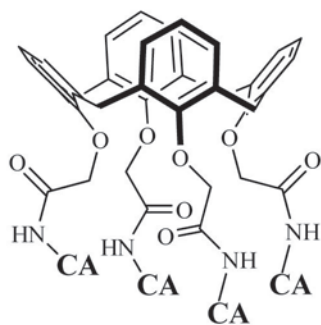
Для реалізації транспортної (відносно ДНК) функції, такі частинки покривали по чергово катіонним вуглеводним полімером – хітозаном і плазмідами ДНК. За зміною потенціалу частинок оцінювали ступінь зв'язаності останнього шару. При цьому зростає діаметр частинок. Після додавання чоти-

рьох подвійних шарів він дорівнював 225 нм (pDI = 0,35). Таким чином, було одержано позитивно заряджені ліпоподібні наночастинки, утворені з амфіфільних амінокаліксаренів **4**, вкриті одним, двома, трьома та чотирма шарами ДНК-хітозану за технологією Ленгмюр–Блоджетт.

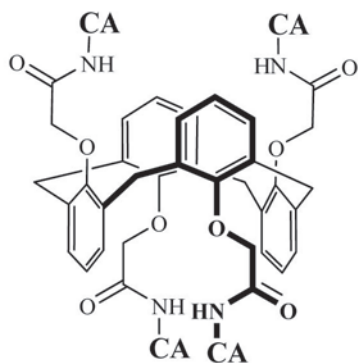
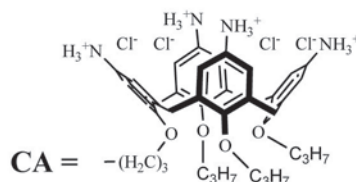
Дослідження трансфекції проводили на клітинній лінії MDCK відносно контролю – ліпофектаміну 2000. Частинки, вкриті виключно шаром ДНК, не показали трансфекції. Частинки, вкриті композитами хітозан–ДНК (шар ДНК є зовнішнім), показали трансфекцію у 5–7 разів вищу, ніж ліпофектамін, у той час як частинки із зовнішнім хітозановим шаром продемонстрували у 25–35 разів більшу активність порівняно з контролем. Автори відмітили низьку токсичність досліджуваних частинок, але спеціальні досліди по визначенню цитотоксичності не проводили [40].

Полікатіонні мультикаліксарени

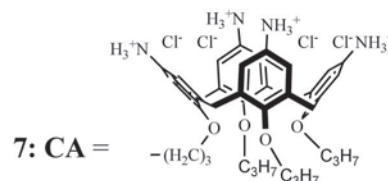
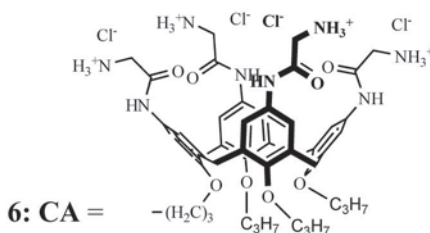
Полікатіонні мультикаліксарени **5–7** було синтезовано та досліджено як агенти для зв'язування ДНК [44]. Особливістю будови таких каліксаренів є «дендримерність», яка значно збільшує їхню поверхню та кількість позитивних зарядів. Недоліками сполук **5–7** є багатостадійність синтезу (10–11 стадій), не-



5



6, 7



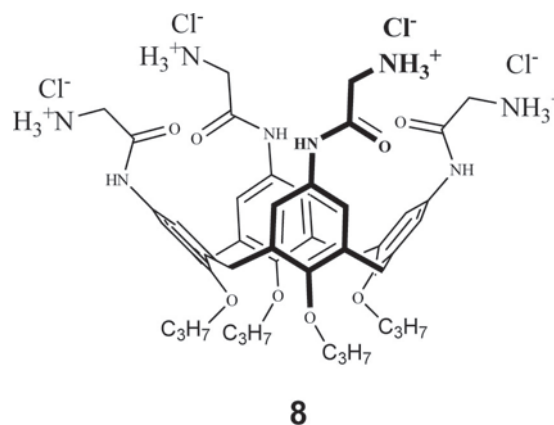
високий загальний вихід (не більше 10%) та велика Мм.

Автори досліджували взаємодію каліксаренів **5–7** із плазмідами ДНК (pGEM-EYFP або pEGFP-N1) методом гель-електрофорезу. Встановлено, що зв'язування відбувається переважно завдяки електростатичним взаємодіям. Каліксарени **6** та **7** у конформації 1,3-альтернат зв'язують ДНК у разі співвідношення позитивних та негативних зарядів (N/P співвідношенні) 10 та 22 відповідно, в той час як конусоподібний каліксарен **5** – тільки при N/P співвідношенні 44 [44]. Ефективність трансфекції у *CHO* клітинній лінії також неоднакова. Вона зменшується в ряду **6** > **7** > **5** і повністю збігається із здатністю зв'язувати ДНК. Для трансфекції використовували рDs2-mito плазмиду, яка веде до експресії флуоресцентного протеїну, що накопичується в мітохондріях. Загальна ефективність трансфекції, розрахована по інтенсивності флуоресценції, складала 10% для каліксарену **6**, менше 1% для **7** та практично дорівнювала нулю для **5**. Ефективність комерційного агента FuGene в цих умовах складає 50%.

