

## PRACA POGLĄDOWA

## Niewirusowe preparaty genowe – charakterystyka metod oceny właściwości fizykochemicznych

Non-viral gene preparations – methods of evaluation of physico-chemical properties

Emilia Kuźnicka<sup>1</sup>, Maciej Małecki<sup>1,2</sup>

## STRESZCZENIE

Stanowiące podstawę terapii genowej geny kodujące terapeutyczne białka wprowadzane są do komórek za pomocą nośników wirusowych i niewirusowych. Brak jednoznacznie bezpiecznych, a jednocześnie efektywnych metod wprowadzania genów sprawia, iż zastosowanie terapii genowej w klinice jest wciąż ograniczone. Prowadzone są intensywne badania poświęcone wektorom niewirusowym – nośnikom genów, które wydają się stabilne *in vitro* i bezpieczne dla pacjentów. Kompleksy molekularne plazmidowego DNA (pDNA) i związków polimerowych tworzą się spontanicznie, w wyniku oddziaływań elektrostatycznych. Sposób oddziaływania pDNA ze związkami polimerowymi wpływa na właściwości fizykochemiczne kompleksów pDNA : wektor kationowy, które mają ogromne znaczenie dla efektywności wprowadzania genów do komórek (transfekcji). Wdrażanie nowych, aktywnych biologicznie preparatów genowych do badań eksperymentalnych wiąże się z koniecznością prowadzenia prac poświęconych ocenie ich właściwości fizykochemicznych i biochemicznych, które wykonuje się metodami stosowanymi w laboratoriach inżynierii genetycznej; często szuka się również nowych rozwiązań analitycznych. W artykule podjęto próbę scharakteryzowania niewirusowych preparatów genowych głównie w kontekście oceny ich właściwości fizykochemicznych. Opisano aktualnie stosowane metody badania preparatów genowych. Świadomość możliwości prowadzenia w pracowniach różnych dyscyplin naukowych badań właściwości kompleksów pDNA : nośnik może pomóc w projektowaniu nowych preparatów genowych i próbach ich wykorzystania w leczeniu chorych.

## SŁOWA KLUCZOWE

niewirusowe preparaty genowe, kompleksy pDNA : nośnik, polimery kationowe, transfekcja

<sup>1</sup>Zakład Biologii Komórki  
Centrum Onkologii – Instytut  
im. Marii Skłodowskiej-Curie  
w Warszawie

<sup>2</sup>Zakład Biologii Molekularnej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

## ADRES

## DO KORESPONDENCJI:

Prof. dr hab. n. farm. Maciej Małecki  
Zakład Biologii Komórki  
Centrum Onkologii – Instytut  
im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie  
ul. Roentgena 5  
02-781 Warszawa  
tel. 22 546 26 20  
e-mail: mahan@poczta.wp.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2011, 65, 5–6, 67–79  
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach  
ISSN 0208-5607

## STRESZCZENIE

Gene therapy is based on the use of viral and non-viral nucleic acid preparations. They allow to administration of the therapeutic genes into targeted cells. Due to the lack of safe and effective methods of gene delivery, use of gene therapy in the clinic is restricted. The large attention is focused on studies of non-viral vectors, which seem to be stable and safe gene vehicles. Molecular complexes between plasmid DNA and cationic polymers, such as cationic lipids, polypeptides are formed spontaneously, as a result of electrostatic interactions. The mode of interaction of pDNA with polymeric compounds has a strict influence on physico-chemical properties of pDNA : cationic vector complexes. It is closely related to the gene transfer efficiency (transfection). The evaluation of physical and molecular mechanisms of complex formation is crucial for efficient gene administration into the cells. In this article various methods of studies of physico-chemical properties of pDNA : vehicle complexes are described with special attention to their experimental/clinical value.

## KEY WORDS

non-viral gene preparations, pDNA : vehicle complexes, cationic polymers, transfection

## WPROWADZENIE

Strategia terapeutyczna oparta na transferze do zmienionych chorobowo komórek genów kodujących białka terapeutyczne (terapia genowa) stanowi obiecujące podejście do leczenia chorych [1,2]. Protokoły kliniczne oparte na wykorzystaniu preparatów genowych opisywane są od ponad 20 lat (tab. I). Kliniczne zastosowanie metod transferu genów jest jednak ograni-

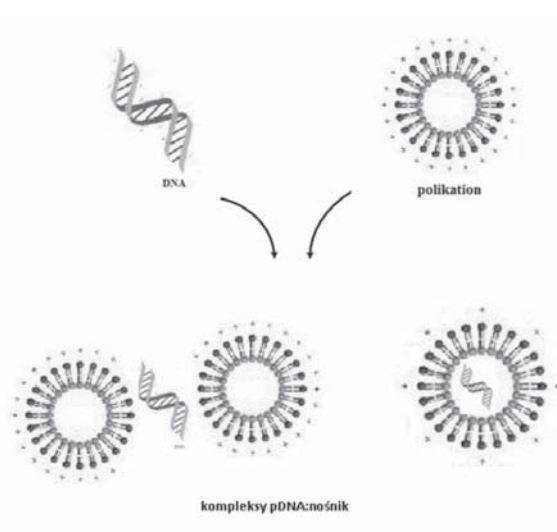
zione głównie z uwagi na brak jednoznacznie bezpiecznych i efektywnych nośników genów [2,3,4]. Obecnie w wielu protokołach terapii genowej wykorzystywane są preparaty niewirusowe, najczęściej formułowane jako plazmidowe DNA (pDNA) połączone z kationowym nośnikiem polimerowym – pDNA : nośnik. Mimo iż znane i powszechnie stosowane wektory wirusowe charakteryzują się wyższą efektywnością transfekcji, cechuje je równocześnie wyższa „toksyczność”, możliwość indukowa-

Tabela I. Próby kliniczne terapii genowej z wykorzystaniem niewirusowych preparatów genowych [18,66–71]

Table I. Clinical trials of gene therapy with use of nonviral plasmid specimens [18,66–71]

Kategoria kliniczna	Cel terapii, zastosowany gen	Sposób podania genu
Nowotwory: czerniak	immunostymulacja; <i>IL-2</i> , <i>GM-CSF</i>	lipofekcja, podanie śródskórne
Nowotwory: nowotwór nerki	immunostymulacja; <i>IL-2</i> , <i>HLA-B7</i>	lipofekcja, podanie śródskórne
Nowotwory: drobnokomórkowy rak płuca	immunostymulacja; <i>IL-2</i>	lipofekcja, podanie podskórne
Nowotwory: nowotwór jajnika	hamowanie angiogenezy; <i>IL-12</i>	lipofekcja, podanie dootrzewnowe
Nowotwory: glejak, gwiaździak	immunostymulacja; <i>INF</i>	lipofekcja, podanie doguzowe
Nowotwory: nowotwór piersi	stymulacja apoptozy; <i>BikDD</i>	lipofekcja, podanie dożylnie
Dziedziczne choroby monogenowe: miopatia ciała wtrętowego 2	korekta defektu genetycznego; <i>GNE</i>	lipofekcja, podanie domięśniowe
Dziedziczne choroby monogenowe: niedobór $\alpha$ -1-antytrypsyny	korekta defektu genetycznego <i>AAT</i>	lipofekcja, podanie donosowe
Dziedziczne choroby monogenowe: mukowiscydoza	korekta defektu genetycznego <i>CFTR</i>	polifekcja, lipofekcja, podanie donosowe, dooskrzelowe
Choroby sercowo-naczyniowe	stymulacja angiogenezy, <i>Del-1</i>	lipofekcja, podanie domięśniowe

nia np. mutagenyzy insercyjnej [4,5,6,7]. Stąd coraz więcej uwagi poświęca się biobezpiecznym preparatom niewirusowym, które mimo niższej skuteczności transfekcyjnej wydają się bezpieczne dla pacjenta, ich uzyskiwanie *in vitro* jest procedurą prostszą technicznie i wiąże się z niskimi kosztami [8,9,11]. W systemie niewirusowym łączy się zazwyczaj plazmidy bakteryjne, zawierające geny terapeutyczne, z dodatnio naładowanymi związkami [12]. Kompleksy tworzą się spontanicznie w wyniku oddziaływań elektrostatycznych między dodatnio naładowanymi grupami nośnika – związku polimerowego – a ujemnymi grupami fosforanowymi pDNA [13]. Powstałe cząstki charakteryzują się różnorodnością struktur, ich pDNA jest silnie upakowane i skondensowane, co ułatwia przedostawanie się terapeutycznych genów do komórki [4,8,14] (ryc. 1). Aktualnie jako nośniki plazmidowego pDNA wykorzystuje się lipidy, liposomy kationowe, kationowe polimery – polipeptydy, dendrymery, polietylenoiminy (PEI), kopolimery [12,16,17]. W badaniach klinicznych wśród niewirusowych metod wprowadzania genów najczęściej opisuje się lipofekcję (tab. I) [12,18].



