



УДК 577.115:547.233.3

ИОНИЗИРУЕМЫЙ КАТИОННЫЙ ЛИПИД ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ РНК

© 2025 г. К. Ш. Гайсин*, **, Е. В. Рябухина*, Д. О. Короев*, И. И. Михалев*,
Е. С. Журавлев***, Г. А. Степанов***, И. А. Болдырев****, Е. Л. Водовозова*, #

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3

*** Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Ак. Лаврентьева, 8

**** ФГБУН “Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина” РАН,
Россия, 119071 Москва, Ленинский проспект, 31

Поступила в редакцию 20.05.2025 г.

После доработки 28.05.2025 г.

Принята к публикации 29.05.2025 г.

Ключевой компонент липидной платформы наночастиц для РНК-терапии – ионизируемые липиды. Они обеспечивают эффективную сборку комплекса липидов с нуклеиновой кислотой, ее защиту от преждевременной деградации, а после эндоцитоза способствуют выходу РНК в цитоплазму для дальнейшего процессинга. В работе описан синтез нового ионизируемого катионного липида на основе диглицеридного производного третичного алкиламина – [5-[1,2-ди(деканоилокси)пропан-3-илокси]пентил-(4-гидроксибутил)-амино]пентокси]-2-деканоилоксипропил]деканоат (An-1). Синтез отличается простотой и экономичностью применения реагентов. В сравнительных экспериментах с известным ионизируемым липидом ALC-0315 показано, что липид An-1 формирует сходные по размерам и эффективности включения модельной мРНК липидные наночастицы (ЛНЧ). ЛНЧ с мРНК зеленого флуоресцентного белка на основе липида An-1 эффективнее трансфицировали клетки в культуре по сравнению с ЛНЧ на основе липида ALC-0315. Предполагается, что новый ионизируемый липид может найти применение в производстве мРНК-вакцин.

Ключевые слова: ионизируемый липид, синтез, липидные наночастицы, мРНК

DOI: 10.31857/S0132342325050246

ВВЕДЕНИЕ

Стремительное развитие РНК-терапии и достижения в этой области в последние годы, в том числе внедрение в клиническую практику высокоеффективных профилактических мРНК-вакцин, стало возможным во многом благодаря десятилетиям исследований липидных наночастиц (ЛНЧ) для доставки нуклеиновых кислот [1–3]. Липидные компоненты ЛНЧ с интегрированными молекулами мРНК (мРНК-ЛНЧ) обеспечивают за-

щиту молекул нуклеиновой кислоты от внеклеточных нуклеаз, транспорт наночастицы в клетку за счет эндоцитоза и последующий выход мРНК из эндосомы (фагосомы) в цитоплазму для осуществления трансляции и экспрессии белка с иммуногенными эпитопами. Ключевые и самые массовые компоненты липидной платформы РНК-ЛНЧ – ионизируемые липиды, положительно заряженные в условиях кислой среды, что позволяет компактизовать (конденсировать) молекулу РНК

Сокращения: Chol – холестерин; DMG-PEG2000 – 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль(2000); DSPC – 1,2-дистеарил-sn-глицеро-3-fosфохолин; GFP – зеленый флуоресцентный белок; MS-ESI – масс-спектрометрия с ионизацией распылением в электрическом поле; ЛНЧ – липидная наночастица; мРНК-ЛНЧ – ЛНЧ с интегрированной матричной РНК.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-66-01; эл. почта: elvod.ibch@yandex.ru; elvod@ibch.ru).

в ЛНЧ, но нейтральные при физиологическом значении pH, что сводит к минимуму токсичность итоговых наночастиц. Кроме того, ионизируемые липиды способны протонироваться в кислой среде эндосом и взаимодействовать с анионными фосфолипидами их мембранны с образованием конусообразных ионных пар, что способствует формированию небислойной гексагональной НП липидной фазы, дестабилизации мембранны и выходу РНК в цитозоль [4, 5]. В обзорах [1–3, 5] представлен большой ряд ионизируемых катионных липидов, предложенных для доставки нуклеиновых кислот. Общие элементы структуры в них – третичный алкиламин(ы) и остатки жирных кислот или жирных спиртов, в том числе разветвленных и ненасыщенных (так называемые “дendрипиды”). Такие структуры нехарактерны для природных липидов и создают потенциальные препятствия для функционирования липаз, что может приводить к образованию неэндогенных метаболитов и вызывать нежелательные эффекты, в том числе хроническую токсичность, в первую очередь гепатотоксичность [6, 7].