Позитивна сторона мультикаліксаренів **5–7** – їх мала цитотоксичність. Вживаність клітин, яку вимірювали в діапазоні концентрацій від 10^{-9} до 10^{-3} М для трьох клітинних ліній *CHO*, *HEK* та *THP-1* після 24–72 год інкубації, є 90–140% відносно контролю.

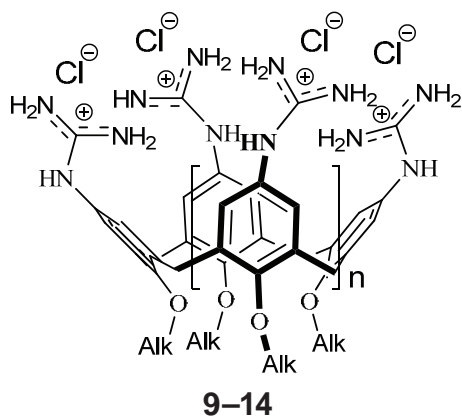
Полікатіонний амфифільний каліксарен **8**, що містить ліпофільні пропільні групи на

нижньому вінці та гідрофільні амідогліцильні групи, протоновані хлороводнем на верхньому вінці (складова частина мультикаліксарену **6**), також зв'язується із ДНК. Але ген-трансфектуюча активність цього макроциклу відсутня.

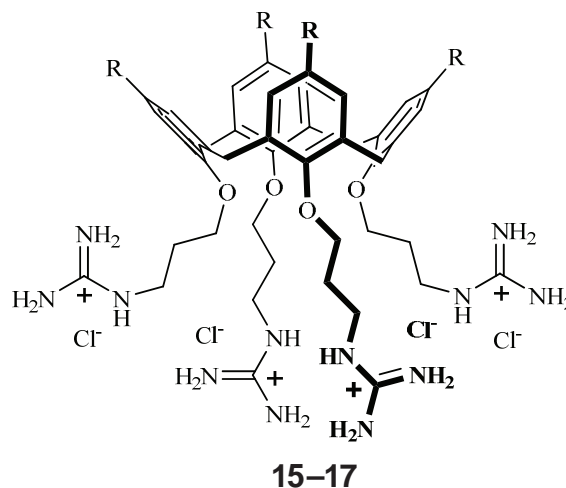


Катіонні гуанідинокаліксарени

Групою Унгаро була синтезована серія полікатіонних каліксаренів **9–14**, модифікованих протонованими гуанідиновими групами по верхньому вінцю макроциклу та різними за довжиною алкільними групами на нижньому вінці макроциклу [45, 46]. Серед калікс[4]аренів **9–12** є як представники конформації макроциклического кістяка 1,3-альтернат (тетраметоксикаліксарен **9** та тетрапропоксикаліксарен **11**) конформації конус (тетрапропоксикаліксарен **10** та



- 9** $n = 1$, 1,3-*alt*, Alk = CH₃,
10 $n = 1$, *cone*, Alk = C₃H₇,
11 $n = 1$, 1,3-*alt*, Alk = C₃H₇,
12 $n = 1$, *cone*, Alk = C₈H₁₇,
13 $n = 3$, Alk = CH₃,
14 $n = 5$, Alk = CH₃



- 15**: R = *t*-C₄H₉
16: R = H
17: R = *n*-C₆H₁₃

тетраоктилоксикаліксарен **12**). Два останні макроцикли мають амфифільну природу. Гексагуанідинокалікс[6]арен **13** та октагуанідинокалікс[8]арен **14** мають іншу особливість будови – їх фенольні кільця вільно обертаються і тому в розчинах відбуваються швидкі взаємопереходи між усіма можливими конформаціями. Наступна серія тетрагуанідинокалікс[4]аренів **15–17**, була функціоналізована по нижньому вінцю макроциклу гуанідиновими групами. На верхньому вінці вони мали протони, *трет*-бутильні або *n*-гексилні групи, тобто мали амфифільну природу [47]. Всі синтезовані каліксарени є водорозчинними (максимальна досліджувана концентрація 1–20 мМ). Наявність багатьох позитивно заряджених фрагментів сприяє їх електростатичній взаємодії з ДНК, а тріада N-C-N гуанідинів геометрично комплементарна тріаді O-P-O фосфатних груп ДНК.

Згідно з даними гель-електрофорезу під час взаємодії ДНК із каліксаренами **9–14** сигнал плазмідів зникає, якщо N/P дорівнює 3 для калікс[4]аренів **9–12** та N/P 8 для калікс[6,8]аренів **13** та **14**. У той же час, тетрагуанідинокаліксарени **15–17** зв'язують ДНК значно краще, сигнал плазмідів зникає за N/P 1-2, тобто практично в точці компенсації зарядів.