**Ryc. 1.** Kompleksy pDNA : nośnik. Związki polikationowe poprzez neutralizację ładunku pDNA powodują kondensację kwasu nukleinowego. Powstające cząstki przybierają różne struktury i kształty, gdyż oddziaływania elektrostatyczne nośnika z pDNA powodują zmiany konformacyjne obu komponentów ([15], zmienione).

**Fig. 1.** pDNA : carrier complexes. Polycationic compounds trigger nucleic acid condensation through pDNA neutralization. Originated particles take different structures and forms, since electrostatic interactions between carrier and pDNA cause conformational changes of both components ([15], changed).

Wyniki prac doświadczalnych wskazują, iż kompleksy pDNA : nośnik mogą dostać się do komórki niespecyficznie bądź specyficznie przez endocytozę receptorową [8,11]. Efektywność transferu genów może być zwiększona przez optymalizację właściwości fizykochemicznych cząstek (wielkości i ładunku kompleksu, stosunku polimeru do pDNA, budowy związku polimerowego) [11,16]. Zwykle nośniki genów są charakteryzowane pod względem ich wpływu na efekt biologiczny, który wywiera na komórki preparat genowy – zdolności pokonywania bariery błony komórkowej i udziału w ekspresji transgeny. Badanie wydajności transfekcji na poziomie komórkowym nie dostarcza jednak wyczerpujących informacji o charakterystyce preparatu genowego – fizykochemicznym mechanizmie tworzenia kompleksów decydującym o efektywności wprowadzania genów do komórek [1,12]. W celu zwiększenia skuteczności transferu genów konieczne jest wykonywanie badań *in vitro* uwzględniających molekularne mechanizmy tworzenia kompleksów, np. zmian konformacyjnych drugo- i trzeciorzędowej struktury pDNA, a także zachowania się związków polimerowych podczas powstawania kompleksów [11]. Badania dotyczące interakcji pDNA : nośnik, zmian strukturalnych, zmian energii związanych z tworzeniem kompleksów są podstawą optymalizacji protokołów transfekcji [19]. W niniejszym artykule scharakteryzowano preparaty genowe głównie w kontekście metod oceny właściwości fizykochemicznych kompleksów pDNA : nośnik. Praca przybliży zagadnienia dotyczące terapii genowej, prób wykorzystania preparatów genowych do celów terapeutycznych.

## 2. ANALIZA STOPNIA SKOMPLEKSOWANIA pDNA Z NOŚNIKIEM

### 2.1. SPEKTROSKOPIA FLUORESCENCJI

#### 2.1.1. Bromek etydyny

Metoda wygaszania fluorescencji barwników, np. bromku etydyny (EtBr), wykorzystywana jest do oceny wydajności kondensacji pDNA w utworzonych kompleksach [20]. Bromek etydyny interkaluje między pary zasad pDNA i odgrywa rolę sondy fluorescencyjnej. Barwnik związany z pDNA po wzbudzeniu przez kwant światła emituje intensywny sygnał o długości fali 590–595 nm, natomiast znajdujący się w roztworze barwnik niezwiązany

słabo fluoryzuje [8,21]. Proces formowania skondensowanych kompleksów między pDNA i polikationem powoduje blokowanie miejsc wiązania się barwnika fluorescencyjnego do pDNA, toteż po dodaniu nośnika do roztworu obserwuje się natychmiastowy spadek fluorescencji. Zjawisko to jest podstawą oceny stopnia kondensacji plazmidu przez polimer [8,21]. Podczas preparatyki prób do roztworu pDNA dodawane są kolejno EtBr i związek polimerowy [4,21,22] bądź kompleksy pDNA : polimer poddaje się ekspozycji na EtBr [8,23,24]. Tak przygotowane próby poddaje się pomiarowi fluorescencji, od którego odejmowany jest pomiar fluorescencji roztworu EtBr i obliczany procent fluorescencji badanej próby w stosunku do kontroli (wartość fluorescencji pDNA z EtBr). Zwykle intensywność fluorescencji mierzona jest jako funkcja stosunku ładunków, co wyraża się liczbą moli o ładunku dodatnim (np. grup aminowych związku polimerowego) dzieloną przez liczbę moli o ładunku ujemnym (reszt fosforanowych pDNA) [24]. Wraz ze wzrostem ilości dodawanego związku polimerowego wzrasta stosunek ładunków kompleksu, a wartość fluorescencji spada. Najwyższy stopień wygaszenia obserwuje się od około punktu neutralizacji kompleksu, tj. wtedy gdy dodatni ładunek związku polimerowego równoważy ujemny ładunek grup fosforanowych pDNA [4]. Jak donoszą Barteau i wsp. [24], dla kompleksów mających stosunek ładunków od 0 do 1 intensywność fluorescencji drastycznie spada od 100% do wartości zbliżonych do 0 i pozostaje na tym poziomie dla lipopleksów ze stosunkiem ładunków większym niż 1. Wynik taki oznacza, że plazmid pDNA był częściowo dostępny dla barwnika dla stosunku ładunków od 0 do 1, natomiast dla wyższych stosunków ładunków molekule pDNA były skondensowane przez lipid kationowy, a barwnik nie miał do nich dostępu [24]. Za pomocą metody wygaszania fluorescencji EtBr w roztworze, niemożliwe jest, niestety, określenie, czy fluorescencja kompleksów o stosunku ładunków poniżej 1 spowodowana jest występowaniem wolnego pDNA czy obecnością pDNA luźno związanego z kompleksami, które jest ciągle dostępne dla barwnika fluorescencyjnego [4,24].

### 2.1.2. PicoGreen

Do oceny efektywności wiązania plazmidowego pDNA przez liposomy kationowe wykorzystuje się również barwnik PicoGreen [25]. Bar-

wnik wiąże się specyficznie z dwuniciowym pDNA i fluoryzuje tylko wtedy, gdy jest do niego przyłączony. Do pomiaru spektrofлуorymetrycznego wykorzystuje się fale wzbudzenia i emisji o długości odpowiednio 495 nm i 595 nm [26]. Mierzy się wartość fluorescencji lipopleksów z dodatkiem PicoGreen, a następnie porównuje się uzyskany wynik z wartością fluorescencji lipopleksów otrzymaną po potraktowaniu badanej próby/ich detergentem (Triton X-100). Dodanie detergentu powoduje lizę lipidowych składników lipopleksów i ekspozycję plazmidowego pDNA na barwnik obecny w roztworze [25]. Można także porównywać wartość pomiaru fluorescencji lipopleksu z PicoGreen z wartością fluorescencji barwnika związanego z plazmidowym pDNA. Sposób taki wykorzystano do oceny wpływu różnych substancji nośnych (NaCl, PBS) na ilość pDNA dostępnego w kompleksach [23].

### 2.2. TEST RETARDACJI W ŻELU AGAROWYM

Test retardacji w żelu agarowym z dodatkiem EtBr jest metodą, pozwalającą dokładniej niż w metodzie fluorescencyjnej określić stopień kondensacji pDNA w kompleksie [20,27]. Test retardacji umożliwia ustalenie takiego stosunku ładunków dodatnich do ładunków ujemnych kompleksu, w którym ilość niezwiązanego pDNA jest jak najmniejsza [28]. Zmniejszenie mobilności pDNA w żelu podczas elektroforezy jest wynikiem tworzenia się kompleksów między pDNA i kationowym nośnikiem [9]. W związku z występowaniem względnego ładunku i różnic w wielkości między kompleksami i plazmidowym pDNA, ich rozdział elektroforetyczny powoduje powstanie oddzielnych prążków [12]. Wraz ze wzrostem stosunku (+/-) kompleksów maleje ilość pDNA wolnego lub luźno związanego, co uwiadczenia malejąca intensywność fluorescencji prążków znajdujących się w dolnej partii żelu, aż do całkowitego jej zaniku. Fluorescencja prążków w dołkach w górnej partii żelu wskazuje na obecność kompleksów z luźno związanym pDNA. Przy dodatnim stosunku ładunków brak fluorescencji w górnej partii żelu, następuje całkowita retardacja. Wówczas pDNA jest silnie skompleksowane z dodatnim nośnikiem, przez co EtBr nie ma dostępu do molekulek pDNA [4,11,13,24]. Duży nadmiar ładunku dodatniego kompleksu dla tego stanu może wskazywać na to, iż nie wszystkie dodatnie molekule polikationu biorą udział

w tworzeniu kompleksu [12]. Stosunek (+/-) kompleksów, w którym zachodzi całkowita retardacja, jest różny dla różnych polimerów i zależy od ich chemicznej struktury [11]. Za pomocą tej metody badano stopień kondensacji pDNA dla polimerów takich jak: PAA (polichlorowodorek alliloaminy), PDMAEM (polimetakrylan dimetyloaminoetylu) [11], pTMAEM (polichlorek N-trzymetyloamonowy etylometakrylanu) [4,11] i jego kopolimerów z VP (1-winylo-2-pirolidonem) i MMA (metyloetakrylanem) [4]; kopolimerów PEO-PEI (polietylenoiminy z politlenkiem etylu) [13], polimerów polilizynowych i polihistydynowych [8], lipidów kationowych [22,23,24,29].