Целью настоящей работы был синтез нового ионизируемого катионного липида, который содержит только линейные алкильные фрагменты, и

получение на его основе ЛНЧ с мРНК модельного белка, способных осуществлять трансфекцию в культуре клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами предложена структура нового ионизируемого катионного липида на основе диглицеридного производного третичного алкиламина [8] (соединение An-1, схема 1). Диацилглицерины входят в состав липидных молекул организма человека и выступают естественными метаболитами.

Целевой ионизируемый липид An-1 получали по схеме 1. Синтез отличается экономичностью использования реагентов. Исходный солкеталь (I) широко применяется в различных отраслях промышленности, включая фармацевтическую, пищевую и топливную, а также в сельском хозяйстве. Солкеталь вводили в реакцию с 4-кратным избытком 1,5-дибромпентана в сухом DMF в присутствии эквивалентного количества NaH (в виде 60%-ной дисперсии в минеральном масле). Реакцию проводили в течение 3 ч при 60°C и далее 15 ч при комнатной температуре. Продукт реакции (II) выделяли хроматографией на силикагеле

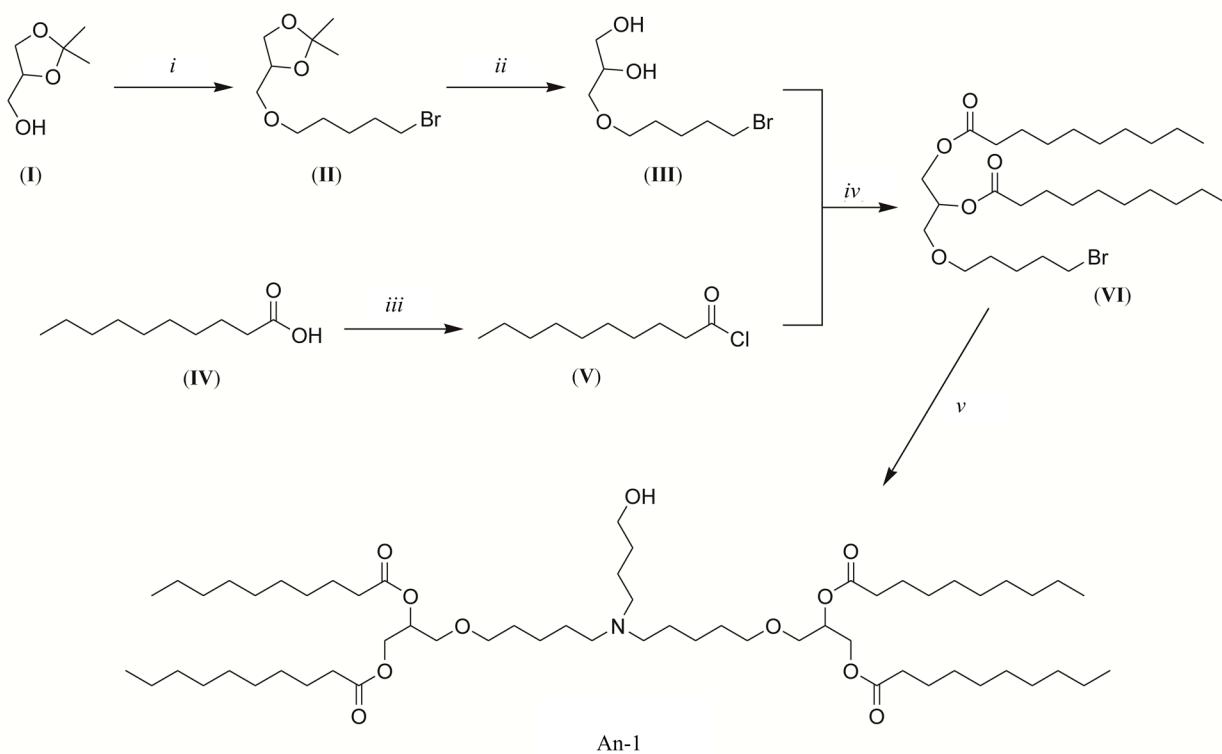


Схема 1. Синтез липида An-1: *i* – 1,5-дибромпентан, NaH, DMF; *ii* – HCl/THF; *iii* – изб. $\text{SOCl}_2/\text{Na}_2\text{CO}_3$, Δ .