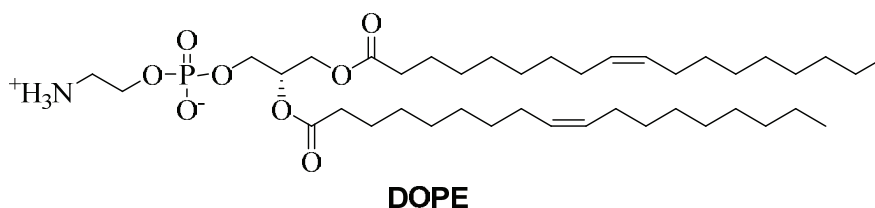
Дослідження з використанням атомно-силової мікроскопії виявили певні закономірності: амфифільні каліксарени **10**, **12** здатні утворювати із ДНК наночастинки розміром приблизно 100 нм, які стають більш полідисперсними у разі додавання етанолу, тобто у менш полярному середовищі. Це свідчить про два чинники, що впливають на зв'язування із ДНК таких каліксаренів. Перший – це електростатичні взаємодії і другий – ліпофільні взаємодії, паралельно розташованих алкільних груп на нижньому вінці макроциклу. Під час зменшення полярності середовища другий тип взаємодій слабшає, і частинка стає менш компактною. Метоксикалікс[4,6,8]арени **9**, **13** та **14** із нестабілізованими конформаціями *конус* та каліксарен **11** у конформації *1,3-альтернат* не мають амфифільної природи і тому не утворюють компактних частинок

із ДНК. Тетрагуанідинокаліксарени **15** і **17** із плазмідами ДНК теж утворюють частинки розмірами 100–150 нм, у той самий час як у **16** такі частинки не спостерігаються. Ці відмінності автори пов'язують з їхньою різною будовою, каліксарени **15** та **17** мають виражену амфифільну природу, тоді як у **16** немає виражених ліпофільних доменів, здатних до неполярних міжмолекулярних взаємодій.

Для дослідів із трансфекції використовували плазмід ДНК pEGFP-C1, що кодує вироблення зеленого флуоресцентного протеїну, та клітинну лінію *RD-4* рабдоміосаркоми людини. Експерименти показали, що під час використання каліксаренів **15–17** ознак трансфекції не виявлено. Але комбінація каліксарену з діолеїлфосфатидилетаноламіном (DOPE) – цвіттерійним ліпідним компонентом природних мембран – є надзвичайно ефективною. Кількість протрансфектованих клітин становила 48% [47] для каліксарену **16**, у той час як для комерційного агента ліпофектаміну [37] – тільки 30%. Каліксарени **15** та **17** показали в цих умовах невисоку трансфекцію (3–7%). Механізм трансфекції у присутності DOPE є дуже складним, тому пояснення, чому каліксарен **16**, який не компактував ДНК (хоча добре з нею зв'язувався), проявив таку високу ефективність трансфекції, автори не навели.

Зовсім інакшу поведінку демонструють полігуанідинокаліксарени **9–14**. Калікс[6]- та калікс[8]арени **13** та **14**, тетраметоксикалікс[4]арен **9** та тетрапропоксикалікс[4]арен **11** у конформації *1,3-альтернат* не виявили здатність до трансфекції як самі по собі, так і за додавання DOPE. Це обумовлено неспроможністю цих макроциклів формувати компактні частинки з ДНК. У той же час, амфифільні каліксарени **10** та **12** показали незначну (менше 5%) здатність до трансфекції. Слід відзначити, що тетраоктилоксикаліксарен **12** при високих концентраціях (40 мкМ) сам по собі здатен промотувати транспорт ДНК, а для тетрапропоксикаліксарену **10** завжди необхідна «допомога» DOPE.

Серйозним недоліком тетрагуанідинокаліксаренів **9–14** є висока токсичність при концентраціях вище 25 мкМ. До того



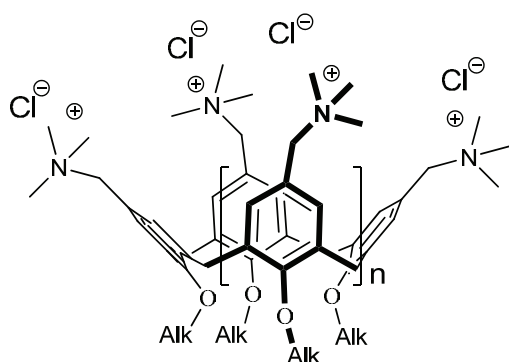
ж конформаційно мобільні каліксарени **9**, **11**, **13**, **14** менш токсичні, ніж амфіфільні конусоподібні аналоги **10** та **12**. Середовище інкубації, що містило тетраоктилтетрагуанідинокаліксарен **12** у концентрації 40 мкМ, спричинює практично 100% загибель клітин. Вживаність клітин є найбільшою (75–80%) для каліксарену **16**, який проявив також найвищий рівень трансфекції. Для каліксаренів **15** та **17** вживаність складала 60–70%.