### 2.3. CHROMATOGRAFIA KOLUMNOWA

W celu określenia ilości/wielkości pDNA zamkniętego bądź wiążanego przez liposomy należy przeprowadzić ilościową analizę związku polimerowego oraz plazmidu (przez zastosowanie spektroskopii UV-VIS lub spektroskopii fluorescencyjnej). Na kolumnach żelowych (wypełnionych Sephadexem lub Sepharozą) przeprowadza się rozdział niezwiązanych cząstek DNA od kompleksów. Kompleksy jako stosunkowo większe będą wypływać z kolumny jako pierwsze; pDNA z kompleksów uwalnia się przez dodanie Triton X-100 [30].

Zespół kanadyjskich naukowców zastosował do charakterystyki enkapsulacji pDNA chromatografię kolumnową jonowymienną oraz dokonał pomiaru radioaktywności pDNA i lipidów w zebranych frakcjach, wyznakowanych odpowiednio za pomocą  $^3\text{H}$  i  $^{14}\text{C}$ . Wartości radioaktywności zostały porównane z próbami referencyjnymi. Odzysk  $^3\text{H}$  reprezentował frakcję pDNA związanego z liposomami, która wypłynęła z jonowymieniacza, natomiast odzysk  $^{14}\text{C}$  określał frakcję lipidów znajdującą się w objętości międzyziarnowej kolumny [31].

### 2.4. ULTRAWIROWANIE ORAZ WIROWANIE W GRADIENTCIE GĘSTOŚCI

Metody polegają na wirowaniu, podczas którego wytwarza się stan równowagi wewnątrz układu i następuje sedymentacja równowagowa materiału. Powstały rozkład mas w roztworze można poddać analizie i przełożyć na absolutną masę cząsteczkową, która może posłużyć do obliczenia wielkości cząstek. Inna metoda proponuje pomiar prędkości, w której sedymentują cząstki (prędkość sedymentacji), co

pozwała na określenie ich hydrodynamicznej wielkości [12]. Wykorzystuje się również pomiar sedymentacji cząstek w gradiencie gęstości substancji rozpuszczonych, np. sacharozy, glukozy [31,32]. Wirowanie cząstek w gradiencie gęstości rozdziela cząstki pod względem ich wielkości i gęstości. Grupa holenderskich naukowców [33] wykorzystwała metodę wirowania w gradiencie gęstości dekstranu do oceny wpływu obecności surowicy na tworzenie lipopleksów. Dzięki wyznakowaniu kompleksów pDNA/lipid za pomocą N-Rh-PE (N-rodaminofosfatydyloetanolaminy, która pozwala na uwidocznienie obecności lipidów w świetle dziennym) oraz dodaniu do roztworów dekstranu EtBr, naukowcy mogli wyróżnić różne frakcje mieszaniny w poszczególnych warunkach oraz ocenić, czy lipidy wiążą pDNA we wszystkich powstałych lipopleksach [33]. W badaniach prowadzonych przez zespół Mok i wsp. [31] kompleksy zostały wyznakowane  $^{14}\text{C}$  i  $^3\text{H}$  oraz poddane wirowaniu w gradiencie glukozy. Badanie radioaktywności poszczególnych frakcji pozwoliło na określenie, który prążek odpowiadający lipopleksom ma największą zawartość pDNA. pDNA z tego prążka wykorzystano następnie do transfekcji [31]. Metodę wirowania oraz metodę wirowania w gradiencie gęstości Ficollu (silnie rozgałęzionego kopolimeru cukru trzcinowego i epichlorohydryny, rozpuszczalnego w wodzie, stosowanego w celu wyznaczania gęstości i lepkości substancji) wykorzystuje się do oddzielenia niezwiązanych z kompleksami cząsteczek pDNA i dokonania spektrofotometrycznego pomiaru jego ilości (przy długości fali 260 nm) [25,34,35]. W badaniu wolne pDNA ulega sedymentacji do dolnej frakcji zawartości próbówki. Ten sposób oddzielania wolnego pDNA ma wiele zalet: pozwala na ponowne wykorzystanie niezwiązanego w kompleksach plazmidu, oddzielone prążki odpowiadające poszczególnym elementom próby są widzialne bez konieczności użycia barwników i światła UV, zaś ekstrakcja odpowiednich faz z próbek nie jest pracochłonna. Pozwala to na obniżenie kosztów przeprowadzanych badań [35].

## 3. OCENA STRUKTURY KOMPLEKSÓW

### pDNA : NOŚNIK

#### 3.1. SPEKTROSKOPIA KORELACJI FOTONOWEJ

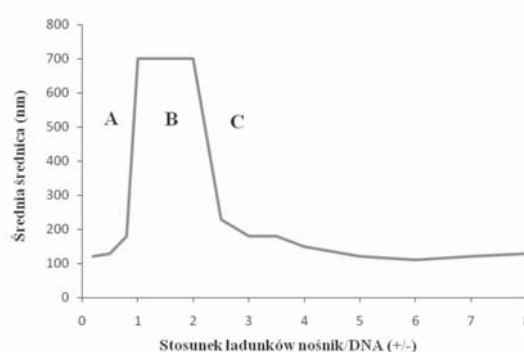
Zdolność związków polimerowych do kondensacji pDNA do cząstek o wymiarach rzędu nanomerów jest kluczowa w kontekście

wprowadzania genów do komórek dzięki mechanizmom endocytozy [3]. W wielu typach komórek ssaków zjawisko to ograniczone jest do cząstek o średnicy mniejszej od 150 nm [36]. Dla zbadania, w jaki sposób masa cząsteczkowa związku i jego struktura wpływają na kondensację pDNA, dokonuje się pomiarów wielkości utworzonych kompleksów [3]. Do określenia średnicy kompleksów pDNA/polimer wykorzystuje się spektroskopię korelacji fotonowej, czyli metodę statycznego rozproszenia światła (SLS) lub częściej używaną metodę dynamicznego rozproszenia światła (DLS). Metody polegają na mierzeniu czasowych zmian w ilości rozpraszanego przez cząstkę światła i poddawaniu tych pomiarów analizie. Dyfuzja cząstek w próbce, jej szybkość jest źródłem fluktuacji czasowych natężenia światła rozproszonego. Za pomocą funkcji autokorelacji można wyznaczyć stałą dyfuzji cząstek oraz ich średnicę hydrodynamiczną. Obecność procesora rozkładu wielkości cząstek pozwala wyznaczyć rozkład wielkości cząstek (polidispersyjność) [12,37]. Wielkość średnicy kompleksu, powiązana z jego stabilnością koloidalną, zmienia się zależnie od funkcji stosunku ładunków (+/-) cząstek oraz rodzaju użytego polimeru [24,38]. Wraz ze wzrostem stosunku wagowego polimer/pDNA obserwuje się polepszenie właściwości kondensujących związków polimerowych [4].

Wyróżnia się trzy strefy stabilności koloidalnej: A – strefa stabilnych koloidalnie, odpychających się nawzajem cząstek, o małych rozmiarach (< 200 nm dla lipopleksów i niektórych polipleksów), ujemnym stosunku ładunków i pDNA luźno związanym do kompleksów; B – strefa niestabilnych koloidalnie agregatów cząstek, zawierających skondensowane pDNA, o neutralnym stosunku ładunków i dużych rozmiarach, zwiększony rozmiar cząstek jest rezultatem agregacji w wyniku oddziaływań van der Waalsa między małymi, pojedynczymi kompleksami; C – strefa stabilnych koloidalnie kompleksów, zawierających skondensowane pDNA, charakteryzujących się małymi rozmiarami ( $\leq 200$  nm dla lipopleksów i niektórych polipleksów), dodatnim stosunkiem ładunków i wzajemnym odpychaniem się [4,8,14,24,39] (ryc. 2).

Niektóre związki polimerowe tworzą z pDNA kompleksy dużych rozmiarów przy stosunku ładunków powyżej punktu neutralności (np. 4, 3, 2). Na stabilność i wielkość kompleksów o danym stosunku ładunków wpływa wiele

czynników, jak np. stężenie nośnika (np. NaCl), rodzaj użytego buforu (Hepes, DMEM, PBS), występowanie surowicy, wartość pH, stężenie pDNA, długość łańcuchów reszt kwasowych lipidów kationowych [8,13,24]. Przykładem są kompleksy PEI (25 kDa)/pDNA o stosunku ładunków 4 : 1, tworzące agregaty o dużych rozmiarach (> 300 nm) i dużej polidispersyjności w buforach zawierających fosforan (np. PBS), natomiast w buforach HEPES i HBS tworzące cząstki małe (90 do 120 nm) [13].



