

На правах рукописи



**Высочинская
Вера Валерьевна**

**КАТИОННЫЕ ЛИПОСОМЫ 2Х3-DOPE И ПРОНИКАЮЩИЙ В КЛЕТКУ ПЕПТИД
ЕВ1 ДЛЯ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ РНК**

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Научный руководитель:

Забродская Яна Александровна, кандидат физико-математических наук

Официальные оппоненты:

Карпенко Лариса Ивановна, доцент, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (г. Новосибирск);

Остроумова Ольга Сергеевна, доцент, доктор биологических наук, заведующий лабораторией моделирования мембран и ионных каналов Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук (г. Санкт-Петербург).

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург).

Защита состоится « **19** » **декабря 2024 г.** в 11:00 на заседании диссертационного совета **У.1.5.3.23** федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО СПбПУ) (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29) по адресу: г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп. 1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <https://www.spbstu.ru/science/the-department-of-doctoral-studies/independent-award-academic-degrees/defences-calendar/> ФГАОУ ВО СПбПУ.

Автореферат разослан: « ____ » _____ 2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

Забродская Яна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

РНК-терапия представляет собой новое направление в лечении и профилактике заболеваний с использованием молекул на основе РНК. Наибольших успехов достигла РНК-терапия на основе матричной РНК (мРНК) для создания вакцин и терапевтических препаратов и малых интерферирующих РНК (миРНК), подавляющих экспрессию патологического гена.

Препараты на основе РНК можно разделить на два основных класса: макромолекулярные РНК-препараты, синтезированные с помощью метода *in vitro* транскрипции (мРНК-препараты) и олигонуклеотидные препараты, синтезированные химическими методами (антисмысловые олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК (миРНК) и РНК-аптамеры) [Zhang et al., 2023]. За последнее десятилетие конструкции на основе мРНК стали новым и очень привлекательным классом биологических препаратов, которые можно использовать для кодирования любого белка, представляющего интерес, непосредственно *in vivo*. Терапевтическое использование мРНК является одним из наиболее перспективных подходов к борьбе с широким спектром заболеваний. Успехи в разработке мРНК вакцин против COVID-19 продемонстрировали огромный потенциал новой технологии. В дополнение к профилактическим мРНК-вакцинам от инфекционных заболеваний и терапевтическим мРНК-вакцинам, применяемым в онкологии, наблюдается возрастающий интерес к мРНК-терапии более широкого спектра заболеваний, в том числе метаболических, генетических, сердечно-сосудистых, воспалительных и других [Kim et al., 2022]. С момента открытия механизма РНК-интерференции миРНК используются как специфичный и эффективный способ подавления экспрессии различных генов, в том числе и с терапевтической целью. Несколько препаратов на основе миРНК недавно было одобрено для клинического применения у пациентов с редкими наследственными заболеваниями [Singh et al., 2018]. Терапевтические миРНК представляют собой уникальный и многообещающий класс препаратов, предоставляющий возможность терапии широкого спектра заболеваний с установленными генетическими мишенями, включая инфекционные, онкологические и моногенные заболевания [Hu et al., 2020].

Независимо от терапевтического механизма и метода получения РНК большой размер, отрицательный заряд и чувствительность к деградации РНКазы в биологических жидкостях приводят к невозможности пассивного проникновения этих молекул в клетки-мишени для реализации биологического эффекта. Для преодоления клеточных и физиологических барьеров с целью эффективной доставки молекул РНК были разработаны как вирусные, так и невирусные системы доставки, защищающие РНК от деградации и обеспечивающие интернализацию и высвобождение в целевые клетки. Применение вирусных векторов для генотерапии продемонстрировало успешные клинические результаты, но эффективность такого подхода может быть ограничена существующим иммунитетом, вирусной иммуногенностью, нежелательной геномной интеграцией, сложностями, связанными с масштабированием, и дорогостоящим производством. Данные ограничения стимулировали поиск альтернативных невирусных средств

доставки нуклеиновых кислот (НК), что привело к достижениям в разработке таких синтетических материалов для внутриклеточной доставки РНК, как полимерные наночастицы, проникающие в клетки пептиды (cell penetrating peptides, CPP) и липосомальные наночастицы (ЛНЧ) [Paunovska et al., 2022].

Несмотря на стремительное внедрение в клиническую практику ЛНЧ для доставки терапевтических РНК проблема разработки новых эффективных носителей для реализации РНК-терапии в клинической практике остается актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день ЛНЧ считаются наиболее перспективными средствами доставки терапевтических нуклеиновых кислот [Paunovska et al., 2022]. ЛНЧ вошли в состав первого одобренного для клинического применения препарата для генотерапии на основе мРНК – Патисирана (Patisiran, Onpattro), разработанного компанией Alnylam для лечения пациентов с редким наследственным заболеванием – транстиретин-опосредованным амилоидозом [Solomon et al., 2019]. ЛНЧ также одобрены к клиническому использованию Американским Управлением по контролю качества продуктов и лекарственных средств (Food and drug administration, FDA) в составе мРНК-вакцин против SARS-CoV-2, разработанных компаниями Pfizer/BioNTech/Acuitas и Moderna [Schoenmaker et al., 2021].

ЛНЧ, одобренные для клинического применения, состоят из четырех компонентов: катионного или ионизируемого липида, липида-хелпер, холестерина и липида, модифицированного полиэтиленгликолем (ПЭГ). Катионные и ионизируемые липиды считаются основными структурными компонентами в составе ЛНЧ, обеспечивающими компактизацию НК. Несмотря на стремительное внедрение в практику нескольких РНК-вакцин против SARS-CoV-2, задача разработки новых средств доставки терапевтических НК остается актуальной. На сегодняшний день не достигнуто консенсуса относительно связи между широким разнообразием структурных компонентов липосом для доставки НК и их эффективностью как *in vitro*, так и *in vivo*. Активно изучается структура липосомальных систем доставки, и продемонстрированы некоторые аспекты влияния каждого из компонентов ЛНЧ и их физико-химических параметров на механизм и эффективность внутриклеточного проникновения комплексов носителей с НК в клетку с целью оптимизации их биологической активности [Gaspar et al., 2020].

В качестве перспективных основных структурных компонентов липосомальных средств доставки НК рассматриваются поликатионные амфифилы на основе холестерина и природных полиаминов, в частности – 1,26-бис(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозана тетрагидрохлорид (2X3) [Petukhov et al., 2010; Markov et al., 2012; Kabilova et al., 2018; Mikheev et al., 2020; Puchkov and Maslov, 2021]. 2X3 представляет собой комбинацию двух структурных доменов – гидрофобного и гидрофильного поликатионного, которые соединяются спейсерными группами с помощью линкера карбаматного типа. За счет своего положительного заряда молекулы 2X3 способны образовывать комплексы с отрицательно заряженными НК. Данные

средства доставки НК показали свою эффективность как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [Maslov et al., 2012; Kabilova et al., 2018; Mikheev et al., 2020; Shmendel et al., 2020].

В состав катионных липосом часто добавляют липиды-хелперы, которые способствуют увеличению эффективности трансфекции и облегчают высвобождение НК в клетке. В частности, 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE), цвиттерионный хелперный липид, способен формировать инвертированную гексагональную фазу при закислении эндосом, что увеличивает эффективность высвобождения в цитоплазму доставляемых молекул НК [Mochizuki et al., 2013; Du et al., 2014]. Показано, что эффективность трансфекции НК зависит от молярного соотношения различных катионных липидов с хелперным липидом DOPE в структуре разрабатываемых катионных липосом, при этом для разных типов НК (плазмидная ДНК (пДНК), мРНК, миРНК) такие соотношения оказываются различны [Farhood, Serbina and Huang, 1995; Zhang et al., 2010; Mikheev et al., 2020; Akhter et al., 2022]. В частности, было показано, что КЛ на основе 2X3 и DOPE демонстрируют максимальную эффективность трансфекции пДНК при молярном соотношении 2X3 и DOPE равном 2:1 и 2.5:1 (то есть количество 2X3 в структуре катионных липосом было в два раза и выше, чем липида-хелпера DOPE) [Mikheev et al., 2021]. При этом оптимальное молярное соотношение в структуре катионных липосом на основе 2X3 и DOPE для доставки мРНК и миРНК не исследовано. В нашей работе с целью создания эффективной липосомальной системы доставки терапевтических РНК мы впервые исследовали влияние композиции катионных липосом на основе катионного амфифила 2X3 и цвиттерионного липида DOPE и количественного соотношения положительно заряженных атомов азота катионных липосом и отрицательно заряженных фосфатных групп НК (N/P соотношения) на физико-химические характеристики липоплексов, их морфологию и эффективность доставки мРНК и миРНК в эукариотические клетки.

На сегодняшний день липосомальные носители активно исследуются для доставки всех типов НК, в то время как для доставки коротких НК (например, миРНК) еще одним перспективным направлением является применение CPP [Guidotti et al., 2017], представляющих собой особый класс коротких пептидов, обладающих уникальным свойством – способностью к интернализации в эукариотические клетки. Несмотря на обширные исследования CPP качестве средств доставки НК, ни один препарат, содержащий CPP, не одобрен FDA [Khairkhah et al., 2023] из-за отсутствия достаточных исследований и понимания механизмов интернализации комплексов CPP/НК и эффективности эндосомального высвобождения CPP на конкретной клеточной модели. В нашей работе мы исследовали CPP – EB1, представляющий собой аналог пенетратина [Lundberg et al., 2007], качестве средства доставки миРНК и провели сравнительное исследования эффективности внутриклеточной доставки миРНК с катионными липосомами на основе 2X3 и DOPE.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлась оценка возможности использования катионных липосом на основе катионного амфифила 2X3 и хелперного липида DOPE, а также проникающего в клетку

пептида EB1 в качестве средств доставки терапевтических РНК.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить и охарактеризовать комплексы катионных липосом на основе катионного амфифила 2X3 и хелперного липида DOPE (2X3-DOPE) в молярных соотношениях 1:1, 1:2 и 1:3 с модельными мРНК, кодирующими зеленый флуоресцентный белок (мРНК-eGFP) и люциферазу светлячка (мРНК-FLuc).
2. Исследовать влияние композиции катионных липосом 2X3-DOPE на эффективность внутриклеточной доставки модельных мРНК в клетки эукариот и *in vivo*.
3. Получить и охарактеризовать комплексы катионных липосом 2X3-DOPE или эндосомолитического проникающего в клетку пептида EB1 с модельной миРНК. Оценить эффективность доставки модельных миРНК, меченных флуоресцентной меткой, исследуемыми комплексами в клетки эукариот.
4. Установить механизм внутриклеточной доставки флуоресцентно меченой модельной миРНК в составе комплексов с катионными липосомами 2X3-DOPE и пептидом EB1.
5. Сравнить эффективность катионных липосом 2X3-DOPE и пептида EB1 в качестве средств доставки противоопухолевой bcr-abl миРНК, направленной на химерный онкоген *BCR-ABL* на *in vitro* модели хронического миелолейкоза (клеточной линии K-562).