Тетраалкіламонієві та імідазолєві каліксарени

Дослідження водних розчинів тетраалкіламонієвих похідних каліксаренів **18**, **20** показали, що вони здатні до самоасоціації у водних розчинах з утворенням міцелоподібних наночастинок розмірами 3–4 нм [48]. Калікс[4]арен **19** у конформації *1,3-альтернат* та калікс[6,8]арени **21** та **22** формують частинки більшого розміру (42–146 нм). Автори вважають, що це є везикулоподібні наночастинок, тобто заповнені водою пухирці, стінки яких утворені шаром каліксарену. Подальші дослідження калікс[4]аренів **18–20** у конформації *конус* та *1,3-альтернат*, а також конформаційно мобільних калікс[6 і 8]аренів **21** та **22** показали їхню здатність до самоасоціації і до комплексоутворення з біорелевантними молекулами. Методами спектроскопії протонного магнітного резонансу було встановлено, що вони зв'язують у комплекс типу «гість–господар» аніонні форми нуклеотидів (AMP, GMP, CMP, UMP, TMP, ADP та ATP). Методом ви-

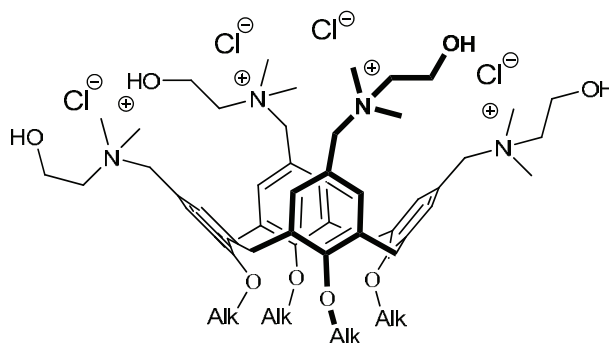
тиснення флуоресцентного бромистого етидію був виявлений значний афінитет каліксаренів **18–22** до модельних ДНК (полі-А-полі-Т, полі-Г-полі-Ц та полі-А-полі-У) та до природної ДНК із тимусу теляти (ТТ-ДНК). Одержані результати було підтверджено вимірюванням температури топлення ТТ-ДНК [49].

У роботах [50–52] описано синтез ряду катіонних холинових похідних каліксаренів **23–26** із загальним виходом 60–80%. Метою синтезу було збільшення спорідненості до ДНК (у разі порівняння з **18–22**) завдяки утворенню додаткових водневих зв'язків між гідроксильною групою холинових залишків **23–26** та вуглеводними і фосфатними групами ДНК. На процес зв'язування із ДНК впливає як хімічна будова каліксарену, так і природа навколишнього середовища, де відбувається зв'язування. Тому було проведено ґрунтовне дослідження водних буферних розчинів (Tris та Hepes) синтезованих каліксаренів [50, 51]. Методами флуоресцентної спектроскопії, флуоресцентної кореляційної спектроскопії та ЛКС було знайдено, що каліксарени **23–26** утворюють міцелярні наночастинок розміром від 3 нм (для тетрапропоксикаліксарену **23**) до 7 нм (для тетрадодецилоксикаліксарену **26**). Вони мають гідрофобне ядро та гідрофільну, позитивно заряджену поверхню (рис. 2). За допомогою флуоресцентного зонду – пірену – було знайдено критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ, концентрація, вище якої починається спонтанне утворення міцел) каліксаренів **23–26**. ККМ змінюється від 10^{-4} М (для тетрапропоксикаліксарену **23**) до $5 \cdot 10^{-7}$ М (для тетрадодецилоксикаліксарену **26**)



18–22

- 18**, $n = 1$, *cone* Alk = C_3H_7
- 19**, $n = 1$, *1,3-alt*, Alk = C_3H_7
- 20**, $n = 1$, *cone* Alk = C_6H_{13}
- 21**, $n = 3$, Alk = CH_3
- 22**, $n = 5$, Alk = CH_3



23–26

- 23**, Alk = C_3H_7
- 24**, Alk = C_6H_{13}
- 25**, Alk = C_8H_{17}
- 26**, Alk = $C_{12}H_{25}$