**Ryc. 2.** Stabilność koloidalna kompleksu pDNA : nośnik (pDNA/Lipopoliamina; lipopleks) zależnie od stosunku ładunków (+/-) cząstek, wyznaczona metodą spektroskopii korelacji fotonowej. Strefy A i C odpowiadają stabilnym koloidalnie kompleksom, a strefa B niestabilnym koloidalnie agregatom cząstek, opis w tekście ([23], zmienione).

**Fig. 2.** Colloidal stability of pDNA : carrier complex (pDNA/Lipopolyamine; lipoplex) depending on charge ratio (+/-) of particles, determined by dynamic light scattering. Zones A and C refer to colloidally stable complexes, whereas zone B refers to colloidally unstable aggregates, description in text ([23], changed).

### 3.2. POTENCJAŁ ZETA

Potencjał Zeta ( $\zeta$ ) jest podstawowym parametrem, opisującym zachowanie się cząstek w zawiesinie, służącym do badania elektrostatycznych właściwości zawiesin i pozwalającym na kontrolowanie powstawania agregatów koloidalnych cząsteczek [4,30]. Wartość potencjału Zeta pozwala określić ładunek powierzchniowy cząsteczki.

Elektrostatyczne interakcje między powierzchnią związku polimerowego oraz pDNA są siłą napędową procesu kompleksowania i kondensacji pDNA, dlatego badanie potencjału Zeta lub/i ruchliwości elektroforetycznej jest pomocne w lepszym zrozumieniu formowania się kompleksów [14]. Doniesienia literaturowe wskazują, że dodatni ładunek nanocząstek oraz ich niewielkie rozmiary (90–150 nm) wpły-

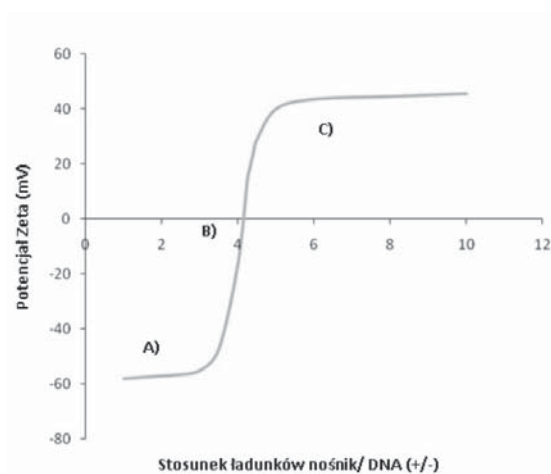
wają na ich efektywne przedostawanie się do komórek i wydają ekspresję niesionych przez nie genów [3,12]. Jest to prawdopodobnie wynikiem mechanizmu wnikania cząstek do komórek, którego początkowe etapy dotyczą elektrostatycznych interakcji między dodatnio naładowanymi cząstkami a wysoce ujemnie naładowanymi proteoglikanami powierzchni komórki [40,41].

Pomiaru potencjału Zeta dokonuje się techniką elektroforetyczną, w której cząstki migrują w zewnątrznie przyłożonym polu elektromagnetycznym [12,30]. Cząstki poruszają się wraz z warstwą Sterna (zwaną też płaszczyzną poslizgu lub warstwą hydrodynamiczną), tzn. warstwą jonów z roztworu, które dotykają powierzchni cząstki i są z nią silniej związane niż jony rozproszone w roztworze. Potencjał Zeta jest potencjałem występującym tuż poza obszarem tej ściśle połączonej warstwy Sterna i wyznaczającym szybkość migracji cząstek [30,42]. Potencjał Zeta cząstek jest obliczany na podstawie wartości ruchliwości elektroforetycznej przez zastosowanie równania Smoluchowskiego [13,14]. Wartość potencjału Zeta jest nieznacznie mniejsza od potencjału powierzchniowego cząstki, gdyż znajduje się on w niewielkiej odległości od powierzchni cząstki [30].

Potencjał Zeta zmienia się zależnie od stosunku ładunków cząstki (od stosunku wagowego lipidu do pDNA). Obserwuje się główną tendencję, w której wraz ze wzrostem stosunku ładunków (+/-) kompleksów rośnie wartość potencjału Zeta. Świadczy to o tym, iż dodatnio naładowane grupy aminowe związków polimerowych stopniowo neutralizują fosforanowe grupy pDNA [13]. Wykres zależności wartości potencjału Zeta od stosunku ładunków cząstek (lub stosunku wagowego) ma kształt sigmoidalny.

Na wykresie można wyróżnić trzy regiony dla potencjału Zeta: A – region, w którym wypadkowa ładunków kompleksu oraz potencjał Zeta są ujemne, co wskazuje na obecność nadmiaru nieskompleksowanego pDNA, będącego przyczyną ujemnego ładunku powierzchniowego; B – region, w którym zachodzi inwersja z ujemnych wartości potencjału Zeta na dodatnie, zwrot ten zachodzi w punkcie lub blisko punktu, w którym stosunek ładunków (+/-) cząstek jest neutralny, wskazując na to, iż grupa amina pierwszorzędowa oddziałuje z jedną grupą fosforanową pDNA; C – region, w którym wypadkowa ładunków kompleksów

oraz potencjał Zeta są dodatnie. W obszarze tym występuje znaczny nadmiar grup aminowych związków polimerowych w stosunku do grup fosforanowych [4,14,38] (ryc. 3).



**Ryc. 3.** Wartości potencjału Zeta kompleksu nośnik : pDNA (lipopleksu) zależnie od stosunku ładunków (+/-) cząstek. Strefy A, B i C odpowiadają kolejno ujemnej, neutralnej i dodatniej wypadkowej ładunków kompleksu; opis w tekście ([14], zmienione).

**Fig. 3.** The Zeta potential of carrier : pDNA complex (lipoplex) depending on charge ratio (+/-) of particles. Zones A, B and C refer to negative, neutral and positive resultant charge ratio of the complex, respectively; description in text ([14], changed).

Wartość potencjału Zeta zależy od siły jonowej roztworu elektrolitu, a zatem jego stężenia: w niskich stężeniach roztworu jest bardzo zbliżona do jego ładunku powierzchniowego, natomiast w elektrolitach silnych zanika szybciej, zbliża się do 0. Zaleca się przeprowadzanie badań potencjału Zeta w elektrolitach o stężeniu 1 mM i mniejszym [30], aczkolwiek niektórzy badacze wykazują, że stężenie i rodzaj elektrolitu nie mają bezpośredniego wpływu na  $\zeta$  kompleksów; podkreślają natomiast, iż np. ze wzrostem temperatury dochodzi do spadku ruchliwości elektroforetycznej, lepkości i przenikalności elektrycznej, co prowadzi do obniżenia wartości potencjału Zeta [14].

### 3.3. MIKROSKOPIA

Za pomocą badań mikroskopowych można obserwować morfologię (np. wielkość i kształt) kompleksów pDNA/polimer oraz zmiany w strukturze poszczególnych komponentów kompleksu powstałe w wyniku makromolekularnych oddziaływań pDNA ze związkiem polimerowym. Na podstawie obrazów mikrosko-

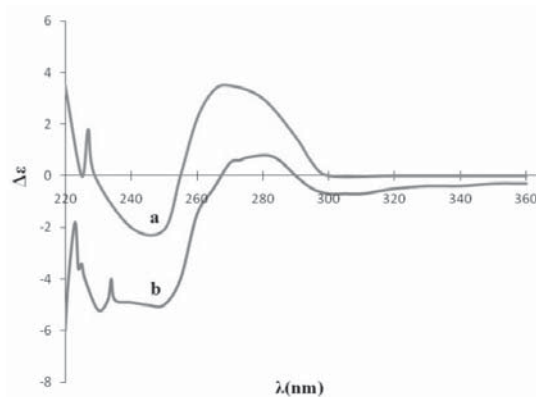
powych można stwierdzić, czy zastosowanie wybranego związku polimerowego w kontekście jego ładunku, w określonej ilości, wpływa na morfologię i strukturę powstających cząstek [43]. Obecnie wykorzystuje się metody mikroskopii elektronowej (ME) [11,13,25,38] i kriotransmisyjnej mikroskopii elektronowej (cryo-TEM) [14,24,43,44,45,46,47], mikroskopii sił atomowych (ATM) [33,48], skaningowej mikroskopii tunelowej (STM), mikroskopii świetlnej [34], mikroskopii fluorescencyjnej [49], mikroskopii kontrastu różnicowo-interferencyjnego (DIC) [49], mikroskopii rentgenowskiej (XRD) [24,49,50,51] oraz niskokątowe rozproszenie promieni X (SAXS) [24,46,49,52]. Zależnie od składu kompleksu i relatywnej zawartości poszczególnych komponentów obserwuje się różne formy strukturalne kompleksów. Jak stwierdzono za pomocą XRD oraz SAXS, lipopleksy występują najczęściej w postaci wielowarstwowych struktur, w których helikalne pDNA skondensowane jest między warstwami liposomów [49]. Dodanie lipidu neutralnego (np. DOPE, dioleilofosfatydyloetanolamina) do kompleksu lipid kationowy/pDNA powoduje zmianę strukturalną i ze stadium lamellarnego kompleksu przechodzi on w stan walcowatej ciekłokrystalicznej heksagonalnej sieci, co uwidoczniły obrazy uzyskane w mikroskopie rentgenowskim [50,51]. Wykazano, że taka forma kompleksów może wpływać na zwiększoną efektywność transfekcji [30,53].