Научная новизна

В рамках данной работы впервые показано влияние молярного соотношения 2X3 и DOPE в структуре катионных липосом на эффективность доставки молекул мРНК. Показано, что увеличение молярного соотношения хелперного липида DOPE по отношению к катионному липиду 2X3 в структуре катионных липосом 2X3-DOPE приводит к увлечению эффективности трансфекции мРНК. Катионные липосомы 2X3-DOPE с молярным соотношением 1:3 (2X3-DOPE 1:3), впервые полученные и исследованные для доставки НК, продемонстрировали максимальную эффективность трансфекции модельных мРНК в клетки эукариот, которая не уступала и даже превосходила эффективность коммерческого трансфекционного реагента.

Впервые было показано, что катионные липосомы 2X3-DOPE 1:3, модифицированные PEG₂₀₀₀, эффективно доставляют мРНК-FLuc *in vivo*.

В процессе выполнения исследования впервые продемонстрировано эффективное применение комплексов на основе оригинальных катионных липосом 2X3-DOPE-PEG и нековалентного наноконплекса на основе проникающего в клетку пептида EB1 и bcr-abl миРНК для подавления экспрессии химерного онкогена *BCR-ABL* на *in vitro* модели хронического миелолейкоза (ХМЛ). Оба подхода обеспечивают эффективную внутриклеточную доставку миРНК. Было показано, что ПЭГ-модификация липосом 2X3-DOPE обеспечивает высокую эффективность трансфекции, выход миРНК из эндосом, сайленсинг таргетного гена *BCR-ABL* и противоопухолевый эффект.

Кроме того, было впервые обнаружено, что пегилирование липосом 2X3-DOPE, обычно

используемое для повышения эффективности доставки НК липосомами *in vivo*, не только не снижает эффективность доставки *in vitro*, но и приводит к увеличению эффективности доставки противоопухолевых миРНК по сравнению с непегилированными липосомами в клетках К-562.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследованная в данной работе композиция катионного амфифила 2X3 и хелперного липида DOPE в молярном соотношении 1:3 показала свою эффективность для доставки модельных мРНК в клетки эукариот и *in vivo*, и может быть использована для разработки мРНК-вакцин против широкого спектра соматических и инфекционных заболеваний.

Продemonстрирована возможность успешного применения пегилированных катионных липосом 2X3-DOPE и пептида EB1 для доставки терапевтических миРНК, направленных на подавление экспрессии химерного онкогена *BCR-ABL* в опытах *in vitro*. Полученные результаты исследования противоопухолевого потенциала исследуемых комплексов могут быть в дальнейшем использованы для разработки фармакологической формы препарата на основе миРНК, предназначенного для лечения ХМЛ.

Показано, что в механизм интернализации комплексов EB1/миРНК в клетки К-562 вовлечены различные пути эндоцитоза, при этом пептид обладает клеточной специфичностью и концепция универсальности применения CPP для доставки терапевтических миРНК на любых моделях может быть не верна, что в свою очередь требует детального изучения механизмов на выбранной модели. Комплексы пегилированных катионных липосом 2X3-DOPE/миРНК проникают в клетки К-562 путем динамин-зависимого эндоцитоза, они эффективно доставляли миРНК во все исследованные клеточные линии и являются более универсальными системами доставки.

Пегилирование катионных липосом 2X3-DOPE в молярном соотношении 1:3 приводит к увеличению эффективности доставки миРНК и снижению эффективности доставки мРНК *in vitro*. Полученные данные, свидетельствуют о различии в механизмах комплексообразования между липосомами одинаковой структуры и разными типами молекул РНК.

Методология и методы исследования

В работе применялись стандартные культуральные, биохимические, биофизические и молекулярно-биологические методы. Для получения модельных мРНК использовали метод *in vitro* транскрипции (IVT). РНК олигонуклеотиды и проникающий в клетки пептид EB1 были химически синтезированы. Катионные липосомы на основе катионного амфифила 2X3 и хелперного липида DOPE получали методом гидратации тонкой пленки. Полученные средства доставки и их комплексы с молекулами РНК были охарактеризованы с использованием методов динамического светорассеяния (ДСР), электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии. Эффективность доставки мРНК *in vitro* контролировали методами флуоресцентной микроскопии, проточной цитофлуориметрии и анализа биолуминисценции. Эффективность доставки модельной мРНК-Fluc *in vivo* оценивали с помощью системы визуализации биолуминисценции *in vivo*. Механизм доставки флуоресцентно-меченных миРНК при помощи липосом и пептида EB1 оценивали после

трансфекции клеток К-562 в присутствии ингибиторов эндоцитоза методом проточной цитофлуориметрии. Эффективность эндосомального высвобождения мРНК после трансфекции клеток исследуемыми носителями оценивали методом иммунофлуоресценции с использованием белковых маркеров ранних эндосом (EEA1), поздних эндосом (RAB7) и лизосом (LAMP1) и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Специфический эффект мРНК оценивали по подавлению экспрессии онкогена *BCR-ABL* методом ПЦР-РВ и по метаболической активности клеток К-562.

Положения, выносимые на защиту

1. Катионные липосомы на основе 2X3-DOPE в молярных соотношениях 1:1, 1:2 и 1:3 эффективно доставляют модельные мРНК в клетки эукариот, при этом катионные липосомы 2X3-DOPE 1:3 продемонстрировали максимальную эффективность трансфекции в N/P соотношении с мРНК 10/1. Катионные липосомы 2X3-DOPE 1:3, модифицированные DSPE-PEG₂₀₀₀ (2% мол.), могут быть использованы для доставки мРНК при подкожном введении *in vivo*.
2. Катионные липосомы 2X3-DOPE 1:3 эффективно доставляют миРНК, меченную флуоресцентной меткой, в клетки К-562. Пегилирование липосом 2X3-DOPE 1:3 (2X3-DOPE-PEG) приводит к повышению эффективности доставки миРНК.
3. Комплексы катионных липосом 2X3-DOPE-PEG с миРНК проникают в клетки эукариот в основном путем динамин-зависимого эндоцитоза и эффективны для трансфекции всех исследованных клеточных линий. Механизм интернализации комплексов EB1/миРНК представляет собой комбинацию различных путей эндоцитоза, при этом комплексы обладают клеточной специфичностью.
4. Комплексы катионных липосом 2X3-DOPE-PEG и пептид EB1 обеспечивают эффективную доставку миРНК, однако катионные липосомы приводят к более эффективной интернализации *bcr-abl* миРНК и её высвобождению из состава эндосом, а также сайленсингу гена *BCR-ABL* на *in vitro* модели хронического миелолейкоза (клеточной линии К-562).

Личный вклад автора состоит в самостоятельном планировании и выполнении всех основных экспериментов, анализе и статистической обработке полученных результатов. Автором проведен подбор параметров и характеристика комплексов мРНК и миРНК с исследуемыми носителями, сравнительное исследование эффективности доставки полученных комплексов *in vitro*, исследование механизма внутриклеточного проникновения комплексов РНК с носителями, определение активности комплексов миРНК с носителями. Совместно с сотрудниками отдела молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России и центра доклинических и трансляционных исследований ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России проведены эксперименты по оценке эффективности доставки модельной мРНК *in vivo*. Обсуждение результатов работы и написание статей проводилось совместно с научным

руководителем, консультантом и соавторами.

Степень достоверности и апробация результатов

Статистическая значимость результатов исследований, проведенных автором, подтверждена статистическим анализом данных, полученных в ходе независимых экспериментов. Результаты всех экспериментов получены с использованием сертифицированного оборудования и современных молекулярно-биологических методов. Материалы диссертационной работы доложены на следующих научных конференциях: конгресс Европейского общества медицинской онкологии (European Society of Medical Oncology, ESMO, Париж, Франция, 2021 г.), IV Всероссийская конференция молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике» (Санкт-Петербург, 2023 г.); 26-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2023 г.); саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех» (федеральная территория Сириус, 2023 г.); X международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов OPENBIO, (Новосибирск, 2023 г.), VII Петербургский медицинский инновационный форум (Санкт-Петербург, 2024 г.); XXIII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2024 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 4 научных статьи, индексируемые в международных базах данных, и 5 тезисов доклада на конференциях международного и всероссийского уровня.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 129 страницах, включая 8 таблиц и 34 рисунка. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 234 источника на русском и английском языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Получение и характеристика комплексов катионных липосом на основе катионного амфифила 2X3 и хелперного липида DOPE (2X3-DOPE) в молярных соотношениях 1:1, 1:2 и 1:3 с модельными мРНК, кодирующими зеленый флуоресцентный белок (мРНК-eGFP) и люциферазу светлячка (мРНК-FLuc)

В нашей работе в качестве кандидатных средств доставки для молекул мРНК были получены следующие композиции катионных липосом (КЛ) на основе катионного амфифила 2X3 и хелперного липида DOPE с увеличением молярного соотношения в сторону хелперного липида: 2X3-DOPE 1:1, 2X3-DOPE 1:2 и 2X3-DOPE 1:3. Физико-химические характеристики, в частности размер частиц и ζ -потенциал рассматриваются как важные параметры при оценке эффективности КЛ в качестве средств доставки НК [Ramezani et al., 2009]. Приготовленные КЛ были исследованы

методом динамического светорассеяния (ДСР) (Таблица 1). Все липосомы имели гидродинамический диаметр (ГД) <100 нм, индекс полидисперсности (PDI) ниже 0.3 и ζ -потенциал выше +40 мВ. При этом следует отметить, что при увеличении содержания DOPE наблюдалось увеличение ζ -потенциала липосом. Морфологию липосом анализировали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (Рисунок 1).

Таблица 1 – Определение гидродинамического размера, индекса полидисперсности (PDI) и ζ -потенциала катионных липосом.