с выходом 41%. При этом регенерация дибромпентана составила >50%. Изопропилиденовую защиту удаляли в кислой среде, после нейтрализации средыmonoалкилглицерин (**III**) экстрагировали этилацетатом; выход составил 71%. Из каприновой кислоты (**IV**) реакцией с тионилхлоридом получали каприноилхлорид (**V**) и вводили его в реакцию с соединением (**III**) в сухом хлороформе в присутствии пиридина при 0°C, затем выдерживали 10 ч при 40°C. Продукт диацилирования (**VI**) выделяли хроматографией на силикагеле с выходом 39%. Целевой продукт An-1 получали диалкилированием 1,4-бутаноламина алкилбромидом диацилглицерина (**VI**) при кипячении 4 ч в DMF в присутствии поташа; после хроматографии на силикагеле выход составил 18%. В дальнейшем предполагается оптимизировать условия очистки целевого продукта. Структуры соединений (**I–III**), (**VI**) и An-1 подтверждены спектрами ^1H -ЯМР. В масс-спектре целевого липида An-1 представлен молекулярный ион; чистоту продукта контролировали методом ВЭЖХ.

Для получения ЛНЧ с мРНК зеленого флуоресцентного белка (GFP) использовали компози-

цию липидов, аналогичную составу вакцины Pfizer/BioNTech против SARS-CoV-2, где базовый компонент – ионизируемый липид ALC-0315 [6, 9] (рис. 1a). Он составляет половину композиции и определяет оптимальную нагрузку РНК в наночастицу как отношение числа атомов N липида к числу атомов P нуклеиновой кислоты (N/P = 6). Остальные липиды выполняют вспомогательные функции: дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) структурирует ЛНЧ, в основном на поверхности; холестерин (Chol) заполняет промежутки между алкильными цепями и стабилизирует наночастицу, а также обеспечивает слияние мембран (благодаря формированию кубической фазы в смеси с фосфатидилхолином); ПЭГ-липид (DMG-PEG2000, компонент вакцины Moderna mRNA-1273) стабилизирует ЛНЧ с РНК как на стадии получения, так и в ходе циркуляции в кровотоке [10]. ЛНЧ с мРНК-GFP получали путем интенсивного смещивания микрообъемов водной (pH 4.0) и этанольной сред, содержащих РНК и липиды соответственно, с последующим диализом для удаления этанола и перевода в нейтральную среду. Параллельно получали образцы с липидами