Kriotransmisyjna mikroskopia elektronowa pozwala określać zarówno kształt cząstek, jak też ich wielkość [14]. Podczas preparatyki próba jest bardzo szybko zamrażana, dzięki czemu badany materiał jest obrazowany w stanie bardzo bliskim do naturalnego. Jest to bardzo ważne w przypadku powstawania zróżnicowanych struktur, powstających w wyniku interakcji komponentów kompleksów. Gdy stosunek pDNA do związku polimerowego zbliża się do stanu neutralności, w obrazach mikroskopowych obserwuje się wolne lub luźno związane plazmidy w obszarach okalających kompleksy. Metoda cryo-TEM nie pozwala natomiast na ilościowe określenie granicznego stosunku pDNA/polimer, w którym następuje całkowite wyłapanie pDNA bądź jego przyłączenie [43]. Rozwój tej techniki mikroskopii ma jednak na celu ominięcie problemów wynikających z negatywnego wpływu próżni, zniszczeń radiacyjnych lub pojawiania się artefaktów, znanych

z chemicznych metod utrwalania i kontrastowania prób badanego materiału [24].

#### 3.4. SPEKTROSKOPIA DICHROIZMU KOŁOWEGO (CD)

Technika dotyczy badania helikalnej struktury pDNA przez pomiar różnicy absorpcji prawo- i lewoskrętnie spolaryzowanego kołowo światła. Zasady azotowe w pDNA mają regularny heliakalny układ, co powoduje, że molekuly pDNA wykazują bardzo silną aktywność optyczną [12]. Standardowa forma helisy B-pDNA ma charakterystyczne widmo absorpcyjne, w którym widoczny jest silny pozytywny pik (przy  $\lambda \sim 270\text{--}280\text{ nm}$ ) oraz silny negatywny sygnał (przy  $\lambda \sim 240\text{--}250\text{ nm}$ ). Dodanie związku polimerowego do pDNA powoduje przesunięcie obu pasm widma absorpcyjnego, a także zmniejszenie intensywności pozytywnego sygnału (przy  $\lambda \sim 270\text{--}280\text{ nm}$ ) (ryc. 4). Modyfikacje spowodowane są małymi zmianami w interakcjach między zasadami pDNA. Obraz widma absorpcyjnego CD zależy od budowy dodanego związku polimerowego oraz stosunku ładunków (+/-) kompleksu [11,12,45,54]. Ponieważ widma absorpcyjne CD kompleksów są uwarunkowane budową kompleksów, za pomocą CD można obserwować stan pDNA lipopleksów i polipleksów



**Ryc. 4.** Widmo absorpcyjne CD (a) pDNA oraz (b) pDNA skompleksowanego ze związkiem polimerowym (lipidem kationowym). Dodanie nośnika do pDNA powoduje przesunięcie pasm absorpcyjnych oraz zmniejszenie intensywności pozytywnego sygnału ( $\Delta\epsilon$ , przy  $\lambda \sim 270\text{--}280\text{ nm}$ ), opis w tekście ([45], zmienione).

**Fig. 4.** Circular dichroism absorbance spectrum of (a) pDNA and (b) pDNA complexed with polymeric compound (cationic lipid). Adding the carrier to pDNA causes the shift of absorption bands and decrease in intensity of the positive signal ( $\Delta\epsilon$ , at  $\lambda \sim 270\text{--}280\text{ nm}$ ), description in text ([45], changed).



[55,56,57]. Zespół naukowców rosyjskich za pomocą CD wykazał, iż pDNA skondensowane w polipleksach, w których stosunek molarowy polimeru do pDNA jest większy od 1, jest chronione przed protonacją, co oznacza, że polikationy w takich kompleksach chronią pDNA przed wpływem różnych czynników zewnętrznych [11].

### 3.5. SPEKTROSKOPIA KORELACJI FLUORESCENCJI (FCS)

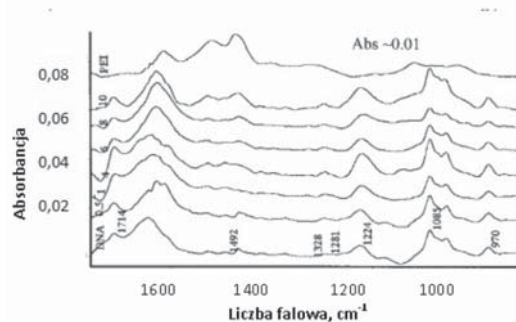
Metoda ta służy do badania termodynamicznych i kinetycznych interakcji między pDNA i związkami polimerowymi (kationowymi lipidami, polimerami) [7]. W technice tej obserwuje się ruchy znakowanych fluorescencyjnie cząstek. Czasowe fluktuacje intensywności sygnału fluorescencji i amplitudy tych fluktuacji poddane analizom matematycznym są źródłem informacji o współczynnikach dyfuzji oraz liczbie wolnych i związanych w kompleksach molekuł pDNA. Niniejsza technika pozwala także na określenie relatywnej ilości związku polimerowego w każdym kompleksie, jak również wielkości kompleksów [7].

### 3.6. SPEKTROSKOPIA FOURIEROWSKA W PODCZERWIENI (FTIR)

Metoda ta pozwala dokonać strukturalnej charakterystyki obu komponentów kompleksów (pDNA i związku polimerowego) oraz strukturalnej analizy ich interakcji [12,48,58]. Jest to technika pomiarowa, w której niemożliwa jest obserwacja widma bezpośrednio, ale otrzymuje się je dzięki przeprowadzeniu transformacji Fouriera sygnału mierzonego w funkcji czasu. W badaniu tym pozycje pików widma, odpowiadające typom drgań różnych grup molekularnych cząstek, w tym wibracjom zasad pDNA oraz grup fosforanowych, jak również drganiom grup węglanowych, metylenowych, amonowych i innych grup cząstek związku polimerowego, są mierzone jako funkcja stosunku molowego tego związku do pDNA [12,58]. Podczas miareczkowania jednego komponentu kompleksu drugim można zaobserwować przesunięcia pozycji tych pasm, które zachodzą w całym zakresie stosunków wagowych związku polimerowego do pDNA, odpowiadając różnym etapom formowania się kompleksów [12] (ryc. 5).

FTIR pozwala na zlokalizowanie miejsc wiązania się lipidu do pDNA oraz na obserwację wzajemnych oddziaływań hydrofilowych i hy-

drofobowych cząstek. Metoda dostarcza informacji na temat konformacji helisy pDNA. Zaobserwowano częściową zmianę konformacji z B-pDNA do C- lub A-pDNA w lipopleksach, podczas gdy pDNA skompleksowane z PEI pozostawało w swojej standardowej formie B [48,55].



**Ryc. 5.** Widmo absorpcji FTIR kompleksów PEI/DNA. Badano widma absorpcji FTIR kompleksów o różnych stosunkach ładunków (+/-) cząstek (od 0,5 do 10), a także widma absorpcji samych PEI i DNA (zaznaczono po lewej stronie wykresu). Pod wpływem dodawania nośnika widoczne są przesunięcia pozycji pasm absorpcyjnych, odpowiadające poszczególnym etapom tworzenia się kompleksów. Do tworzenia kompleksów wykorzystano typ rozgałęziony PEI, o masie 750 kDa oraz DNA o stężeniu 1 mg/ml [55].

**Fig. 5.** Fourier transform infrared absorbance spectrum of PEI/DNA complexes. FTIR absorbance spectra of complexes with different charge ratios (+/-) of particles (from 0,5 to 10) were investigated, as well as absorbance spectra of PEI and DNA alone (indicated on the left side of the diagram). The effect of adding the carrier to DNA is visible by shifts in the position of absorption bands, which correspond with particular stages of complex formation. For complex formation 750 kDa branched PEI and DNA at a concentration of 1 mg/ml were used.

### 3.7. TRANSFER ENERGII REZONANSU FLUORESCENCJI (FRET)

Zjawisko transferu rezonansu energii fluorescencji w odniesieniu do kompleksów pDNA ze związkiem polimerowym jest wykorzystywane do określenia odległości między pDNA i cząsteczkami jego nośnika w różnych miejscach w obrębie kompleksu [12,59]. Metoda pozwala na określenie stopnia kondensacji pDNA oraz stabilności powstałych kompleksów [60,61]. W badaniu wykorzystuje się właściwość niektórych fluoroforów, polegającą na tym, iż spektrum emisji donora pokrywa się ze spektrum absorpcji akceptora, wobec czego po wzbudzeniu donora obserwuje się bądź emisję akceptora, bądź wygaszenie donora. Pomiar efektywności tego zjawiska pozwala na ocenę odległości par barwników fluorescencyjnych

w kompleksach, a zatem odległości pDNA wyznakowanego donorem od związku polimerowego wyznakowanego akceptorem [59,62]. Wiethoff i wsp. [59] za pomocą FRET wykazali wpływ wielu czynników, takich jak stosunek ładunków kationowego lipidu do pDNA, kompozycji lipidu czy siły jonowej roztworu na cechy strukturalne lipopleksów. Znaleźiono korelację między wartościami najmniejszej odległości pDNA od lipidu a wielkością koloidalną cząstek [59]. Middaugh i Ramsey [12] proponują, aby za pomocą wartości pomiarów FRET uzależnionych od funkcji czasu badać kinetykę powstawania kompleksów, co dawałoby możliwość obserwacji zmian strukturalnych, zachodzących w kompleksach podczas ich formowania się.