Катионные липосомы	ГД (нм)	PDI	ζ -потенциал (мВ)
2X3-DOPE 1:1	62.7 ± 0.1	0.23 ± 0.01	40.4 ± 1.2
2X3-DOPE 1:2	95.6 ± 0.7	0.23 ± 0.01	51.7 ± 8.0
2X3-DOPE 1:3	70.5 ± 0.4	0.26 ± 0.00	58.1 ± 2.0

По результатам характеристики исследуемых липосом ГД не коррелировал с изменением молярных соотношений 2X3 и DOPE и составил <100 нм. Увеличение количества DOPE по отношению к 2X3 в составе липосом приводило к увеличению значения ζ -потенциала, при этом ζ -потенциал был выше +40 мВ для всех исследуемых КЛ. Данные электронной микроскопии согласуются с результатами ДСР, и указывают на преобладание в образцах липосом с диаметром около 100 нм.

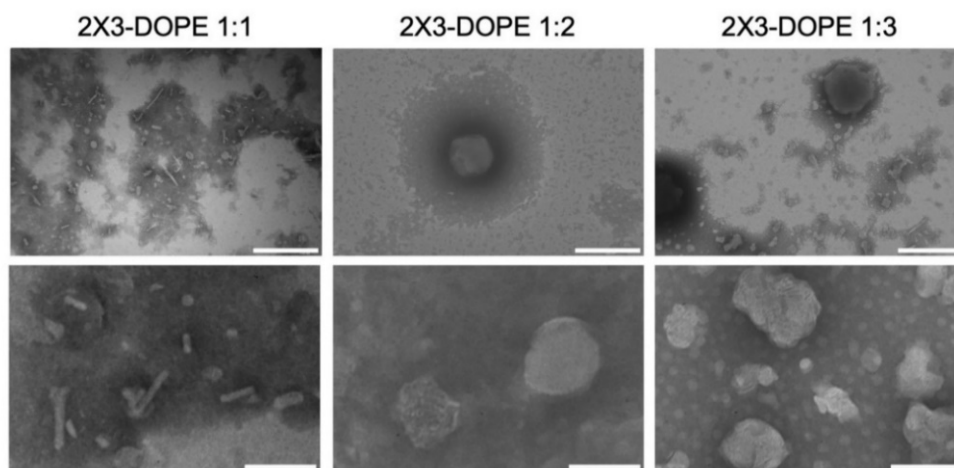


Рисунок 1 – Электронные микрофотографии липосом 2X3-DOPE 1:1, 2X3-DOPE 1:2 и 2X3-DOPE 1:3 в воде. Длина масштабного отрезка составляет 500 нм (верхняя панель) и 100 нм (нижняя панель)

Помимо состава катионных липосом важным параметром, влияющим на эффективность доставки НК, является подбор оптимального количественного соотношения положительно заряженных атомов азота катионных липосом и отрицательно заряженных фосфатных групп НК (N/P соотношение) [Gaspar et al., 2020]. Оптимальное N/P соотношение должно приводить к полной нейтрализации отрицательного заряда НК и, в результате, к полному связыванию РНК в липоплексе и её защите от деградации нуклеазами. При этом размер получаемых липоплексов должен быть

оптимальным для эффективной внутриклеточной доставки. Нами были получены и исследованы физико-химические характеристики комплексов липосом с модельными мРНК, кодирующими зеленый флуоресцентный белок (мРНК- eGFP) или люциферазу светлячка (мРНК-FLuc), при различных соотношениях N/P (Рисунок 2). Показано, что все липоплексы начиная с N/P соотношения равного 4/1 приобретали положительный ζ -потенциал и обладали размером до 250 нм.

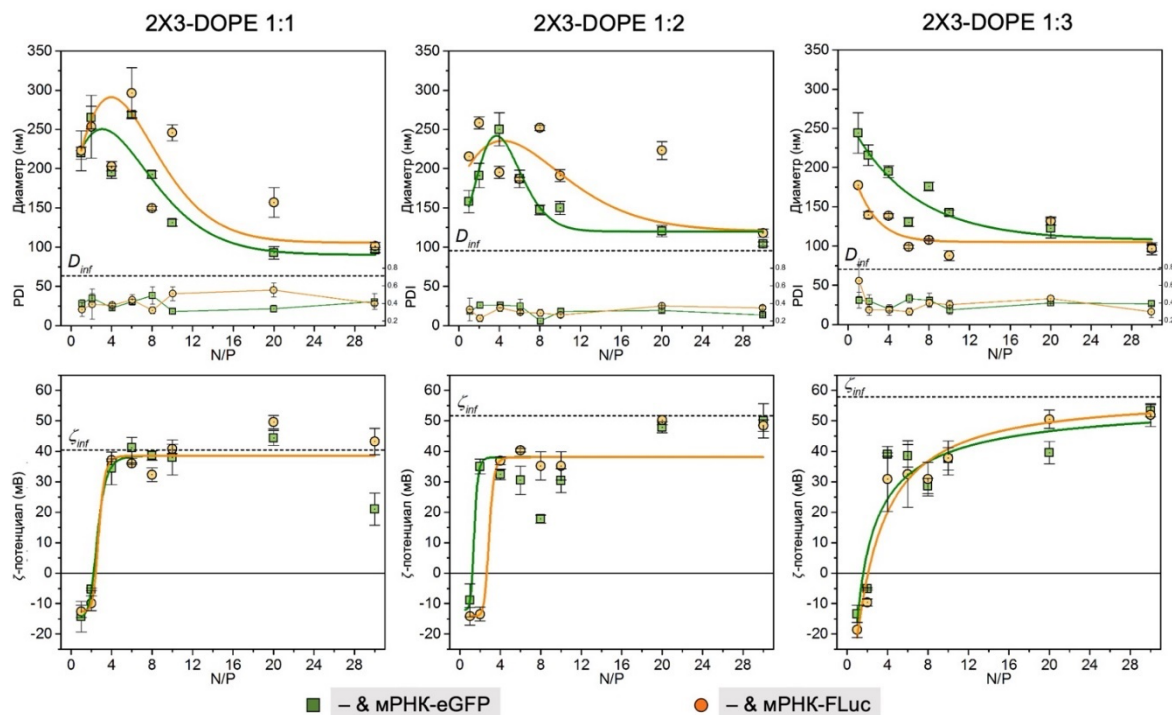


Рисунок 2 – Физико-химическая характеристика липоплексов с мРНК-eGFP и мРНК-FLuc в разных N/P соотношениях методом ДСР. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение по трем измерениям

Для определения N/P соотношения, при котором КЛ полностью связывают молекулы мРНК, был также проведен анализ липоплексов методом капиллярного электрофореза. По результатам данного исследования было показано, что начиная с соотношения N/P равного 4/1 все КЛ полностью связывают мРНК (Рисунок 3а). Эффективность загрузки мРНК в липоплексы дополнительно была измерена с использованием непрямого метода измерения концентрации свободной РНК, оставшейся в растворе после приготовления липоплексов с использованием флуоресцентного красителя для количественного определения РНК в растворе Ribogreen (Рисунок 3б). Полученные данные соотносятся с результатами, полученными при помощи капиллярного электрофореза: начиная с соотношения N/P равного 4/1 происходит полная инкапсуляция РНК катионными липосомами.

Мы показали, что начиная с N/P соотношения 4/1 все липоплексы имели размер до 250 нм, положительный ζ -потенциал (Рисунок 2) и полностью инкапсулировали мРНК (Рисунок 3). На основании полученных данных нами были выбраны N/P соотношения: 4/1, 6/1, 8/1, 10/1, 20/1 для дальнейшего исследования эффективности доставки мРНК *in vitro*.

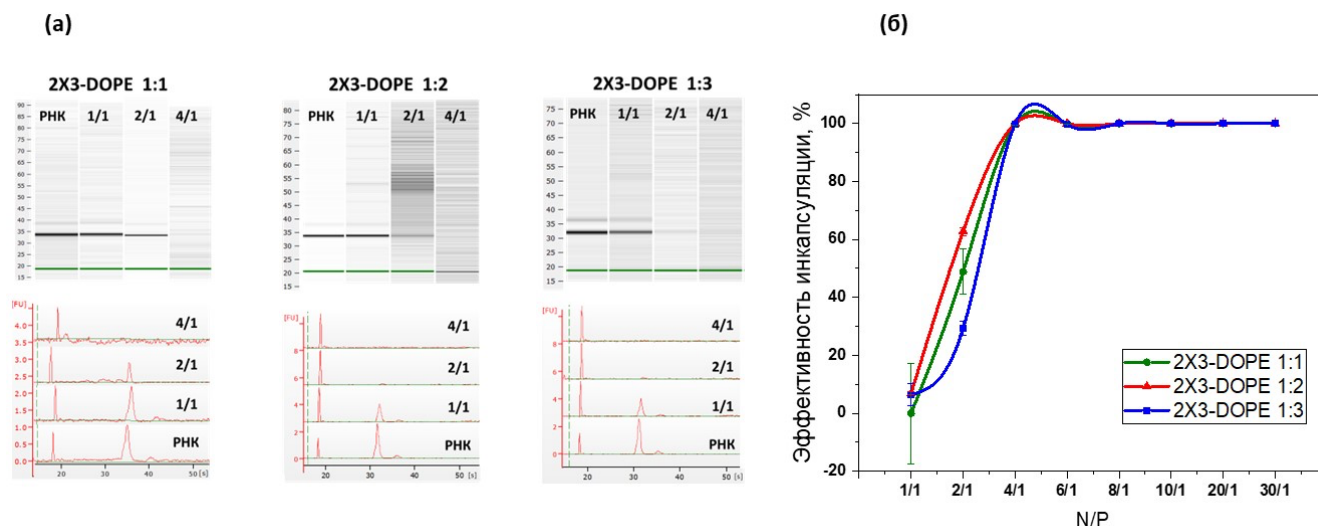


Рисунок 3 – Эффективность связывания мРНК-eGFP катионными липосомами. **(а)** Метод капиллярного электрофореза. Электрофореграммы «свободной» мРНК (РНК) и липоплексов в N/P соотношениях 1/1, 2/1, 4/1. **(б)** Эффективность инкапсуляции мРНК с использованием флуоресцентного красителя для количественного определения РНК в растворе Ribogreen методом флуориметрии

2. Исследование влияния композиции катионных липосом 2X3-DOPE на эффективность внутриклеточной доставки модельных мРНК в клетки эукариот и *in vivo*

Полученные и охарактеризованные липосомальные композиции были исследованы на эффективность доставки модельной мРНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок eGFP, в клетки ВНК-21 с использованием метода проточной цитофлуориметрии (Рисунок 4). мРНК-eGFP была выбрана в качестве модельной для оценки одновременно как эффективности внутриклеточной доставки (доля клеток (в %), в которых зарегистрирован сигнал GFP), так и эффективности высвобождения в цитоплазму для реализации биологического эффекта – трансляции зеленого флуоресцентного белка (средняя интенсивность флуоресценции, СИФ).