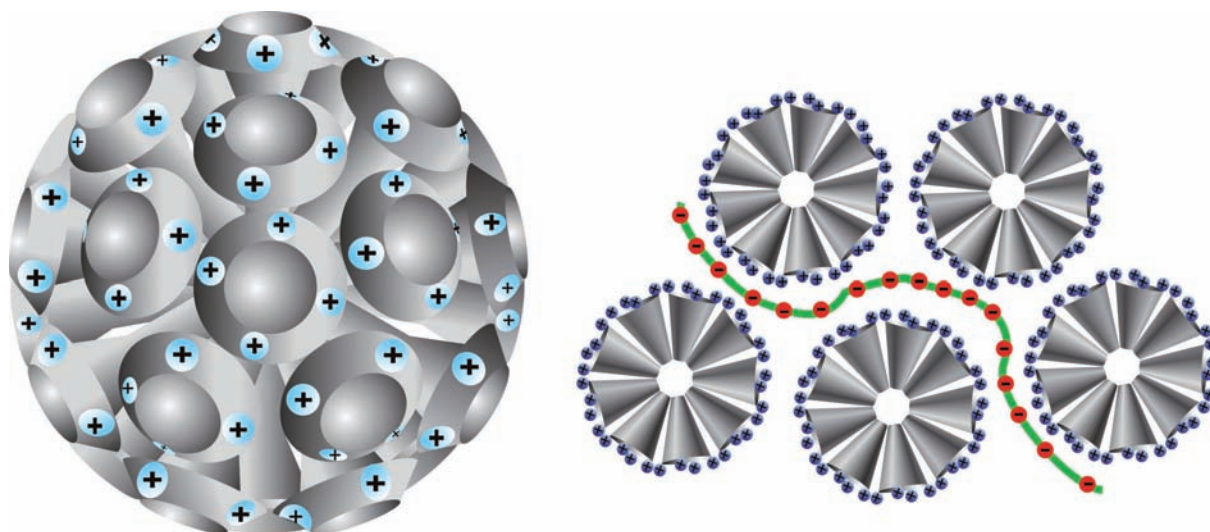


Рис. 2. Міцелоподібні наночастинки каліксарену **25** та наночастинки комплексу **25** з ДНК

у воді і приблизно у 3–10 разів нижче у буферних системах.

Досліди, проведені витисненням флуоресцентних зондів бромистого етидію та йо-йо-1, показали значний афінитет каліксаренів **24–26** до природної ТТ-ДНК [51–52]. Витиснення закінчувалось за N/P 1,2 (практично при нейтралізації зарядів). Гель-електрофоретичні дослідження, проведені із плазмідною ДНК, свідчать, що зв'язування відбувається повністю за N/P 1–1,5 для каліксаренів (**24–26**). Тетрапропосикаліксарен **23** у водних розчинах повністю зв'язує плазмиду при N/P 2, що пояснюється його недостатньою самоасоціацією в міцели за досліджуваних концентрацій.

Експерименти з розсіювання світла агрегатів каліксарен-ДНК показали утворення позитивно заряджених наночастинок із розмірами 40–100 нм у буферних розчинах каліксаренів **24–26** (рис. 2). Величина позитивного заряду наноміцел каліксарену **25** та наночастинок **25**-плазмідна ДНК були практично однакові, що свідчить про повне маскування заряду ДНК, а, отже, її знаходження тільки всередині частинки. Розрахунки щодо кількості міцел та молекул ДНК на одну наночастинку виявили, що як мінімум половина наночастинок містить тільки одну молекулу плазмиди.

Дослідження з трансфекції генів проводили із двома видами плазмід: люциферазною та плазмідною зеленого флуоресцентного протеїну на двох клітинних лініях: *HeLa* та *COS-7*. Як контроль використовували розчин ДНК та один із найефективніших агентів

для трансфекції – лінійний поліетиленімін JetPEI. Досліди проводили з тетрапропоси- та тетраоктилоксикаліксаренами **23** і **25** у концентраціях 10 та 25 мкМ, що дорівнювало співвідношенню N/P 2 та 5 відповідно. Внаслідок збільшення концентрації каліксаренів рівень трансфекції підвищувався на 2–3 порядки, але був у 50–100 разів менший за дію JetPEI, причому тетраоктилкаліксарен був на 3 порядки ефективнішим ніж тетрапропосикаліксарен. Під час комбінації з DOPE (1 : 1) ефективність трансфекції збільшувалась ще на порядок. Ефективність трансфекції у культурі *COS-7* клітин була у 10–20 разів вища, ніж у *HeLa* клітинах як для каліксаренів, так і для JetPEI.

Цитотоксичність каліксаренів оцінювали, визначаючи виживаність клітин після 48 год сумісної з каліксаренами інкубації, під час цього визначали кількість виробленого сукупного протеїну відносно контролю (рис. 3, б). Було показано, що за концентрацій 10 та 25 мкМ виживаність не зменшується нижче 85%, у той час як у JetPEI в концентрації 3 мкМ виживаність становить 55%. Тест МТТ [51] передбачає використання спеціального реагенту, який під дією ензимів живих клітин перетворюється на блакитнозакрашений формазан, а останній накопичується в живих клітинах. У цьому тесті досліджували каліксарени в концентраціях до 100 мкМ. Результати свідчать про їхню низьку цитотоксичність. Так, виживаність клітин складає для **23** – 80%, для **25** – 79%, для JetPEI – 35% відносно контролю (рис. 3, а).