#### 4. BADANIE STABILNOŚCI KOMPLEKSÓW pDNA: NOŚNIK

##### 4.1. TEST OCHRONY pDNA PRZED DNAzĄ

Metoda wykorzystywana jest do oceny zdolności związku polimerowego do ochrony pDNA przed czynnikami powodującymi jego degradację. Polega na ekspozycji kompleksów na działanie DNAzy I (DNAza trawi niezwiązane lub niechronione pDNA na fragmenty), a następnie oddzieleniu pDNA od nośnika i poddaniu detekcji za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym [29]. Możliwe jest także wykorzystanie fluorymetrii, za pomocą której bada się trawione kompleksy i oddzielone pDNA w obecności EtBr [25,39]. Zakłada się, iż zdolność kationowego nośnika do ochrony pDNA przed enzymami decyduje o skuteczności transfekcyjnej kompleksów pDNA : nośnik [29]. Warto jednak zwrócić uwagę, iż niewłaściwie przeprowadzone kompleksowanie pDNA ze związkiem kationowym może ograniczać wewnątrzkomórkowe uwalnianie (dysocjację) pDNA z kompleksów [39].

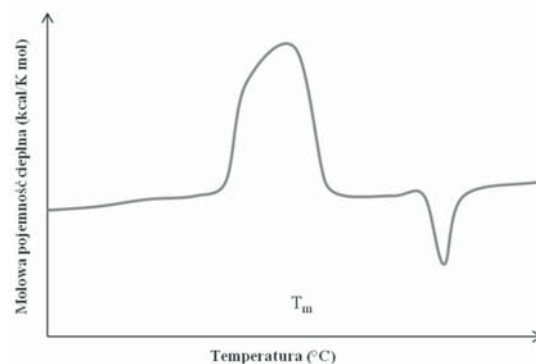
##### 4.2. IZOTERMICZNE MIARECZKOWANIE KALORYMETRYCZNE (ITR)

Jest to pośrednia metoda ilościowa służąca do badania trwałości termodynamicznej kompleksów w roztworach. W technice miareczkuje się jeden komponent kompleksu drugim i dokonuje pomiaru ilości ciepła wytwarzanego lub pochłanianego (zależnie od rodzaju oddziaływania) podczas procesu łączenia się komponentów. Z przeprowadzonych pomia-

rów próbuje się wyznaczyć wartości termodynamiczne, takie jak: stała równowagi, stechiometria w warunkach wysycenia kompleksu, zmiany entalpii oraz entropii reakcji przyłączenia pDNA do związku polimerowego. Niestety, wartości są trudne, czasem nawet niemożliwe do wyznaczenia, gdyż wzajemne oddziaływania części składowych kompleksów są złożone (np. kompleksy ulegają agregacji w warunkach wysycenia) [12,56,63]. Inną przeszkodą jest niemożność zastosowania ITR dla kompleksów, które zostały już wcześniej przygotowane [12].

##### 4.3. RÓŻNICOWA KALORYMETRIA SKANINGOWA (DSC)

Jest to metoda kalorymetryczna służąca do bezpośredniego pomiaru stabilności kompleksów. Polega na rejestrowaniu różnic strumienia ciepła dostarczanego do kompleksów i do substancji kontrolnej (buforu) w funkcji temperatury, gdy substancje te ogrzewane są zgodnie z ustalonym programem temperaturowym. Jeżeli nastąpi zmiana struktury badanej

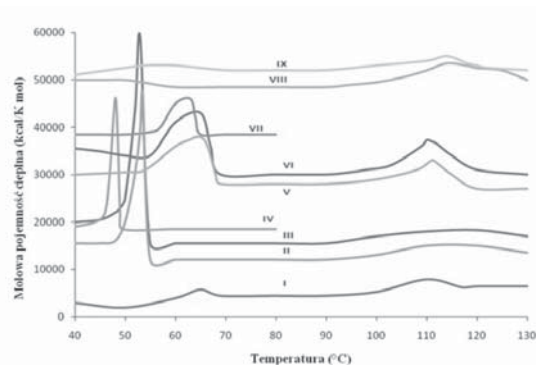


**Ryc. 6.** Stabilność kompleksów pDNA : nośnik badana za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej w funkcji temperatury. Widoczne piki (odchylenia od linii podstawowej) świadczą o przemianach strukturalnych, jakie zachodzą w badanej próbce. Pik egzotermiczny skierowany jest ku górze, natomiast endotermiczny ku dołowi. Pole powierzchni pod pikiem pozwala na wyznaczenie entalpii przemiany, a temperatura topnienia ( $T_m$ ) związana jest z termiczną stabilnością kompleksu ([72], zmienione).

**Fig. 6.** pDNA : carrier complexes stability investigated with use of differential scanning calorimetry in temperature function. Visible peaks (deviation from the base line) are evidence of structural changes, which occur in a tested sample. Exothermic peak is upward, whereas endothermic peak is downward. Area under the peak enables the determination of enthalpy conversion, whereas melting temperature ( $T_m$ ) is related to thermal stability of the complex ([72], changed).

substancji, energia wymagana do utrzymania tej samej temperatury w dwóch próbach może ulec przemianom na energię związaną ze zmianą strukturalną. Ilość ciepła dostarczana do prób jest rejestrowana jako efekt cieplny przebiegającego procesu (endotermiczne lub egzotermiczne odchylenie od linii podstawowej rejestrującej strumień ciepła uwidocznione w postaci piku). Metoda pozwala na dokonanie pomiaru temperatury topnienia ( $T_m$ ), związanej z termiczną stabilnością kompleksu oraz wyznaczenie entalpii przemiany, która jest równa powierzchni pod pikiem [12,64] (ryc. 6).

W lipidach mogą zachodzić przemiany fazy żelowej w fazę cieczy krystalicznej, polegające na tym, że w podwyższonej temperaturze uporządkowane alkilowe łańcuchy boczne lipidu przechodzą w stan bardziej płynny. Zmiany struktury dotyczą także pDNA, ulegającego termicznej denaturacji w temperaturze, która dla linearnych i otwartych kolistych form pDNA występujących w próbce jest niższa (60–70°C), a dla formy superhelikalnej plazmidu jest bardzo wysoka ( $T_m > 90^\circ\text{C}$ ) [56,65]. Na termogramach przemiany widoczne są w postaci ostrych pików (ryc. 7). Kompleksowanie lipidu z pDNA powoduje stabilizację przemiany z fazy żelowej do ciekłokrystalicznej o kilka stopni, zależnie od lipidu, tzn. pik obrazujący przemianę przesunięty jest do wyższych temperatur [12,65]. Przemiany faz lipidów występujących samodzielnie i w kompleksach we wzrastającej temperaturze mogą być obserwowane także za pomocą FTIR poprzez analizę drgań rozciągających grup metylenowych [12,65]. Termogramy DSC polimerów kationowych nie przedstawiają żadnych przemian termicznych. Obserwacji stabilności kompleksów w różnych temperaturach dokonuje się w kontekście stosunku ładunków (+/-) kompleksów [56]. Stabilność termiczna przemian związanych z topnieniem pDNA zależy od rodzaju użytego związku polimerowego. Kationowe lipidy oraz dendrymery stabilizują superhelikalne pDNA, kiedy występuje przewaga ładunku dodatniego w kompleksach [65]. W przypadku pDNA skompleksowanego np. z PEI przewaga ładunku dodatniego może destabilizować przemianę pDNA (rozgałęzione formy PEI 750 kDa i 25 kDa) lub ją stabilizować (rozgałęzioną formą PEI 2 kDa i liniową 25 kDa), zależnie od geometrii i masy molekularnej polimeru [55].