На основании полученных ранее данных для экспериментов по оценке эффективности трансфекции мРНК-eGFP *in vitro* были выбраны N/P соотношения: 4/1, 6/1, 8/1, 10/1, 20/1. Липидные композиции 2X3-DOPE 1:1 и 2X3-DOPE 1:2 продемонстрировали наибольшую эффективность доставки мРНК-eGFP в N/P соотношении 10/1, как в отношении доли трансфицированных клеток (в %), так и по СИФ (Рисунок 4а). При этом трансфекция с использованием 2X3-DOPE 1:3 при увеличении N/P соотношения от 4/1 до 10/1 не продемонстрировала существенной разницы в эффективности доставки мРНК (доля трансфицированных клеток, %), а при соотношении 20/1 показатель СИФ ($6.7 \pm 0.8 \times 10^5$ усл. ед.) оказался больше, чем при использовании коммерческого трансфекционного реагента ($4.7 \pm 0.3 \times 10^5$ усл. ед.). Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение в составе катионных липосом хелперного липида DOPE по отношению к катионному липиду 2X3 способствует увеличению эффективности доставки мРНК. Наибольшую эффективность трансфекции по СИФ продемонстрировали катионные липосомы 2X3-DOPE 1:3 (Рисунок 4а и 4б).

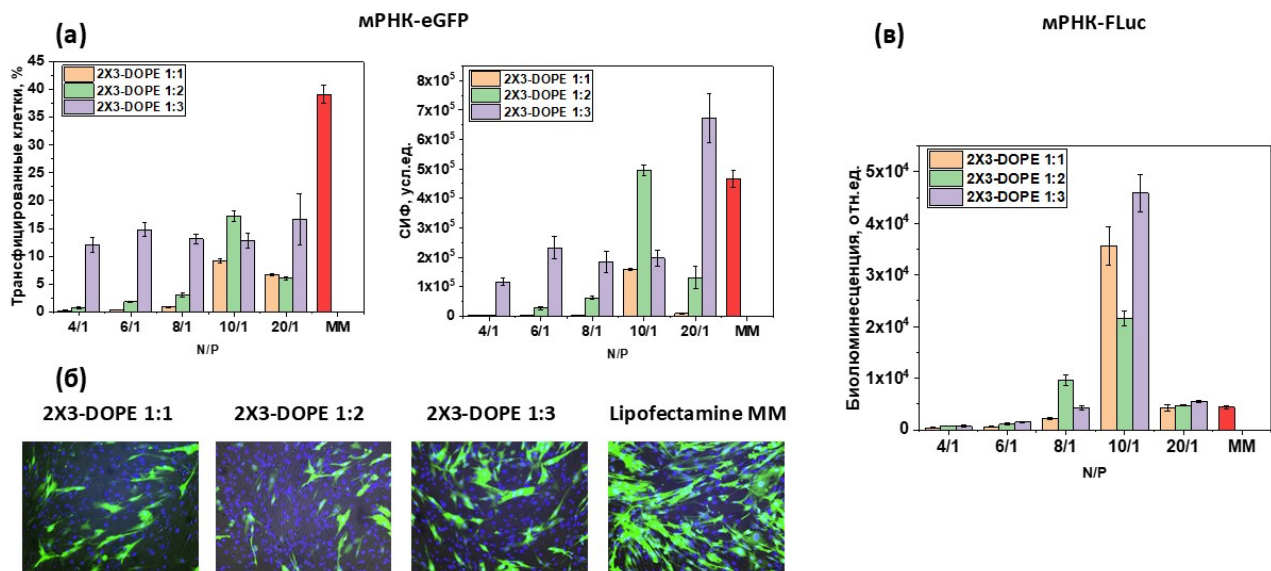


Рисунок 4 – Эффективность доставки модельных мРНК(мРНК-eGFP и мРНК-FLuc) в клетки ВНК-21 с использованием катионных липосом 2X3-DOPE 1:1, 2X3-DOPE 1:2, 2X3-DOPE 1:3 через 24 ч от момента трансфекции. **(а)** Эффективность трансфекции мРНК-eGFP методом проточной цитофлуориметрии после трансфекции липоплексами в разных N/P соотношениях. Положительный контроль трансфекции Lipofectamine MessengerMAX (MM) **(б)** Флуоресцентная микроскопия клеток ВНК-21 после трансфекции мРНК-eGFP катионными липосомами при N/P соотношении равно 10/1. Ядра клеток – синий, eGFP – зеленый **(в)** Эффективность трансфекции мРНК-FLuc методом количественного люминесцентного анализа после трансфекции липоплексами в разных N/P соотношениях.

Нами также была исследована эффективность доставки данными КЛ мРНК, кодирующей люциферазу светлячка, мРНК-FLuc (Рисунок 4в). Также, как и с мРНК-eGFP, максимальную эффективность трансфекции продемонстрировали КЛ 2X3-DOPE 1:3. При этом все липидные композиции продемонстрировали наибольшую эффективность при N/P соотношении 10/1 и оказались значительно эффективнее коммерческого трансфекционного реагента (MM). При этом, при доставке мРНК-FLuc максимальную эффективность трансфекции продемонстрировали все КЛ в N/P соотношении 10/1, а остальные соотношения оказались малоэффективны.

В результате данного этапа работы было продемонстрировано влияние ряда факторов на эффективность доставки мРНК КЛ на основе 2X3 и DOPE. Увеличение доли DOPE в составе КЛ увеличивает эффективность доставки молекул мРНК в клетки эукариот. Подобрано оптимальное N/P соотношение для доставки модельных мРНК в клетки эукариот равно 10/1. Наибольшую эффективность для доставки модельных мРНК *in vitro* продемонстрировали катионные липосомы 2X3-DOPE 1:3.

Наибольшую эффективность доставки мРНК в экспериментах на клеточных линиях продемонстрировала липидная композиция 2X3-DOPE 1:3. Данная липидная композиция была выбрана для дальнейших исследований *in vivo*. Известно, что DSPE-PEG₂₀₀₀ повышает стабильность и биодоступность ЛНЧ *in vivo* [Gileva et al., 2023] Присоединение цепей ПЭГ создает

«защитный слой» на поверхности КЛ, который приводит к образованию стерических барьеров и уменьшению поверхностного суммарного заряда, что обеспечивает пролонгирование времени циркуляции в организме. Одновременно, пегилирование КЛ препятствует клеточному поглощению и эндосомальному высвобождению [Liu C. et al., 2020]. Таким образом, пегилирование липосом часто снижает эффективность доставки НК *in vitro*, но увеличивает эффективность *in vivo* [Gjetting et al., 2010].

Для экспериментов *in vivo* были получены липосомы 2X3-DOPE 1:3, модифицированные DSPE-PEG₂₀₀₀: 2X3-DOPE 1:3+DSPE-PEG₂₀₀₀ (0,62% мол.) (2X3-DOPE-PEG (0,62% мол.)) и 2X3-DOPE 1:3+DSPE-PEG₂₀₀₀ (2% мол.) (2X3-DOPE-PEG (2% мол.)). Полученные и охарактеризованные пегилированные КЛ были исследованы на эффективность доставки мРНК-eGFP в клетки ВНК-21 с использованием метода проточной цитофлуориметрии (Рисунок 5). По результатам исследования эффективность трансфекции пегилированными КЛ значительно снизилась по сравнению с исходными не модифицированными липосомами 2X3-DOPE 1:3, при этом при увеличении в структуре КЛ мольной доли DSPE-PEG₂₀₀₀ снижалась эффективность трансфекции, как по доле трансфицированных клеток, так и по СИФ (Рисунок 5). Аналогичные результаты были получены на клетках A549. Таким образом, модификация катионных липосом 2X3-DOPE 1:3 DSPE-PEG₂₀₀₀ приводит к снижению эффективности доставки модельной мРНК в клетки ВНК-21, что согласуется с данными литературы о том, что пегилирование КЛ приводит к снижению эффективности доставки *in vitro* [Liu C. et al., 2020].

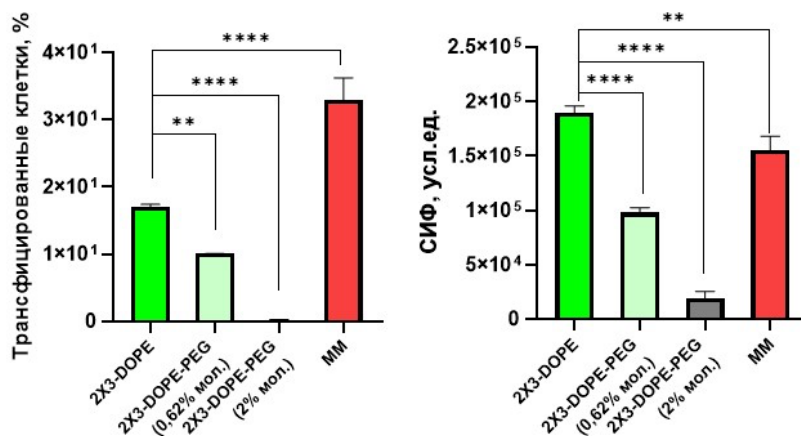


Рисунок 5 – Сравнение эффективности доставки мРНК-eGFP с использованием 2X3-DOPE 1:3 (2X3-DOPE) и пегилированных катионных липосом 2X3-DOPE-PEG (0,62% мол.) и 2X3-DOPE-PEG (2% мол.) в N/P соотношении 10/1 на клеточной линии ВНК-21 через 24 часа от момента трансфекции методом проточной цитофлуориметрии. Положительный контроль трансфекции Lipofectamine MessengerMAX (MM). Статистическая значимость различий была определена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с поправкой на множественное сравнение (тест Тьюки): ****— $p < 0.0001$; ***— $p < 0.001$; **— $p < 0.01$

Далее нами была проведена оценка эффективности доставки мРНК-FLuc полученными пегилированными липосомами *in vivo*. Самкам мышей вводили липоплексы с мРНК-FLuc

подкожно. Результаты оценивали количественно по наличию биолюминесценции, выраженной в относительных световых единицах (RLU) (Рисунок 6).