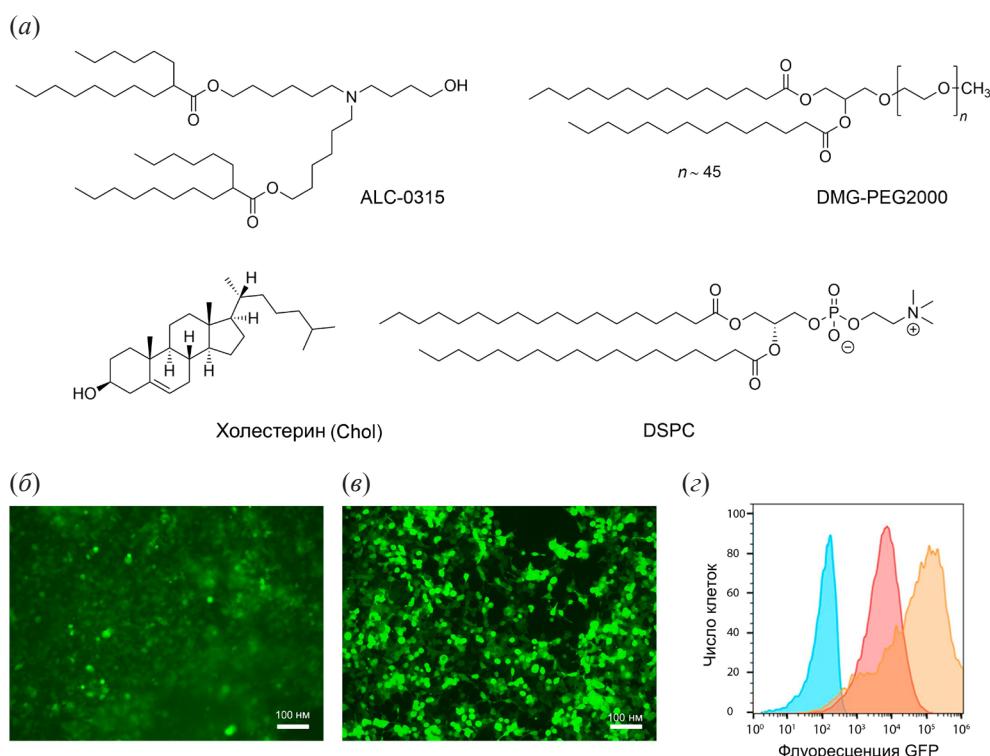


Рис. 1. (a) – Структурные формулы компонентов липидной платформы; (б, в) – экспрессия GFP через 36 ч инкубации клеток HEK293T с мРНК-ЛНЧ на основе An-1 или с реагентом Lipofectamine 3000 (в); (д) – гистограммы FACS-анализа уровня экспрессии GFP в трансфектантах после 36 ч инкубации с мРНК-ЛНЧ на основе An-1 (красная) или с Lipofectamine 3000 (оранжевая); интактные клетки отмечены голубым.

An-1 и ALC-0315 (в двух повторах каждый). По данным динамического светорассеяния, диаметр наночастиц составил 242 ± 5 и 252 ± 3.5 нм, индекс полидисперсности – 0.211 ± 0.014 и 0.128 ± 0.005 для образцов с An-1 и ALC-0315 соответственно. При применении микрофлюидной технологии смешивания для получения ЛНЧ такого же липидного состава с включением мРНК секрецируемой нанолюциферазы (NLuc) диаметр наночастиц не превышал 100 нм [8]. В настоящей работе для сравнительных экспериментов мы использовали экономичный упрощенный вариант, при котором микрообъем раствора РНК впрыскивается в микрообъем этанольного раствора липидов с последующим перемешиванием. С помощью конфокальной микроскопии иммобилизованных флуоресцентно-меченых мРНК-ЛНЧ показано, что до 70% наночастиц, получаемых таким способом, содержат РНК (при использовании микрофлюидики – до 90%) [11]. По данным измерения флуоресценции интеркалирующего красителя Ribo488 до и после разрушения наночастиц детергентом Tween 20 (применение этого детергента дает более точные результаты, чем применение Тритона X-100 [12]), эффективность включения мРНК в ЛНЧ составила 97 ± 1 и $94 \pm 3\%$ для образцов с An-1 и ALC-0315 соответственно.

Проверку функциональной активности ЛНЧ с мРНК-GFP проводили в культуре клеток эмбриональной почки человека HEK293T. Результаты оценки экспрессии белка после 36 ч инкубации (рис. 1 δ , ε) свидетельствуют о способности ЛНЧ с An-1 осуществлять трансфекцию. Неудивительно, что с помощью классического реагента Lipofectamine 3000 трансфекция прошла значительно более эффективно (рис. 1 δ), однако при этом клетки демонстрировали явные признаки токсичности, судя по их морфологии. Известно, что пегилирование наночастиц затрудняет их взаимодействие с клетками и выход из эндосомы [13]. ЛНЧ с ALC-0315 за этот период времени вообще не проявили активности, причем экспрессия белка не наблюдалась и через 72 ч инкубации. Отметим, что активность ЛНЧ аналогичного состава с мРНК-NLuc в отношении клеток той же линии также была выше в случае использования An-1 по сравнению с ALC-0315 [8]. Можно предположить, что облегченный гидролиз самого масштабного липида в составе ЛНЧ ускоряет “разборку” наночастицы в эндосоме, что способствует более быстрому выходу мРНК в цитоплазму.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали каприновую (декановую) кислоту, 1,5-дибромпентан, 4-амиnobутанол (Реахим, Россия); гидрид натрия 60%-ный в минеральном масле (Acros Organics, США); [(4-гидроксибутил)азандиил]ди(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканоат) (ALC-0315) и 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль(2000) (DMG-PEG2000) (BroadPharm, США; квалификация Reagent grade); 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC) и холестерин (Chol) (Lipoid GmbH, Heidelberg, Германия; квалификация USP (United States Pharmacopeia)); Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 и KH_2PO_4 квалификации ACS (Хеликон, Россия); остальные реагенты производства Sigma (США); растворители и соли (ООО “Химмед”, Россия). Растворители очищали стандартными методами. Растворы упаривали на роторном испарителе (Heidolph, Германия). Высушивание проводили в вакууме масляного насоса при 7 Па. ТСХ выполняли на пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия), проявление раствором родамина 6G в этаноле (оранжевые пятна веществ на розовом фоне при просматривании под УФ-лампой). Для колоночной хроматографии использовали силикагель КСКГ 0.063–0.2 мм (ООО “ХромЛаб”, Россия).