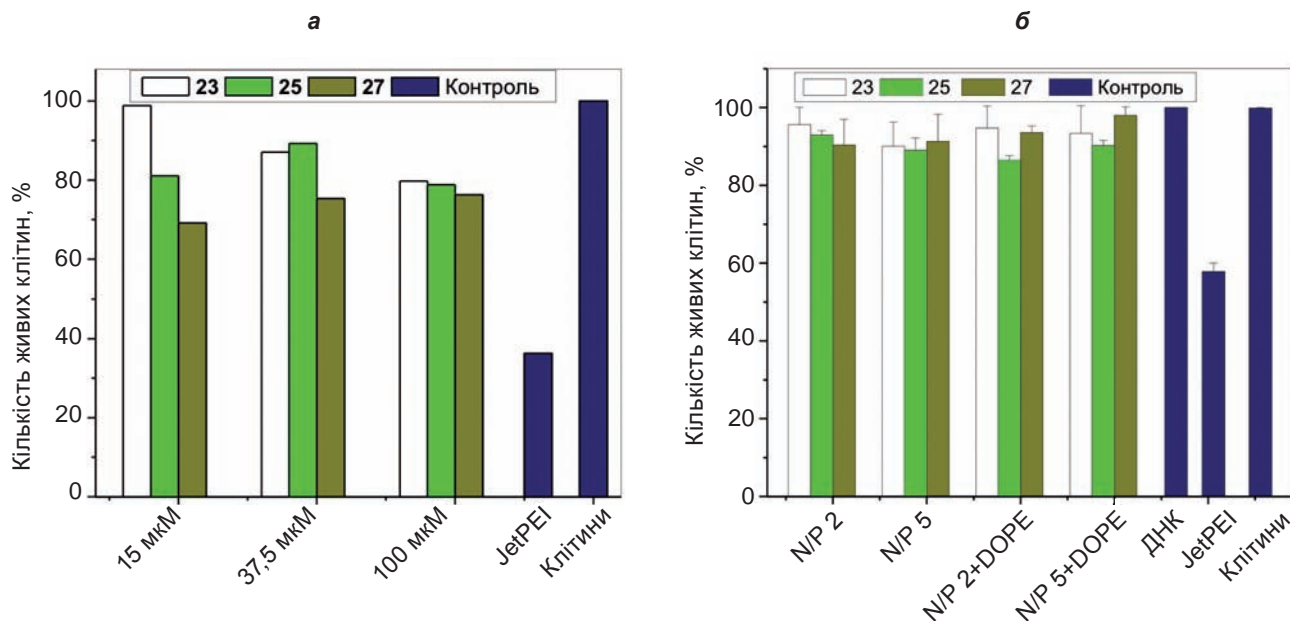
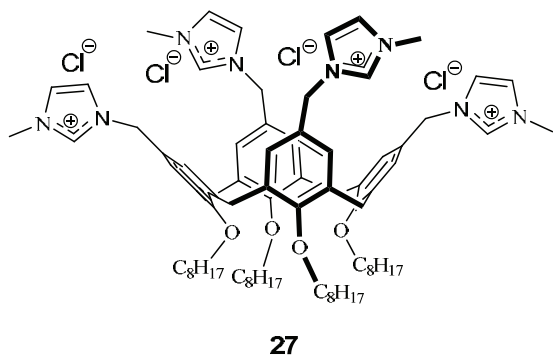


Рис. 3. Вживаність COS-7 клітин за дії водних розчинів каліксаренів: а – дані згідно зі стандартним МТТ-тестом; б – дані з визначення виробленого клітинами сукупного протеїну [51]

Паралельно з холіновими похідними каліксаренів досліджено амфифільний тетраоктилоксикаліксарен **27**, функціоналізований ароматичними замісниками – метил-імідазолієвими циклами.

Самоасоціація у водних розчинах та зв'язування з ДНК є близькими до каліксарену **25**. Міцели мають розмір 5,3 нм, ККМ 10^{-5} М, зв'язування із ДНК відбувається за N/P 1–1,5. Проте, рівень трансфекції для цього макроциклу на 10–20% нижчий, ніж для **25**. Це можна пояснити додатковим вкладом гідроксильних груп **25** у разі зв'язування ДНК в агрегати та їхнього транспортування всередину клітини. Під час використання DOPE перевага **25** зберігається, але щодо клітин *HeLa* (за N/P 5) каліксарен **27** виявляє на 10% вищу трансфекцію, ніж **25**.



Згідно з даними МТТ-тесту, токсичність імідазолієвого каліксарена **27** є вищою, ніж холінового аналогу **25**, але нижчою за JetPEI [51]. Вживаність клітин складає 70–75% у діапазоні концентрації від 15 до 100 мкМ.

Таким чином, трансфекція – це один із важливих інструментів генотерапії, що розробляється та вдосконалюється медиками, хіміками та біологами в усьому світі. Використання супрамолекулярних систем добре визначеної архітектури для проведення трансфекції ДНК є актуальним напрямом її розвитку. У цьому сенсі каліксарени зарекомендували себе як перспективні агенти. Неіонні глікокаліксрезорциарени, амінокаліксарени, полікатионні мультикаліксарени, тетрагуанідино- і тетраамонійні каліксарени виявили здатність зв'язувати ДНК та промотувати трансфекцію генів. Хоча глікокаліксрезорциарени утворюють невеликі наночастинки з ДНК, нейтралізація заряду останньої в таких частинках є слабкою. Цей факт не дає змоги розглядати такі сполуки як перспективні агенти для трансфекції. Полікатионні мультикаліксарени та тетрагуанідинокаліксарени утворюють з плазмідами комплекси, але добре вивченим цей процес і трансфекцію назвати не можна.