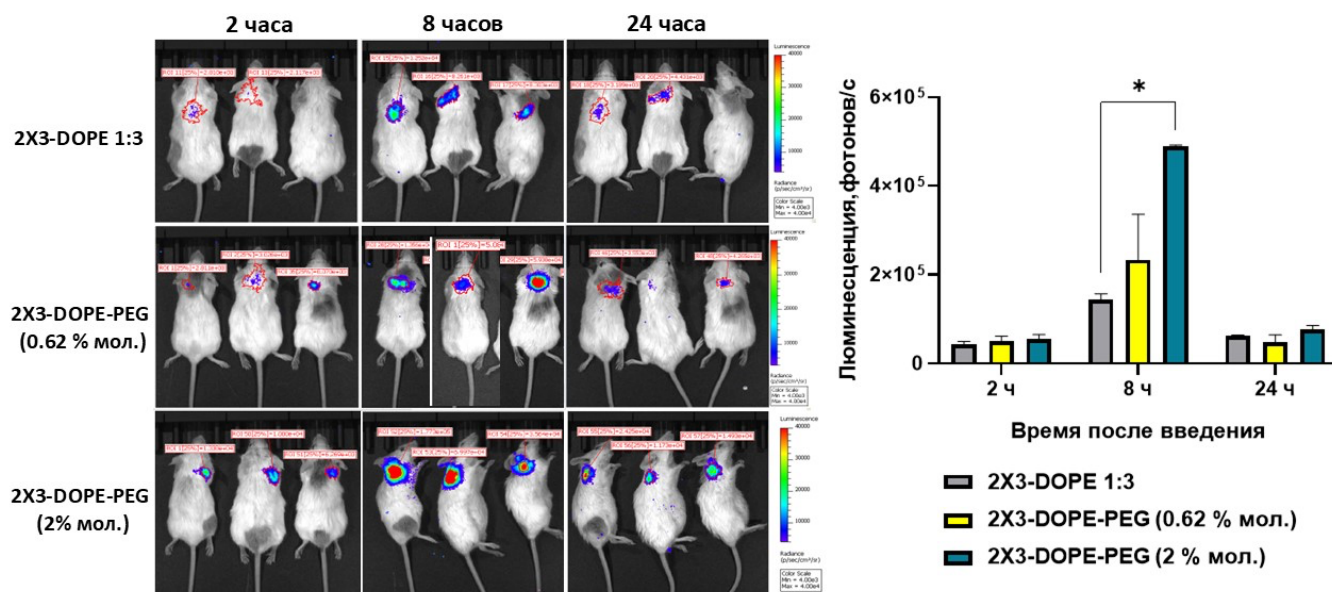


Рисунок 6 – Эффективность доставки мРНК-FLuc катионными липосомами 2X3-DOPE 1:3, 2X3-DOPE -PEG (0,62% мол.), 2X3-DOPE-PEG (2% мол.) при подкожном введении *in vivo*.

Регистрацию биолюминесценции проводили через 2 ч, 8 ч и 24 ч. В правой части каждого изображения расположена линейка псевдоцвета, отражающая распределение интенсивности биолюминесценции (красный – максимальный, синий минимальный сигнал в относительных световых единицах (RLU)). Эффективность трансляции мРНК-FLuc оценивали по интенсивности биолюминесценции. Статистическая значимость различий была определена с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой на множественное сравнение (тест Тьюки) (*— $p < 0.05$)

По результатам оценки эффективности доставки модельной мРНК-FLuc с использованием разработанных липосомальных носителей было показано, что все носители при подкожном пути введения эффективно доставляют мРНК и обеспечивают трансляцию люциферазы светлячка. Максимальную эффективность доставки продемонстрировали КЛ 2X3-DOPE 1:3–PEG₂₀₀₀ (2% мол.) через 8 часов после подкожного введения. Добавление DSPE-PEG₂₀₀₀ в структуру катионных липосом 2X3-DOPE увеличивает биодоступность комплексов в экспериментах *in vivo*.

3. Получение и характеристика комплексов катионных липосом 2X3-DOPE или эндосомолитического проникающего в клетку пептида EB1 с модельной миРНК. Оценка эффективности доставки модельных миРНК, меченных флуоресцентной меткой, исследуемыми комплексами в клетки эукариот.

Разработка новых средств доставки миРНК остается актуальной задачей особенно для препаратов для системного введения, которое требуется при многих онкологических заболеваниях, включая ХМЛ. Клеточная линия К-562, характеризуется высоким уровнем экспрессии химерного

онкогена *BCR-ABL*, играющего ключевую роль в патогенезе ХМЛ и приводящего к формированию опухолевого клона, и представляет собой эффективную модель в отношении исследования средств доставки миРНК, направленных против гена *BCR-ABL*.

В нашей работе в качестве средств доставки bcr-abl миРНК на *in vitro* модели ХМЛ (клеточной линии К-562) были использованы оригинальные КЛ на основе 2X3 и DOPE, продемонстрировавшие эффективную доставку мРНК на предыдущем этапе исследования. В частности, мы использовали 2X3-DOPE в молярном соотношении 1:3 (далее 2X3-DOPE), и их модификацию с помощью DSPE-PEG₂₀₀₀ (0,62% мол.) (далее 2X3-DOPE-PEG). В качестве альтернативного средства доставки bcr-abl миРНК использовали вторичный амфипатический эндосомолитический проникающий в клетку пептид EB1, представляющий собой модифицированный аналог пенетратина [Lundberg et al., 2007].

Нами были получены липоплексы 2X3-DOPE-PEG и миРНК при зарядовых соотношениях (charge ratio, CR, соотношение между количеством положительных зарядов на молекуле пептида или атомов азота в катионном липиде к количеству отрицательных фосфатных групп миРНК) 1/1, 2/1, 4/1, 6/1, 8/1 и 10/1, и измерены физико-химические характеристики –ГД и ζ-потенциал методом ДСР, результаты представлены в таблице 2. Липоплексы миРНК с 2X3-DOPE-PEG при CR 8/1 обладали наименьшим ГД (168 ± 1 нм) и оптимальным ζ-потенциалом ($+47.2 \pm 1.9$). Для получения комплексов между EB1 и миРНК пептид добавляли в молярном избытке для достижения CR 1/1, 2/1, 4/1, 6/1 и 8/1. Комплексы миРНК с пептидом, образующиеся при CR 4/1 и выше, обладали оптимальным ζ-потенциалом и ГД для эффективной трансфекции *in vitro* (Таблица 2) При этом, при CR 4/1 используется меньшее количество носителя для комплексообразования и данное соотношение было выбрано для дальнейших экспериментов.

Таблица 2 – Определение гидродинамического размера, индекса полидисперсности (PDI) и ζ-потенциала комплексов катионных липосом 2X3-DOPE-PEG и пептида EB1 с миРНК.

Зарядовое соотношение (CR)	EB1/миРНК			2X3-DOPE-PEG/миРНК		
	ГД (нм)	PDI	ζ -потенциал (мВ)	ГД (нм)	PDI	ζ -потенциал (мВ)
1/1	85 ± 1	0.24 ± 0.01	-41.4 ± 2.7	266 ± 9	0.39 ± 0.10	-15.0 ± 0.8
2/1	1226 ± 8	0.54 ± 0.03	$+9.4 \pm 1.6$	209 ± 3	0.34 ± 0.01	-13.0 ± 1.1
4/1	105 ± 2	0.13 ± 0.01	$+20.4 \pm 2.5$	243 ± 8	0.39 ± 0.01	$+21.0 \pm 3.5$
6/1	85 ± 1	0.15 ± 0.01	$+22.1 \pm 3.0$	195 ± 6	0.36 ± 0.02	$+48.4 \pm 1.0$
8/1	78 ± 1	0.11 ± 0.01	$+24.9 \pm 2.0$	168 ± 1	0.32 ± 0.02	$+47.2 \pm 1.9$
10/1	-	-	-	218 ± 7	0.40 ± 0.01	$+51.5 \pm 0.4$

На основании анализа физико-химических свойств исследуемых комплексов мы определили, что оптимальное CR для катионных липосом и миРНК составляет 8/1, тогда как оптимальное CR

для пептида EB1 и миРНК составляет 4/1. Комплексы в данных CR были использованы для дальнейших экспериментов *in vitro*.

Полученные и охарактеризованные комплексы были исследованы на эффективность трансфекции флуоресцентно меченной миРНК в клетки K-562 методом проточной цитофлуориметрии. Для оценки эффективности доставки миРНК с использованием катионных липосом была проведена трансфекция липоплексами с 2X3-DOPE и 2X3-DOPE-PEG и миРНК при CR равном 8/1. В нескольких исследованиях было показано, что пегилирование липосом может снизить эффективность трансфекции *in vitro*, и непегилированные липосомы обычно демонстрируют более высокую эффективность трансфекции *in vitro* по сравнению с их пегилированными аналогами [Zhang et al., 2010]. Однако наши исследования показали, что пегилирование липосом 2X3-DOPE не только не снижало, а, наоборот, приводило к увеличению эффективности трансфекции миРНК на клеточной линии K-562 (Рисунок 7). Аналогичные результаты были получены на клеточной линии A549.

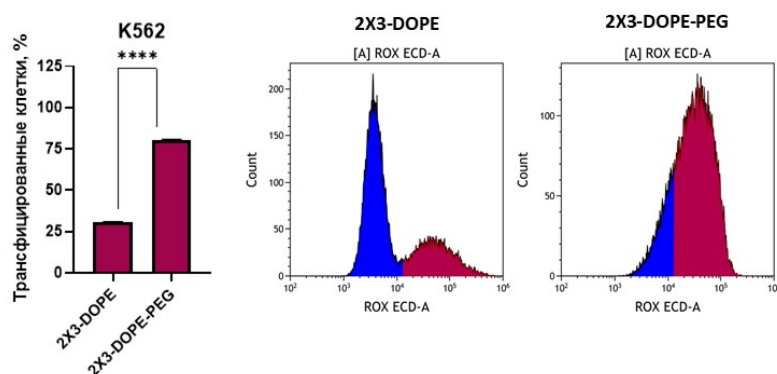


Рисунок 7 – Сравнение эффективности трансфекции миРНК, меченных флуоресцентной меткой JOE, с использованием пегилированных липосом 2X3-DOPE-PEG и их непегилированных аналогов 2X3-DOPE методом проточной цитофлуориметрии на клетках K-562. Статистическая значимость различий была определена при помощи критерия Манна-Уитни: *— $p < 0.05$

Таким образом эффективность доставки миРНК с помощью 2X3-DOPE-PEG оказалась значительно выше, чем при использовании непегилированных липосом и далее все исследования проводили с использованием 2X3-DOPE-PEG в качестве средства доставки миРНК.