ВЭЖХ проводили с использованием хроматографической системы JETchrom (ПортЛаб, Россия), состоящей из двух насосов и динамического смесителя, инжектора Rheodyne 7125 (IDEX, США) и детектора светорассеяния Sedex-LC LT-ELSD (Sedere, Франция). Сбор и обработку хроматографических данных осуществляли при помощи программного обеспечения МультиХром, версия 3.4 (ООО “Амперсенд”, Россия). ^1H -ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Avance 800 (Bruker, США) с рабочей частотой 800 МГц при постоянной температуре образца 303 К. Растворитель – CDCl_3 . Химические сдвиги в спектрах ЯМР приведены в миллионных долях (м.д.), в качестве внутреннего стандарта использовали остаточные сигналы протонов растворителя (7.258 м.д.). Масс-спектр высокого разрешения (HRMS) регистрировали на спектрометре micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Германия) с ионизацией электрораспылением на базе ЦКП ИОХ РАН.

1,2-Изопропилиденглицерин (солкеталь) (I) получен реакцией 4.25 г глицерина с 1,1-диметоксиacetоном (9.6 г, 92.4 ммоль) в 20 мл метанола в

присутствии TsOH в качестве катализатора. Для удаления TsOH добавляли анионит Dowex 2×8-100, фильтрат упаривали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в градиентной системе гексан–этилацетат, выход 93%. ^1H -ЯМР (δ , м.д.; КССВ – J , Гц): 4.231 (м, 1H; CH-2 Gro), 4.031 (дд, J 8.3, 6.6, 1H; CH-1 Gro), 3.785 (дд, J 8.3, 6.5, 1H; CH'-1 Gro), 3.725 (ddd, J 11.7, 5.9, 3.7, 1H; CH-3 Gro), 3.586 (ddd, J 11.7, 6.6, 5.2, 1H; CH'-3 Gro), 1.921 (м, 1H; OH), 1.436 (с, 3H; CH₃), 1.368 (с, 3H; CH₃).

1,2-Изопропилиден-3-глицеропентилбромид (II). К смеси 1,5-дибромпентана (23.83 г, 103.6 ммоль) и солкеталя (3.42 г, 25.9 ммоль) в 45 мл сухого DMF присыпали порциями 1.04 г 60%-ной дисперсии NaH (25.9 ммоль). После прекращения выделения газа колбу закрывали хлоркальциевой трубкой и помещали на водяную баню при 60°C на 3 ч. Затем реакционную смесь выливали в воду и экстрагировали EtOAc (3 × 100 мл). Экстракт высушивали над Na₂SO₄, упаривали и хроматографировали на колонке с силикагелем (30 × 2.6 см) в градиентной системе гексан–этилацетат, контроль фракций TCX. Выход 3.015 г (41%). ^1H -ЯМР (δ , м.д.; КССВ – J , Гц): 4.255 (квинтет, J 6.1, 1H; CH-2 Gro), 4.053 (дд, J 8.3, 6.5, 1H; CH-1 Gro), 3.723 (дд, J 8.3, 6.4, 1H; CH'-1 Gro), 3.474 (м, 4H; CH₂-3 Gro и OCH₂ фрагмента C₅), 3.404 (т, J 6.9, 2H; CH₂Br), 1.871 (квинтет, J 7.2, 2H; CH₂ фрагмента), 1.606 (квинтет, J 6.9, 2H; CH₂ фрагмента C₅), 1.496 (м, 2H; CH₂ фрагмента C₅), 1.419 (с, 3H; CH₃), 1.360 (с, 3H; CH₃).