Механізм трансфекції був досить докладно вивчений на прикладі каліксаренів з амонієвими (холіновими та імідазолієвими) угрупованнями. Такі каліксарени шляхом

самоасоціації формують міцелярні частинки у водних системах. Останні здатні створювати із плазмідною невеликі унімодальні наночастинки, що містять одну плазмиду на частинку. Такі асоціати ефективно проникають всередину клітин і приводять до трансфекції.

Завдяки простоті синтезу можливо одержати малотоксичні амфифільні каліксаренові міцели із різноманітними за природою функціональними групами. Такі міцели здатні ефективніше та селективніше трансфектувати клітини. Це дає можливість знизити кількість необхідної ДНК і каліксарену і розробляти нові методики лікування захворювань.

Автор висловлює щирю подяку д. х. н. С. А. Климченку та члену-кореспонденту НАН України, д. х. н., професору В. І. Кальченку за плідну дискусію. Робота виконана в рамках спільних проектів НАНУ-CNRS, GRDI та PICS.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАЛИКСАРЕНОВ ДЛЯ ТРАНСФЕКЦИИ ДНК В КЛЕТКИ

Р. В. Родик

Институт органической химии
НАН Украины, Киев;
e-mail: dms0@ukr.net

В обзоре проанализированы и представлены первые результаты по использованию неионных и поликатионных каліксаренов для генной трансфекции. В общем виде показано состояние научных поисков новых невирусных векторов и продемонстрирована перспективность супрамолекулярного подхода к их дизайну. Выявлены некоторые взаимосвязи между свойствами каліксаренов и их способностью к трансфекции, а именно: создание супрамолекулярных самоассоциатов в водной среде способствует иерархичному формированию агрегатов с молекулами ДНК. Образованные частицы могут эффективно транспортировать ДНК внутрь клетки, если они являются наноразмерными и позитивно заряженными.

Ключевые слова: каліксарен, трансфекция, самоассоциация, плазида, цитотоксичность.

APPLICATION OF CALIXARENES FOR DNA TRANSFECTION IN CELLS

R. V. Rodik

Institute of Organic Chemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv,
e-mail: dms0@ukr.net

Summary

First results of non-ionic and poly-cationic calixarenes utilization for gene transfection are presented and analyzed in this survey. State of the art in the field of scientific searching for new non-viral vectors are shown in the general form. The prospects of supramolecular concept in design agents for transfection are demonstrated. Some relationships between calixarene architecture and calixarene ability to promote gene transfection are revealed, namely: formation of supramolecular self-assembled aggregates at water media facilitates hierarchical formation of complexes with DNA molecules. Latter particles will effectively transfect genes if they are nano-sized and positively-charged.

Key words: calixarene, transfection, self-assembly, plasmid, cytotoxicity.

1. Lavigne M. D., Gorecki D. C. // *Expert Opin. Emerg. Drugs* – 2006. – **11**. – P. 541–557.
2. Zuber G., Dauty E., Nothisen M. et al. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2001. – **52**. – P. 245–253.
3. Guillot-Nieckowski M., Eisler S., Diederich F. // *New J. Chem.* – 2007. – **31**. – P. 1111–1127.
4. Lee C. C., MacKay J. A., J. Frochet J. M., Szoka Jr F. C. // *Nat. Biotechnol.* – 2005. – **23**. – P. 1517–1526.
5. Reddy Panyala N., Peça-Mendez E. M., Havel J. // *J. Appl. Biomed.* – 2009. – **7**. – P. 75–91.
6. Liu J., Stace-Naughton A., Brinker C. J. // *Chem. Commun.* – 2009. – P. 5100–5102.
7. Dong L., Xu H., Liu Y.-B. et al. // *Cancer Gene Ther.* – 2009. – **16**. – P. 561–566.
8. Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – **60**. – P. 1638–1649.
9. Gao L., Nie L., Wang T., et al. // *Chem-BioChem.* – 2009. – **10**. – P. 239–242.