На следующем этапе работы мы сравнили эффективность трансфекции комплексами 2X3-DOPE-PEG при CR 8/1 и EB1/миРНК при CR 4/1 и наблюдали высокую долю клеток, интернализовавших JOE-меченную миРНК после 24 часов инкубации ($93.4 \pm 0.4\%$ и $83.6 \pm 1.5\%$, соответственно). Однако средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) при трансфекции EB1 (55266 ± 1750) по сравнению с 2X3-DOPE-PEG (115994 ± 5150) была ниже (Рисунок 8).

Нами было продемонстрировано, что исследуемые комплексы эффективно реализуют доставку миРНК в клетки K-562. Было обнаружено, что комплексы 2X3-DOPE-PEG/миРНК более эффективно доставляют миРНК по сравнению с комплексами EB1/миРНК.

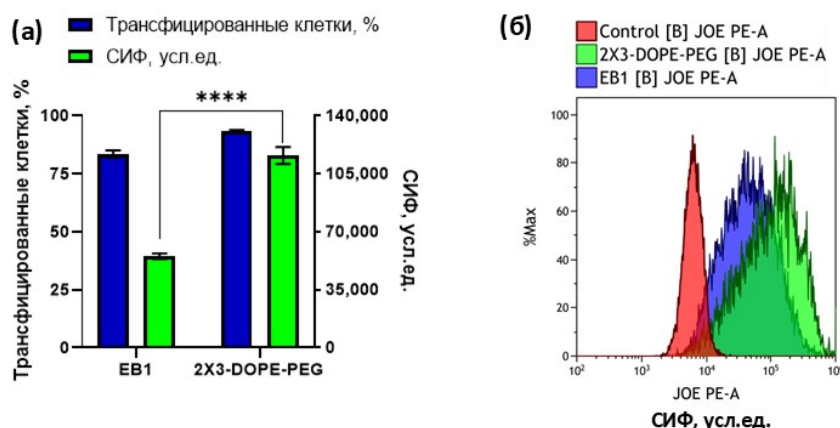


Рисунок 8 – (а) Эффективность трансфекции миРНК-ЖОЕ в клетки К-562 пептидом EB1 и катионными липосомами 2X3-DOPE-PEG методом проточной цитофлуориметрии через 24 ч от момента трансфекции. Левая ось Y – доля трансфицированных клеток, правая ось Y – средняя интенсивность флуоресценции (СИФ). Статистическая значимость различий была определена методом двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой на множественное сравнение (критерий Сидака): ****— $p < 0.0001$. (б) Гистограмма распределения клеток по интенсивности флуоресценции

4. Исследование механизмов внутриклеточной интернализации флуоресцентно меченой модельной миРНК в составе комплексов с катионными липосомами 2X3-DOPE и пептидом EB1

Основным клеточным процессом, участвующим в интернализации наноконплексов, является эндоцитоз, который включает макропиноцитоз, клатрин-опосредованный эндоцитоз, кавеолин-опосредованный эндоцитоз и клатрин/кавеолин-независимый эндоцитоз. Для исследования механизмов интернализации исследуемых комплексов мы трансфицировали клетки К-562 в присутствии различных ингибиторов эндоцитоза: динасора (ингибитора активности динамин-ГТФазы и динамин-зависимого эндоцитоза), цитохалазина D (ингибитора макропиноцитоза) и филлипина (ингибитор кавеолин/рафт-зависимого эндоцитоза) [Sousa De Almeida et al., 2021].

По результатам исследования эффективность трансфекции миРНК с помощью EB1 снижалась в присутствии ингибиторов эндоцитоза, но незначительно. Можно предположить, что в процесс проникновения комплекса EB1/миРНК в клетки вовлечено несколько путей эндоцитоза, включая динамин-зависимый эндоцитоз, макропиноцитоз и кавеолин-опосредованный эндоцитоз (Рисунок 9). При трансфекции клеток К-562 комплексами 2X3-DOPE-PEG в присутствии ингибиторов эндоцитоза, филлипин не влиял на эффективность трансфекции миРНК, динасор и цитохалазином D приводили к снижению поглощения комплексов (Рисунок 9). Полученные данные подтверждают, что липоплексы с миРНК проникают в клетки К-562 преимущественно посредством динаминзависимого эндоцитоза и частично посредством макропиноцитоза.

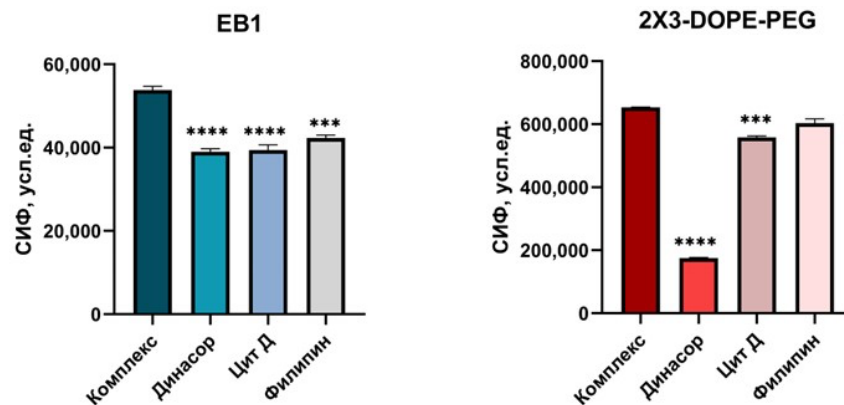


Рисунок 9 – Средняя интенсивность флуоресценции JOE (отражающая интернализацию миРНК) в клетках К-562 методом проточной цитофлуориметрии. Клетки были трансфицированы комплексами миРНК-JOE с EB1 и 2X3-DOPE в течение 15 минут в присутствии или отсутствии (комплекс) ингибиторов эндоцитоза, включая динасор, цитохалазин Д (Цит Д) и филипин.

Статистическая значимость различий была определена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с поправкой на множественное сравнение (тест Тьюки): ****— $p < 0.0001$; ***— $p < 0.001$; **— $p < 0.01$; *— $p < 0.05$

Нами также были проведено исследование эффективности доставки миРНК, меченными флуоресцентной меткой, исследуемыми комплексами на разных клеточных линиях. Было показано, что липоплексы эффективно доставляют миРНК во все исследуемые клеточные линии. Комплексы с пептидом эффективно трансфицируют выбранные суспензионные клеточные линии К-562 и Jurkat, при этом эффективность трансфекции клеток Jurkat оказалась ниже, чем клеток К-562, а эффективность доставки в клетки ВНК-21 и А549 оказалась минимальной (Рисунок 10).

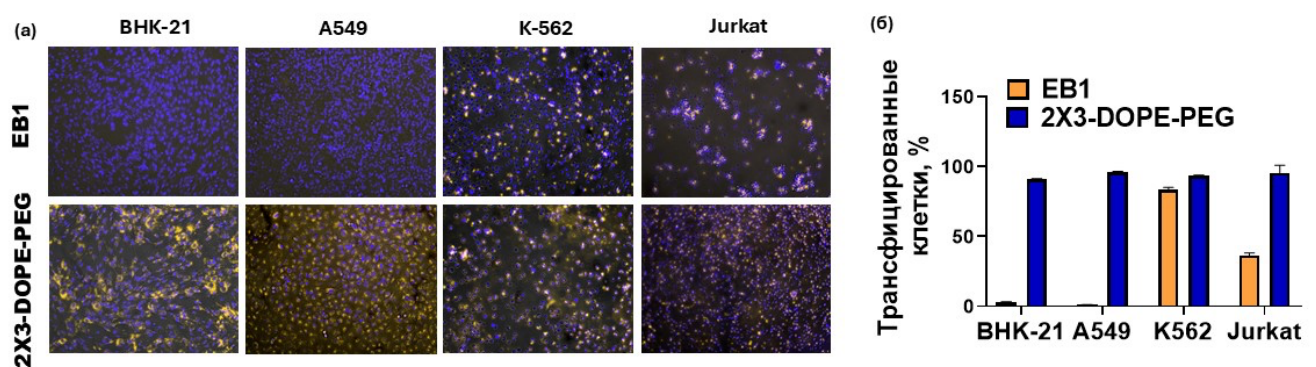


Рисунок 10 – Оценка эффективности трансфекции миРНК, меченных флуоресцентной меткой JOE, исследуемыми комплексами на клеточных линиях ВНК-21, А549, К562 и Jurkat методом флуоресцентной микроскопии (а) и проточной цитофлуориметрии (б). Синий – ядра клеток, оранжевый – миРНК-JOE. Трансфицированные клетки – доля клеток (в %), в которых был зарегистрирован сигнал JOE

Таким образом, комплексы катионных липосом с миРНК проникают в клетки К-562 в основном путем динамин-зависимого эндоцитоза и эффективны для трансфекции всех исследованных клеточных линий. Комплексы EB1 с миРНК проникают в клетки К-562 посредством

различных механизмов эндоцитоза, включая динамин-зависимый эндоцитоз, макропиноцитоз, кавеолин-зависимый эндоцитоз и, возможно, динамин-независимый эндоцитоз, и при этом комплексы обладают клеточной специфичностью.