**Ryc. 7.** Termogramy DSC kompleksów pDNA : lipid kationowy oraz samych liposomów kationowych. (I) DNA; (II, III) kompleksy DDAB–DNA (bromek dimetylo-dioktadecylammonowy- DNA) o stosunkach ładunków (+/-) cząstek: 0.75:1(II) i 1.0:1 (III); (IV) same liposomy DDAB; (V, VI) kompleksy DSTAP–DNA (sól distearylo-olio-propylo-trimetyloamoni-DNA) o stosunku ładunków (+/-) cząstek: (V) 0.75:1 i (VI) 1.0:1; (VII) same liposomy DSTAP; (VIII, IX) kompleksy DOTAP–DNA (metylosiarczan dioleilooksy-propylo-trimetyloamoni-DNA) o stosunku ładunków (+/-) cząstek: (VIII) 0.75:1 i (IX) 1.0:1. Kompleksowanie lipidu z pDNA powoduje stabilizację przemiany lipidu z fazy żelowej do ciekłokrystalicznej o kilka stopni, co widoczne jest poprzez przesunięcie piku obrazującego przemianę do wyższych temperatur ([65], zmienił).

**Fig. 7.** DSC thermograms of pDNA : cationic lipid complexes and cationic liposomes alone. (I) DNA; (II, III) DDAB–DNA complexes (dimethyloctadecylammonium bromide-DNA) at charge ratios (+/-) of particles of: 0.75:1(II) and 1.0:1 (III); (IV) DDAB liposomes alone; (V, VI) DSTAP–DNA complexes (1,2-distearyltrimethyl ammoniumpropane chloride-DNA) at charge ratios (+/-) of particles of: (V) 0.75:1 i (VI) 1.0:1; (VII) DSTAP liposomes alone; (VIII, IX) DOTAP–DNA complexes (dioleoyltrimethyl ammoniumpropane chloride-DNA) at charge ratios (+/-) of particles of: (VIII) 0.75:1 i (IX) 1.0:1. Complexation of lipid with pDNA causes stabilization of lipid transition from gel phase to liquid-crystalline phase by a few degrees, which is visible by a shift in peak representing the transition to higher temperatures ([65], changed).

## 5. PODSUMOWANIE

Kompleksy pDNA : nośnik zaliczane są do wykorzystywanych przez terapię genową niewirusowych preparatów genowych. Preparaty te są coraz częściej poddawane badaniom klinicznym i wydają się bezpieczne dla pacjenta. Przeprowadzone dotychczas próby wskazują, iż środki pDNA : nośnik efektywnie wnikają do komórek, a wnoszone geny ulegają ekspresji prowadzącej do powstania terapeutycznych białek. Obserwuje się wzrost zainteresowania niewirusowymi preparatami genowymi. Obecność preparatów genowych w klinice wymaga prowadzenia intensywnych badań *in vitro*,

oceniających nie tylko ich aktywność biologiczną, ale również charakteryzujących ich właściwości fizykochemiczne. Klonowaniu wektorów towarzyszy nieodłącznie wymóg oceny jakości fizykochemicznej uzyskiwanych preparatów. Badanie właściwości fizykochemicznych może być pomocne w zrozumieniu złożonych mechanizmów, zachodzących podczas powstawania układu pDNA : nośnik. Uzyskiwana w toku pracochłonnych badań podstawowych

wiedza wykorzystywana jest do planowania preparatyki mającej na celu otrzymanie stabilnych, homogennych, aktywnych biologicznie, lepiej zdefiniowanych i bezpieczniejszych preparatów genowych. W laboratorium terapii genowej wykorzystywane są nie tylko metody inżynierii genetycznej. Niezwykle przydatne są również narzędzia oferowane przez inne dyscypliny nauki – metody klasycznej biochemii, techniki chemii fizycznej, chemii analitycznej.

Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego WND-OIG 01.03.01-14-036/09 Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

## 6. PIŚMIENNICTWO

- Ciani L., Ristori S., Salvati A., Calamai L., Martini G. DOTAP/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes for gene delivery: Zeta potential measurements and electron spin resonance spectra. *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1664: 70–79.
- Russ V., Elfberg H., Thoma C., Kloeckner J., Ogris M., Wagner E. Novel degradable oligoethylenimine acrylate ester-based pseudodendrimers for in vitro and in vivo gene transfer. *Gene Ther.* 2008; 15: 18–29.
- Anderson D.G., Akinc A., Hossain N., Langer R. Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly( $\beta$ -amino esters). *Mol. Ther.* 2005; 11: 426–434.
- Su J., Kim C.-J., Ciftci K. Characterization of poly(N-trimethylammonium) ethylmethacrylate-based gene delivery systems. *Gene Ther.* 2002; 9: 1031–1036.
- Hollon T. Researchers and regulators reflect on first gene therapy death. *Am. J. Ophthalmol.* 2000; 129: 701.
- Kohn D.B., Sadelain M., Glorioso J.C. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 477–488.
- Margineanu A., De Feyter S., Melnikov S i wsp. Complexation of Lipofectamine and cholesterol-modified pDNA sequences studied by Single-Molecule Fluorescence Techniques. *Biomacromolecules* 2007; 8: 3382–3392.
- Pack D.W., Putnam D., Langer R. Design of imidazole-containing endosomal biopolymers for gene delivery. *Biotechnol. Bioeng.* 2000; 67: 217–223.
- Ledley F.D. Nonviral gene-therapy – the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum. Gene Ther.* 1995; 6: 1129–1144.
- Luo D., Saltzman W.M. Synthetic pDNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.* 2000; 18: 33–37.
- Slita A.V., Kasyanenko N.A., Nazarova O.V. i wsp. pDNA-polycation complexes. Effect of polycation structure on physicochemical and biological properties. *J. Biotechnol.* 2007; 127: 679–693.
- Middaugh C.R., Ramsey J.D. Analysis of cationic-lipid-plasmid-pDNA complexes. *Anal. Chem.* 2007; 79: 7240–7248.
- Nguyen H.-K., Lemieux P., Vinogradov S.V. i wsp. Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Ther.* 2000; 7: 126–138.
- Rodríguez-Pulido A., Ortega F., Llorca O., Aicart E., Junquera E. A physicochemical characterization of the interaction between DC-Chol/DOPE cationic liposomes and pDNA. *J. Phys. Chem.* 2008; 112: 12555–12565.
- <http://www.promega.com/paguide/chap12.htm>
- Bednarek I., Cholewa K., Czajka-Uhryn M. Wprowadzenie informacji genetycznej do komórek, wektory molekularne, metody transferu. W: Bednarek I. red. Inżynieria genetyczna i terapia genowa. Wyd. Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, Katowice 2008: 29–49.
- Rolland A., Felgner P.L. Non-viral gene delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1998; 30: 1–3.
- <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>
- Ciani L., Ristori S., Bonechi C., Rossi C., Martini G. Effect of the preparation procedure on the structural properties of oligonucleotide/cationic liposome complexes (lipoplexes) studied by electron spin resonance and Zeta potential. *Biophys. Chem.* 2007; 131: 80–87.
- Eastman S.J., Siegel C., Tousignant J., Smith A.E., Cheng S.H., Scheule R.K. Biophysical characterization of cationic lipid : pDNA complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1997; 1325: 41–62.
- Tranchant I., Thompson B., Nicolazzi C., Mignet N., Scherman D. Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. *J. Gene Med.* 2004; 6: S24–S35.
- Aljaberi A., Spelios M., Kearns M., Selvi B., Savva M. Physicochemical properties affecting lipofection potency of a new series of 1,2-dialkylamidopropane-based cationic lipids. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2007; 57: 108–117.
- Ferrari M.E., Rusalov D., Enas J., Wheeler C.J. Trends in lipoplex physical properties dependent on cationic lipid structure, vehicle and complexation procedure do not correlate with biological activity. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 1539–1548.
- Barreau B., Chèvre R., Letrou-Bonneval E., Labas R., Lambert O., Pitard B. Physicochemical parameters of non-viral vectors that govern transfection efficiency. *Curr. Gene Ther.* 2008; 8: 313–323.
- Mortazavi S.M., Mohammadabadi M.R., Khosravi-Darani K., Mozafari M.R. Preparation of liposomal gene therapy vectors by a scalable method without using volatile solvents or detergents. *J. Biotechnology* 2007; 129: 604–613.
- Jeffs L.B., Palmer L.R., Ambegia E.G., Giesbrecht C., Ewanick S., MacLachlan I. A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid pDNA. *Pharm. Res.* 2005; 22: 362–372.
- Bhattacharya S., Mandal S. Interaction of surfactants with pDNA. Role of hydrophobicity and surface charge on interaction and pDNA melting. *Biochim. Biophys. Acta* 1997; 1323: 29–44.
- Lesage D., Cao A., Briane D. i wsp. Evaluation and optimization of pDNA delivery into gliosarcoma 9L cells by a cholesterol-based cationic liposome. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1564: 393–402.
- Kim S.T., Lee K.-M., Park H.-J. i wsp. Topical delivery of interleukin-13 antisense oligonucleotides with cationic elastic liposome for the treatment of atopic dermatitis. *J. Gene Med.* 2009; 11: 26–37.
- Kozubek A. Wstęp do technologii liposomowej. Wrocław 2004: 5–30. <http://www.ibmb.uni.wroc.pl/studia/liposomes.pdf>
- Mok K.W.C., Lam A.M.I., Cullis P.R. Stabilized plasmid-lipid particles: factors influencing plasmid entrapment and transfection properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1419: 137–150.
- Xu Y., Hui S.W., Frederik P., Szoka Jr F.C. Physicochemical characterization and