10. Tran P. A., Zhang L., Webster T. J. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2009. – **61**. – P. 1097–1114.
11. Hu L., Mao Z., Gao C. // *J. Mater. Sci.* – 2009. – **44**. – P. 3108–3115.
12. Demeneix B., Hassani Z., Behr J. P. // *Curr. Gene Ther.* – 2004. – **4**. – P. 445–455.
13. Nishikawa M., Huang L. // *Human Gene Therapy.* – 2001. – **12**. – P. 861–870.
14. Martin B., Sainlos M., Aissaoui A. et al. // *Curr. Pharm. Des.* – 2005. – **11**. – P. 375–394.
15. Mastrobattista E., van der Aa M. A. E. M., Hennink W. E., Crommelin D. J. A. // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2006. – **5**. – P. 115–121.
16. Kogure K., Akita H., Harashima H. // *J. Control Release.* – 2007. – **122**. – P. 246–251.
17. Kogure K., Akita H., Yamada Y., Harashima H. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – **60**. – P. 559–571.
18. Zuber G., Zammuto-Italiano L., Dauty E., Behr J. P. // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2003. – **42**. – P. 2666–2669.
19. Chittimalla C., Zammuto-Italiano L., Zuber G., Behr J. P. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – **127**. – P. 11436–11441.
20. Kostarelos K., Miller A. D. // *Chem. Soc. Rev.* – 2005. – **34**. – P. 970–994.
21. Ghosh P. S., Kim C. K., Han G. et al. // *ACS Nano.* – 2008. – **2**. – P. 2213–2216.
22. Green J. J., Zhou B. Y., Mitalipova M. M. et al. // *Nano Lett.* – 2008. – **8**. – P. 3126–3128.
23. Elemans J. A. A. W., Rowan A. E., Nolte R. J. M. // *J. Mater. Chem.* – 2003. – **13**. – P. 2661–2665.
24. Klymchenko A. S., Furukawa S., Mullen K. et al. // *Nano Lett.* – 2007. – **7**. – P. 791–796.
25. Ortiz Mellet C., Benito J. M., Garcia Fernandez J. M. // *Chem. Eur. J.* – 2010. – **16**. – P. 6728–6742.
26. Isobe H., Nakanishi W., Tomita N. et al. // *Chem. Asian J.* – 2006. – **1**. – P. 167–175.
27. Klumpp C., Lacerda L., Chaloin O., Ros T. D. et al. // *Chem. Commun.* – 2007. – P. 3762–3764.
28. Sitharaman B., Zacharian T. Y., Saraf A. et al. // *Mol. Pharm.* – 2008. – **5**. – P. 567–578.
29. Srinivasachari S.; Fichter K. M.; Reineke T. M. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – **130**. – P. 4618–4627.
30. Ortega-Caballero F., Ortiz Mellet C., Le Gourrierc L. et al. // *Org. Lett.* – 2008. – **10**. – P. 5143–5146.
31. Diaz-Moscoso A., Le Gourrierc L., Gomez-Garcia M. et al. // *Chem. Eur. J.* – 2009. – **15**. – P. 12871–12888.
32. Rasheed A., Kumar A. C. K., Sravanthi V. V. N. S. // *Sci. Pharm.* – 2008. – **76**. – P. 567–598.
33. Fujimoto T., Shimizu C., Hayashida O., Aoyama Y. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1997. – **119**. – P. 6676–6677.
34. Nakai T., Kanamori T., Sando S., Aoyama Y. // *Ibid.* – 2003. – **125**. – P. 8465–8475.
35. Aoyama Y. // *Trend. Glycosci. Glycotech.* – 2005. – **17**. – P. 39–47.
36. Hayashida O., Mizuki K., Akagi K. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – **125**. – P. 594–601.
37. Див. http://www.invitrogen.com/downloads/F-069843-LpofctLTX_FHR.pdf.
38. Aoyama Y., Kanamori T., Nakai T. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – **125**. – P. 3455–3457.
39. Aoyama Y. // *Chem. Eur. J.* – 2004. – **10**. – P. 588–593.
40. Nault L., Cumbo A., Pretot R. F. et al. // *Chem. Commun.* – 2010. – **46**. – P. 5581–5583.
41. Shahgaldian P., Da Silva E., Coleman A. W. // *Int. J. Pharm.* – 2003. – **253**. – P. 23–38.
42. Ehrler S., Piele U., Wirth-Heller A., Shahgaldian P. // *Chem. Commun.* – 2007. – P. 2605–2607.
43. Shahgaldian P., Sciotti M. A., Piele U. // *Langmuir.* – 2008. – **24**. – P. 8522–8526.
44. Lalor R., DiGesso J. L., Mueller A., Matthews S. E. // *Chem. Commun.* – 2007. – P. 4907–4909.
45. Sansone F., Dudic M., Donofrio G. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – **128**. – P. 14528–14536.
46. Dudic M., Colombo A., Sansone F. et al. // *Tetrahedron.* – 2004. – **60**. – P. 11613–11618.
47. Bagnacani V., Sansone F., Donofrio G. et al. // *Org. Lett.* – 2008. – **10**. – P. 3953–3956.
48. Arimori S., Nagasaki T., Shinkai S. // *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2.* – 1995. – **4**. – P. 679–683.
49. Shi Y., Schneider H. J. // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* – 1999. – P. 1797–1803.
50. Mchedlov-Petrosyan N. O., Vilko L. N., Vodolazkaya N. A. et al. // *Sensors.* – 2006. – **6**. – P. 962–977.
51. Rodik R. V., Klymchenko A. S., Jain N. et al. // *Chem. Eur. J.* – 2011. – **17**. – P. 5526–5538.
52. Rodik R. V., Jain N., Miroshnichenko S. I. et al. / 4-th International Summer School “Supramolecular systems in chemistry and biology” Regensburg, Germany, 12-15 September 2011, Book of abstracts, ST-24.

Отримано 06.06.2012