На следующем этапе работы нами было проведено исследование эндосомального высвобождения миРНК при доставке в клетки К-562 исследуемыми комплексами. Эффективность высвобождения миРНК, доставляемых в клетки К562 с помощью EB1 и 2X3-DOPE-PEG оценивали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и анализа колокализации белка EEA1 (маркер ранних эндосом), белка RAB7 (маркер поздних эндосом) и белка LAMP1 (маркер лизосом) в фиксированных клетках К562 после трансфекции миРНК, меченных флуоресцентной меткой. Наши результаты показали, что после трансфекции клеток К-562 комплексами EB1/миРНК миРНК была колокализована с EEA1-положительными везикулами через 15 минут после трансфекции (58,4 %). Через 1 ч наблюдалась колокализация миРНК с маркерами поздних эндосом и через 4 ч с маркерами лизосом (степень колокализации 59,6%). Полученные данные, свидетельствуют об ограниченном высвобождении миРНК при доставке с помощью EB1 (Рисунок 11). Конфокальные изображения, полученные после трансфекции комплексами 2X3-DOPE-PEG/миРНК демонстрируют, что через 15 мин от момента трансфекции миРНК ассоциированы с популяцией везикул, несущих маркеры ранних эндосом EEA1 (96.8%). Через 1 час после трансфекции миРНК частично локализуются в поздних эндосомах (51.8 %), а через 4 часа после трансфекции колокализация миРНК с маркерами лизосом LAMP-1 была низкой (33.9 %) (Рисунок 11). Полученные результаты свидетельствуют о том, что доставляемые молекулы миРНК попадают

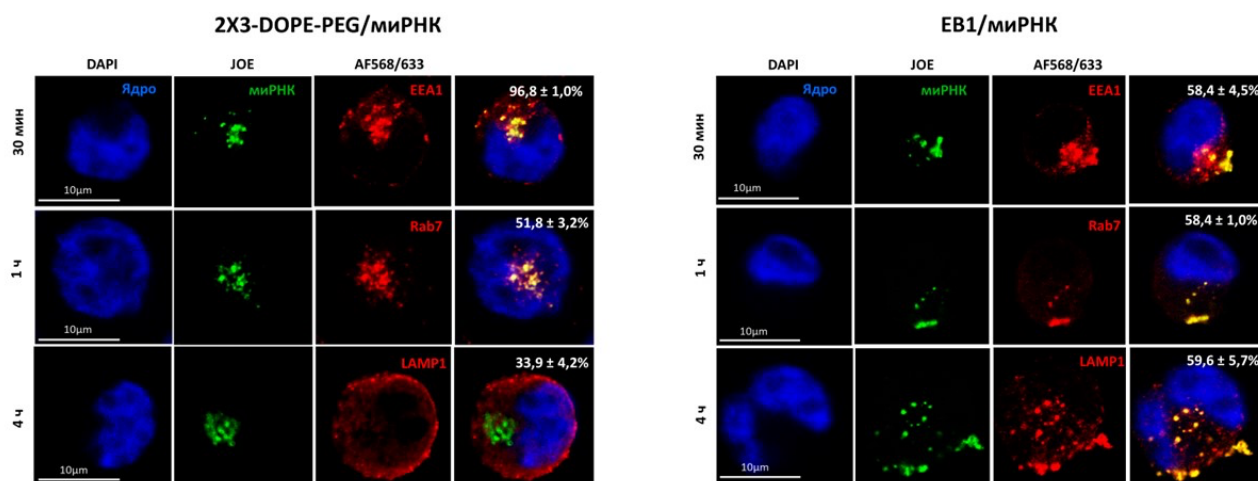


Рисунок 11 – Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии клеток К562 после трансфекции комплексами 2X3-DOPE-PEG/миРНК или EB1/миРНК. После трансфекции и инкубации с исследуемыми комплексами в течение 30 минут, 1 часа и 4 часов клетки фиксировали, пермеабелизировали и иммуноокрашивали. Эндосомы были помечены маркерами EEA1 (Alexa Fluor 568, красный), Rab7 (Alexa Fluor 633, красный) и LAMP-1 (Alexa Fluor 568, красный), которые визуализировали присутствие миРНК, меченную JOE (зеленый) в ранних, поздних эндосомах и лизосомах, соответственно. Количественная оценка колокализации (степень колокализации, в %) проводилась, как описано в методах. Длина масштабного отрезка составляет 10 мкм

в ранние эндосомы, частично переходят в поздние эндосомы и незначительно накапливаются в лизосомах, указывая тем самым на то, что с использованием 2X3-DOPE-PEG миРНК эффективно высвобождаются из состава ранних эндосом.

Наши результаты продемонстрировали, что КЛ проникают в клетки преимущественно посредством динамин-зависимого эндоцитоза и эффективно высвобождают доставляемые молекулы миРНК из эндосом. Следует отметить, что модификация КЛ DSPE-PEG₂₀₀₀ не ингибирует интернализацию липоплекса и выход миРНК из эндосомы. Механизм проникновения пептида EB1 более сложен, и мы наблюдали ограниченное высвобождение миРНК из эндосом или их быстрое частичное высвобождение из ранних эндосом, которое мы не обнаружили.

5. Сравнение эффективности катионных липосом 2X3-DOPE и пептида EB1 в качестве средств доставки противоопухолевой *bcr-abl* миРНК, направленной на химерный онкоген *BCR-ABL* на *in vitro* модели хронического миелолейкоза (клеточной линии K-562)

Следующим этапом была проведена оценка биологической активности доставляемых молекул миРНК в составе исследуемых комплексов по уровню *BCR-ABL* мРНК методом ПЦР-РВ при нормировании на референсный ген *GAPDH*. По результатам исследования уровень мРНК онкогена *BCR-ABL* в клетках K-562 значительно снижался после трансфекции исследуемых комплексов через 24 ч, 48 ч и 72 ч от момента трансфекции, при этом трансфекция катионными липосомами приводила к более выраженному эффекту (Рисунок 12). Трансфекция комплексами EB1/миРНК привела к максимальному снижению *BCR-ABL* мРНК через 24 часа (на 72.5%) и эффект постепенно уменьшался с течением времени. Однако при использовании комплексов 2X3-DOPE-PEG/миРНК мы наблюдали снижение уровня *BCR-ABL* мРНК на 90.5% через 24 ч после

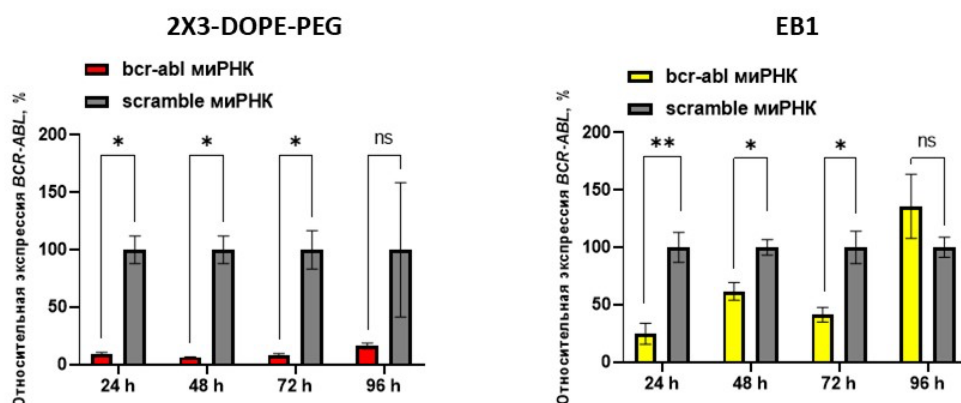


Рисунок 12 – Относительный уровень экспрессии *BCR-ABL* мРНК в клетках K562 через 24, 48, 72 и 96 ч от момента трансфекции комплексами EB1/ *bcr-abl* миРНК или 2X3-DOPE-PEG/*bcr-abl* миРНК методом ПЦР-РВ. В качестве контроля (100%) использовался относительный уровень экспрессии гена *BCR-ABL* в трансфицированных исследуемыми комплексами клеток нецелевой (scramble) миРНК. Статистическая значимость различий была определена с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой на множественное сравнение (тест Сидака): **— $p < 0.01$; *— $p < 0.05$; $p > 0.05$ ('ns' – статистически не значимо)

трансфекции, причем эффект сохранялся до 72 ч (через 48 и 72 часов снижение на 93.6% и 91.6% соответственно).

Полученные результаты демонстрируют, что трансфекция клеток K-562 исследуемыми комплексами приводит к эффективному сайленсингу гена *BCR-ABL*. Однако использование комплексов на основе EB1 приводит к менее выраженному эффекту ингибирования экспрессии гена *BCR-ABL*.

Белок BCR-ABL представляет собой химерный онкопротеин, обладающий повышенной тирозинкиназной активностью и участвующий в развитии неконтролируемой пролиферации клеток ХМЛ. Оценку влияния сайленсинга гена *BCR-ABL* на аномальную пролиферацию клеток оценивали путем измерения метаболической активности клеток после трансфекции с использованием MTS-теста. Было показано, что комплексы 2X3-DOPE-PEG с терапевтической миРНК значительно ингибируют метаболическую активность клеток K-562, причем максимальное снижение наблюдается через 72 часа (~70%). Напротив, комплексы EB1 с анти-bcr-abl миРНК продемонстрировали максимальное снижение метаболической активности через 24 часа после трансфекции (~50%), и затем наблюдалось постепенное снижение антиметаболического эффекта с течением времени (Рисунок 13). Полученные данные коррелируют с результатами ПЦР-РВ.

Наше исследование показало, что трансфекция клеток K-562 изучаемыми комплексами приводит не только к эффективному подавлению целевого онкогена, но и эффективно и специфично снижает патологическую пролиферацию опухолевых клеток. При этом комплексы с катионными липосомами оказывают более выраженный эффект на подавление экспрессии *BCR-ABL* и снижение метаболической активности клеток K-562.