- purification of cationic lipoplexes. *Biophys. J.* 1999; 77: 341–353.
33. Zuhorn I.S., Visser W.H., Bakowsky U., Engberts J.B.F.N., Hoekstra D. Interference of serum with lipoplex-cell interaction: modulation of intracellular processing. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1560: 25–36.
  34. Dass C.R., Walker T.L., Kalle W.H.J., Burton M.A. A microsphere-lipoplex (microplex) vector for targeted gene therapy of cancer. I. Construction and *in vitro* evaluation. *Drug Delivery* 1999; 6: 259–269.
  35. Dass C.R., Walker T.L., Burton M.A. Liposomes containing cationic dimethyl dioctadecyl ammonium bromide: formulation, quality control, and lipofection efficiency. *Drug Delivery* 2002; 9: 11–18.
  36. Guy J., Drabek D., Antoniou M. Delivery of pDNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy. *Mol. Biotechnol.* 1995; 3: 237–248.
  37. [http://www.staff.amu.edu.pl/~pf2/docs/92\\_Rozpraszanie\\_swiatla.pdf](http://www.staff.amu.edu.pl/~pf2/docs/92_Rozpraszanie_swiatla.pdf)
  38. Tang M.X., Szoka F.C. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with pDNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.* 1997; 4: 823–832.
  39. Oliveira A.C., Ferraz M.P., Monteiro F.J., Simoes S. Cationic liposome-pDNA complexes as gene delivery vectors: development and behaviour towards bone-like cells. *Acta Biomaterialia* 2009; 5: 2142–2151.
  40. Mislick K.A., Baldeschwieler J.D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *P. N. A. S.* 1996; 93: 12349–12354.
  41. Wiethoff C.M., Smith J.G., Koe G.S., Middaugh C.R. The potential role of proteoglycans in cationic lipid-mediated gene delivery. Studies of the interaction of cationic lipid-pDNA complexes with model glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 32806–32813.
  42. Hirsch-Lerner D., Zhanga M., Elijahua H., Ferrari M.E., Wheeler C.J., Barenholz Y. Effect of “helper lipid” on lipoplex electrostatics. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1714: 71–84.
  43. Gustafsson J., Arvidson G., Karlsson G., Almgren M. Complexes between cationic liposomes and pDNA visualized by cryo-TEM. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; 1235: 305–312.
  44. Tam P., Monck M., Lee D. *i* wsp. Stabilized plasmid-lipid particles for systemic gene therapy. *Gene Ther.* 2000; 7: 1867–1874.
  45. Simberg D., Danino D., Talmon Y. *i* wsp. Phase behavior, pDNA ordering, and size instability of cationic lipoplexes. Relevance to optimal transfection activity. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 47453–47459.
  46. Chabaud P., Camplo M., Payet D. *i* wsp. Cationic nucleoside lipids for gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 2006; 17: 466–472.
  47. Vonarbourg A., Passirani C., Desigaux L. *i* wsp. The encapsulation of pDNA molecules within biomimetic lipid nanocapsules. *Biomaterials* 2009; 30: 3197–3204.
  48. Marty R., N’soukpoe-Kossi C.N., Charbonneau D., Weinert C.M., Kreplak L., Tajmir-Riahi H.-A. Structural analysis of pDNA complexation with cationic lipids. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: 849–857.
  49. Radler J.O., Koltover I., Salditt T. *i* wsp. Structure of pDNA-cationic liposome complexes: pDNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* 1997; 275: 810–814.
  50. Koltover I., Salditt T., Radler J.O., Safinya C.R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-pDNA complexes related to pDNA release and delivery. *Science* 1998; 281: 78–81.
  51. Congiu A., Pozzi D., Esposito C., Castellano C., Mossa G. Correlation between structure and transfection efficiency: a study of DC-Chol-DOPE/pDNA complexes. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2004; 36: 43–48.
  52. Sakuragi M., Kusuki S., Hamada E. *i* wsp. Supramolecular structures of benzyl amine derivative/pDNA complexes explored with Synchrotron Small Angle X-ray Scattering at SPring-8. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2009; 184: 012008.
  53. Zelphati O., Szoka F. Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm. Res.* 1996; 13: 1367–1372.
  54. Braun C.S., Jas G.S., Choosakoonkriang S., Koe G.S., Smith J.G., Middaugh C.R. The structure of pDNA within cationic/pDNA complexes. *Biophys. J.* 2003; 84: 1114–1123.
  55. Choosakoonkriang S., Lobo B.A., Koe G.S., Koe J.G., Middaugh C.R. Biophysical characterization of PEI/pDNA complexes. *J. Pharm. Sci.* 2003; 92: 1710–1722.
  56. Braun C.S., Jas G.S., Choosakoonkriang S., Koe G.S., Smith J.G., Middaugh C.R. Structure/function relationships of poly-amidoamine/pDNA dendrimers as gene delivery vehicles. *J. Pharm. Sci.* 2005; 94: 423–436.
  57. Lobo B.A., Vetro J.A., Suich D.M., Zuckermann R.N., Middaugh C.R. Structure/function analysis of peptoid/lipoid: pDNA complexes. *J. Pharm. Sci.* 2003; 92: 1905–1918.
  58. Morris V.B., Neethu S., Abraham T.E., Pillai C.K.S., Sharma Ch.P. Studies on the condensation of depolymerized chitosans with pDNA for preparing chitosan-pDNA nanoparticles for gene delivery applications. *J. Biomed. Mater. Res.* 2009; 89B: 282–292.
  59. Wiethoff Ch.M., Gill M.L., Koe G.S., Koe J.G., Middaugh C.R. The structural organization of cationic lipid-pDNA complexes. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 44980–44987.
  60. Chen H.H., Ho Y.-P., Jiang X., Mao H.-Q., Wang T.-H., Leong K.W. Simultaneous non-invasive analysis of pDNA condensation and stability by two-step QD-FRET. *Nano Today* 2009; 4: 125–134.
  61. Elijahua H., Josepha A., Schillemans J.P., Azzamb T., Dombb A.J., Barenholz Y. Characterization and *in vivo* performance of dextran-spermine polyplexes and DOT-AP/cholesterol lipoplexes administered locally and systemically. *Biomaterials* 2007; 28: 2339–2349.
  62. Madeira C., Loura L.M., Aires-Barros M.R., Fedorov A., Prieto M. Characterization of pDNA/lipid complexes by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Biophys. J.* 2003; 85: 3106–3119.
  63. Lobo B.A., Davis A., Koe G., Smith J.G., Middaugh C.R. Isothermal titration calorimetric analysis of the interaction between cationic lipids and plasmid pDNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 386: 95–105.
  64. [http://www.bip.minrol.gov.pl/FileRepozytory/FileRepozytoryShowImage.aspx?item\\_id=6650](http://www.bip.minrol.gov.pl/FileRepozytory/FileRepozytoryShowImage.aspx?item_id=6650)
  65. Lobo B.A., Rogers S.A., Choosakoonkriang S., Smith J.G., Koe G., Middaugh C.R. Differential scanning calorimetric studies of the thermal stability of plasmid pDNA complexed with cationic lipids and polymers. *J. Pharm. Sci.* 2002; 91: 454–466.
  66. Gleich L.L., Gluckman J.L., Armstrong S. *i* wsp. Alloantigen gene therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck: results of a phase-I trial. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1998; 124: 1097–1104.
  67. Veelken H., Mackensen A., Lahn M. *i* wsp. A phase-I clinical study of autologous tumor cells plus interleukin-2-gene-transfected allogeneic fibroblasts as a vaccine in patients with cancer. *Int. J. Cancer* 1997; 70: 269–277.
  68. Yoshida J., Mizuno M., Fuji M. *i* wsp. Human gene therapy for malignant gliomas (glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma) by *in vivo* transduction with human interferon beta gene using cationic liposomes. *Hum. Gene Ther.* 2004; 15: 77–86.
  69. Konstan M.W., Davis P.B., Wagener J.S. *i* wsp. Compacted pDNA nanoparticles administered to the nasal mucosa of cystic fibrosis subjects are safe and demonstrate partial to complete cystic fibrosis transmembrane regulator reconstitution. *Hum. Gene Ther.* 2004; 15: 1255–1269.
  70. Noone P.G., Hohneker K.W., Zhou Z. *i* wsp. Safety and biological efficacy of a lipid-CFTR complex for gene transfer in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis. *Mol. Ther.* 2000; 1: 105–114.
  71. Brigham K.L., Lane K.B., Meyrick B. *i* wsp. Transfection of nasal mucosa with a normal  $\alpha_1$ -antitrypsin gene in  $\alpha_1$ -antitrypsin-deficient subjects: Comparison with protein therapy. *Hum. Gene Ther.* 2000; 11: 1023–1032.
  72. <http://mslab.polymer.pusan.ac.kr/sub4/dsc08.gif>