1-Глицеропентилбромид (III). К соединению (II) (3.02 г, 6.8 ммоль) в 30 мл THF добавляли 7.25 мл 4.6 н. раствора HCl и перемешивали 1 ч. Смесь нейтрализовали, постепенно добавляя водный раствор NaHCO₃, затем упаривали, добавляли воду и экстрагировали этилацетатом. Реакцию контролировали TCX (полная конверсия исходного вещества). Экстракт упаривали, остаток высушивали в вакууме. Выход 1.84 г (71%). ^1H -ЯМР (δ , м.д.; КССВ – J , Гц): 3.858 (м, 1H; CH-2 Gro), 3.711 (дд, J 11.4, 4.1, 1H; CH-1 Gro), 3.637 (дд, J 11.4, 5.3, 1H; CH'-1 Gro), 3.501 (м, 4H; CH₂-3 Gro и OCH₂ фрагмента C₅), 3.409 (т, J 6.6, 2H; CH₂Br), 2.611 (ущ. с, 1H; OH), 2.180 (ущ. с, 1H; OH), 1.879 (м, 2H; CH₂ фрагмента C₅), 1.608 (м, 2H; CH₂ фрагмента C₅), 1.507 (м, 2H; CH₂ фрагмента C₅).

Каприноилхлорид (V). Каприновую кислоту (IV) кипятили с избытком тионилхлорида (перегнан над льняным маслом) в присутствии прокаленного Na₂CO₃ в течение 30 мин. Избыток тионилхлорида упаривали, экстрагировали продукт сухим эфиром, фильтровали через целит и упаривали; выход 99%.

rac-1,2-Дикарбонил-3-глицеропентилбромид (VI). К 1.91 г (10 ммоль) соединения (V) в 10 мл сухого хлороформа при 0°C медленно прибавляли 0.93 г (3.8 ммоль)monoалкилглицерина (III) в 15 мл хлороформа с 1 мл пиридина (12.7 ммоль). Смесь выдерживали 3 ч при 0°C, затем 10 ч при 40°C; реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в петролейном эфире, фильтровали через целит, к фильтрату прибавляли сухой эфир и промывали последовательно холодной 2 н. H₂SO₄, водой, насыщенным раствором бикарбоната натрия и снова водой. Объединенные органические экстракты упаривали с бензолом до постоянного веса, остаток растворяли в петролейном эфире и наносили на колонку с силикагелем. Продукт (VI) выделяли в градиентной системе гексан–этилацетат–AcOH; контроль фракций TCX, проявление раствором фосфорно-молибденовой кислоты в этаноле; выход 0.818 г (39%). ^1H -ЯМР (δ , м.д.; КССВ – J , Гц): 5.194 (квинтет, J 5.3, 1H; CH-2 Gro), 4.324 (дд, J 12.0, 3.6, 1H; CH-1 Gro), 4.153 (дд, J 12.0, 6.4, 1H; CH'-1 Gro), 3.536 (м, 2H; CH₂-3 Gro), 3.464 (м, 1H; OCH фрагмента C₅), 3.433 (м, 1H; OCH' фрагмента C₅), 3.401 (т, J 6.9, 2H; CH₂Br), 2.309 (м, 4H; 2 COCH₂), 1.870 (квинтет, J 7.1, 2H; CH₂CH₂Br), 1.597 (м, 6H; 2 COCH₂CH₂ и CH₂ фрагмента C₅), 1.484 (квинтет, J 7.7, 2H; CH₂ фрагмента C₅), 1.281 (м, 24H; 12 CH₂), 0.878 (т, J 7.2, 6H; 2 CH₃).