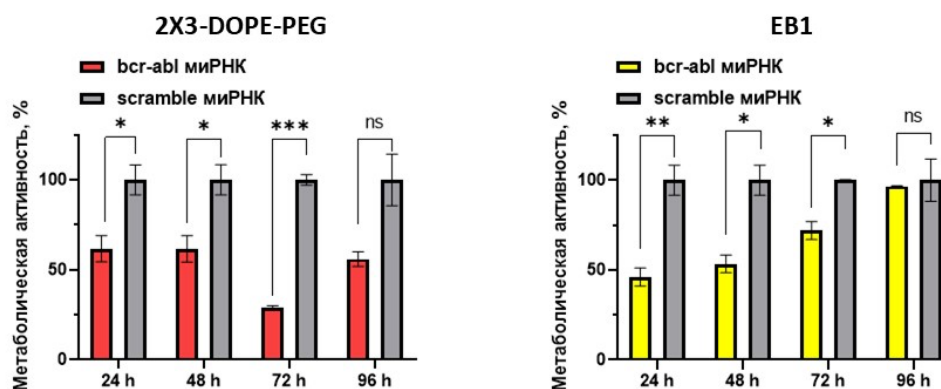


Рисунок 13 – Метаболическая активность клеток K-562 через 24, 48, 72 и 96 ч после трансфекции комплексами EB1/ bcr-abl миРНК или 2X3-DOPE-PEG/bcr-abl миРНК (MTS-тест). В качестве контроля (100%) использовался уровень метаболической активности трансфицированных исследуемыми комплексами клетках нецелевой (scramble) миРНК. Статистическая значимость различий была определена с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой на множественное сравнение (тест Сидака): ***— $p < 0.001$; **— $p < 0.01$; *— $p < 0.05$; $p > 0.05$ ('ns' – статистически не значимо)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе получены оригинальные КЛ на основе 2X3 и DOPE (2X3-DOPE) для доставки модельных мРНК с разными молярными соотношениями 1:1, 1:2 и 1:3 в сторону увеличения хелперного липида DOPE. Проведена физико-химическая характеристика носителей и их комплексов (липоплексов) с модельной мРНК. КЛ 2X3-DOPE и липоплексы обладали оптимальным ГД и ζ -потенциалом для эффективной внутриклеточной доставки. Сравнительное исследование эффективности доставки мРНК *in vitro* с использованием оптимального N/P соотношения показало, что с увеличением хелперного липида DOPE по отношению к катионному амфифилу 2X3 в структуре исследуемых катионных липосом, увеличивается эффективность доставки мРНК *in vitro*. Впервые полученные и исследованные КЛ 2X3-DOPE 1:3 в подобранном и охарактеризованном оптимальном N/P соотношении с модельными мРНК продемонстрировали максимальную эффективность доставки, при этом эффективность доставки мРНК-Fluc оказалась выше, чем при использовании «золотого стандарта» для трансфекции мРНК *in vitro* – коммерческого трансфекционного реагента Lipofectamine MessengerMAX. При анализе биолюминесценции люциферазы светлячка при подкожном введении лабораторным мышам комплексов 2X3-DOPE 1:3/мРНК-FLuc было показано, что полученные КЛ 2X3-DOPE 1:3 эффективно доставляют мРНК-Fluc *in vivo*, что приводит к экспрессии фермента. Пегилирование катионных липосом 2X3-DOPE 1:3 приводит к увеличению эффективности доставки модельной мРНК-Fluc *in vivo*.

Проведено сравнительное исследование эффективности внутриклеточной доставки миРНК и проявляемой ею противоопухолевой активности на *in vitro* модели ХМЛ в комплексе с катионными липосомами 2X3-DOPE-PEG или с проникающим в клетку пептидом EB1. Продemonстрировано, что эффективность внутриклеточной доставки bcr-abl-миРНК в клетки K-562 с помощью катионных липосом 2X3-DOPE-PEG превосходит эффективность доставки с помощью пептида EB1. При этом пегилированные КЛ демонстрируют более высокую эффективность трансфекции, более эффективное высвобождение миРНК из эндосом, более эффективное подавление экспрессии химерного онкогена *BCR-ABL* и более выраженный антипролиферативный эффект на *in vitro* модели ХМЛ. Показано, что ПЭГ-модификация катионных липосом 2X3-DOPE приводит к увеличению эффективности доставки миРНК на клеточных линиях K-562 и A549. Комплексы на основе пегилированных катионных липосом 2X3-DOPE-PEG и bcr-abl миРНК могут быть предложены в качестве новой противоопухолевой композиции для дальнейшего исследования противоопухолевой эффективности на *in vivo* модели ХМЛ.

Таким образом, предлагаемые нами КЛ для доставки терапевтических РНК являются перспективными носителями для разработки препаратов генотерапии на основе мРНК или миРНК, обладающие низкой токсичностью и высокой эффективностью.

По результатам данной работы были сформулированы следующие **выводы**:

1. Комплексы катионных липосом 2X3-DOPE 1:1, 1:2 и 1:3 с модельными мРНК (мРНК-eGFP и мРНК-FLuc) в N/P соотношениях от 4/1 и выше (4/1, 6/1, 8/1, 10/1, 20/1) полностью связывают мРНК, обладают размером менее 250 нм и положительным дзета-потенциалом, что делает возможным дальнейшую проверку эффективности доставки мРНК исследуемыми катионными липосомами в клетки эукариот.
2. Увеличение доли хелперного липида DOPE по отношению к катионному амфифилу 2X3 в структуре исследуемых катионных липосом, увеличивает эффективность доставки мРНК в клетки эукариот. Оптимальное N/P соотношение для доставки модельных мРНК в клетки эукариот составляет 10/1. Доставка мРНК-FLuc при помощи пегилированной формы катионных липосом 2X3-DOPE 1:3-DSPE-PEG₂₀₀₀ (2% мол.) приводит к экспрессии люциферазы светлячка у мышей при подкожном введении.
3. Эффективность доставки мРНК в клетки эукариот с помощью 2X3-DOPE 1:3, модифицированных DSPE-PEG₂₀₀₀, оказалась в три раза выше, чем при использовании непегилированных липосом. Было показано, что в зарядовых соотношениях катионных липосом и мРНК 8/1, и пептида EB1 и мРНК 4/1, средняя интенсивность флуоресценции меченой мРНК при доставке с помощью катионных липосом оказывается примерно на 40% выше.
4. Комплексы катионных липосом с мРНК проникают в клетки К-562 в основном путем динамин-зависимого эндоцитоза и эффективны для трансфекции всех исследованных клеточных линий. Комплексы EB1 с мРНК проникают в клетки К-562 посредством различных механизмов эндоцитоза, включая динамин-зависимый эндоцитоз, макропиноцитоз, кавеолин-зависимый эндоцитоз и, возможно, динамин-независимый эндоцитоз, и при этом комплексы обладают клеточной специфичностью.
5. Показано, что bcr-abl мРНК в комплексах с пегилированными катионными липосомами 2X3-DOPE 1:3 и пептидом EB1 обеспечивает сайленсинг химерного онкогена *BCR-ABL* и снижение метаболической активности клеток К-562, однако использование катионных липосом позволяет достичь более выраженного эффекта как при подавлении экспрессии онкогена (до 90%), так и при анализе снижения метаболической активности клеток (на 75%).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Vysochinskaya V.**, Dovbysh O., Gorshkov A., Brodskaya A., Dubina M., Vasin A., Zabrodskaya Y. Advancements and Future Prospects in Molecular Targeted and siRNA Therapies for Chronic Myeloid Leukemia // *Biomolecules*. – 2024. – Vol. 14. – No. 6. – P.644. (SCOPUS)
2. **Vysochinskaya V.**, Zabrodskaya Y., Dovbysh O., Emelyanov A., Klimenko V., Knyazev N., Terterov I., Egorova M., Bogdanov A., Maslov M., Vasin A., Dubina M. Cell-penetrating peptide and

cationic liposomes mediated siRNA delivery to arrest growth of chronic myeloid leukemia cells in vitro // Biochimie. – 2024. – Vol. 221. – P.1-12. (SCOPUS)

3. **Vysochinskaya V.**, Shishlyannikov S., Zabrodskaya Y., Shmendel E., Klotchenko S., Dobrovolskaya O., Gavrilova N., Makarova D., Plotnikova M., Elpaeva E., Gorshkov A., Moshkoff D., Maslov M., Vasin A. Influence of Lipid Composition of Cationic Liposomes 2X3-DOPE on mRNA Delivery into Eukaryotic Cells // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. – No. 1. – P. 8. (SCOPUS)

4. Svirina A., Terterov I., Klimenko V., Shmakov S., Knyazev N., Emelyanov A., **Vysochinskaya V.**, Bogdanov A. Influence of electrostatic interactions on cell-penetrating peptide-siRNA complex formation and intracellular delivery efficiency. Journal of Physics: Conference Series. – 2018. – Vol. 1124. – No. 3. – P.031005. (SCOPUS)

Тезисы конференций:

1. **V. Vysochinskaya**, N.A. Knyazev, A. Emelyanov, I. Terterov, V. Klimenko, A.A. Bogdanov, M. Dubina. Targeting of BCR-ABL gene expression in K562 cells using cell-penetrating peptide nanocomplexes carrying siRNAs. ESMO CONGRESS 2021, September 2021, Paris, France, DOI: 10.1016/j.annonc.2021.08.308.

2. **Высочинская В.В.**, Клотченко С.А., Шишлянников С.М., Добровольская О.А., Елшин Н.Д., Елпаева Е.А., Маслов М.А. Влияние композиции липидов в составе катионных липосом 2X3-DOPE на эффективность доставки мРНК *in vitro* и *in vivo*. IV Всероссийская конференция молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике» С.-Петербург., 13–14 апреля 2023 г., сборник тезисов, с.25.

3. **Высочинская В.В.**, Довбыш О.В., Маслов М.А. Эффективность противоопухолевой композиции на основе малых интерферирующих РНК и пегилированных катионных липосом в подавлении выживаемости опухолевых клеток на *in vitro* модели хронического миелолейкоза. 26-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» Пущино, 9–13 апреля 2023 г, сборник тезисов, с.80.

4. **Высочинская В.В.**, Забродская Я.А, Довбыш О.В., Егорова М.А., Маслов М.А. Сравнение эффективности проникающего в клетку пептида и пегилированных катионных липосом в качестве средств доставки противоопухолевых малых интерферирующих РНК на *in vitro* модели хронического миелолейкоза. OPENBIO X международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов, Новосибирск, 2023, сборник тезисов, с.591.

5. **Высочинская В.В.**, Забродская Я.А, Довбыш О.В. Разработка систем доставки малых интерферирующих РНК на *in vitro* модели хронического миелолейкоза. XXIII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии, Гатчина, 2024, сборник тезисов, с.23.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность своему научному руководителю к.ф.-м.н. Забродской Яне Александровне за помощь и поддержку на всех этапах работы, а также д.б.н. Васину Андрею Владимировичу и академику РАН, д.м.н. Дубине Михаилу Владимировичу за всестороннюю помощь и поддержку при выполнении работы. Автор особо признателен д.х.н. Маслову Михаилу Александровичу за предоставленную возможность и неоценимую помощь в работе с катионными липосомами, оказанную в ходе выполнения диссертационного исследования. Автор выражает признательность коллегам: к.б.н. Горшкову Андрею Николаевичу, к.б.н. Шишлянникову Сергею Михайловичу, Довбыш Олеся Вячеславовне, к.б.н. Елпаевой Екатерине Александровне, к.б.н. Емельянову Антону Константиновичу, к.ф.-м.н. Тертерову Ивану Николаевичу.