[5-[1,2-Ди(деканоилокси)пропан-3-илокси]-пентил-(4-гидроксибутил)-амино]пентокси]-2-деканоиллоксипропил]деканоат (An-1). К раствору 0.69 г (1.25 ммоль) соединения (VI) в 6 мл DMF добавляли 0.5 экв. 1,4-бутаноламина и 1.1 экв. прокаленного мелкодисперсного K₂CO₃, кипятили при перемешивании 4 ч до появления слабой желтой окраски раствора. Добавляли воду и экстрагировали хлороформом. Органическую fazу промывали водой, сушили над MgSO₄ и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в градиентной системе хлороформ–изопропанол–AcOH; контроль фракций TCX, проявление фосфорномолибденовой кис-

лотой и нингидрином. Выход 117 мг (18%). ВЭЖХ выполняли на колонке Luna 5 мкм C8(2) 100 Å (Phenomenex, США) в системе растворителей: элюент А – 0.1%-ная ТФУ в смеси вода–метанол–ацетонитрил (15 : 30 : 55), элюент В – 0.1%-ная ТФУ в смеси ацетонитрил–метанол (60 : 80). Градиент элюента В в А: 0 – 100%/9 мин при скорости потока 1 мл/мин. ^1H -ЯМР (δ , м.д.; КССВ – J, Гц): 5.181 (м, 2H; 2 CH-2 Gro), 4.314 (dd, J 12.1, 3.5, 2H; 2 CH-1 Gro), 4.126 (dd, J 12.1, 6.6, 2H; 2 CH'-1 Gro), 3.695 (т, J 5.6, 2H; CH₂OH), 3.529 (dd, J 10.6, 5.4, 2H; 2 CH-3 Gro), 3.501 (dd, J 10.6, 5.3, 2H; 2 CH'-3 Gro), 3.455 (dt, J 9.2, 6.2, 6.2, 2H; 2 OCH фрагмента C₅), 3.416 (dt, J 9.2, 6.2, 6.2, 2H; 2 OCH' фрагмента C₅), 3.049 (м, 2H; CH₂N фрагмента C₄), 2.950 (м, 4H; 2 CH₂N фрагмента C₅), 2.299 (м, 8H; 4 COCH₂), 1.893 (квинтет, J 7.1, 2H; OCH₂CH₂ фрагмента C₄), 1.755 (м, 4H; 2 OCH₂CH₂ фрагмента C₅), 1.653 (квинтет, J 6.4, 2H; NCH₂CH₂ фрагмента C₄), 1.594 (м, 12H; 4 COCH₂CH₂), 1.390 (квинтет, J 7.7, 4H; 2 OCH₂CH₂CH₂ фрагмента C₅), 1.264 (м, 48H; 24 CH₂), 0.869 (т, J 7.0, 12H; 4 CH₃). MS-ESI: [M + H]⁺ рассчитано: 1026,8543; найдено: 1026.8534.

Получение липидных наночастиц с мРНК. Репортерная мРНК hMGFP содержала нетранслируемые области (untranslated regions, UTRs) с кэп-1-аналогом ((3'-OMe-m7G)-5'-ppp-5'-(2'-OMeA)pG)) (ООО “Биолабмикс”, Новосибирск), N1-метилпсевдоуридином (ООО “Биолабмикс”, Новосибирск) и хвостом поли-(A) в 110 нт, использованные ранее [14], синтез проводили с помощью набора mRNA-20 согласно протоколу производителя (ООО “Биолабмикс”, Новосибирск). В смесь липидов An-1–DSPC–Chol–DMG–PEG2000 или ALC-0315–DSPC–Chol–DMG–PEG2000 (46.3 : 9.4 : 42.7 : 1.6, мольн.) в 20 мкл этанола впрыскивали 60 мкл раствора мРНК-GFP (0.2 мг/мл) в 50 мМ натрий-цитратном буфере, pH 4.0, и интенсивно перемешивали. Каждый образец получали в двух повторах. Смеси диализовали 4 ч при 4С с использованием мембранны MWCO 10 кДа (Sigma, США) против 1000-кратного объема фосфатного буфера на физиологическом растворе, pH 7.4 (PBS). Размер наночастиц определяли методом динамического светорассеяния на установке Litesizer 500 (Anton Paar, GmbH, Австрия; полупроводниковый лазер, 658 нм, угол 90°), 3 цикла по 1 мин, измерения

проводили в разбавленных дисперсиях наночастиц (концентрация липидов ~50 мкг/мл PBS).

Для определения включения РНК в ЛНЧ выстраивали калибровочные графики флуоресценции красителя Ribo488 (набор ООО “Люмипроб РУС”, Россия) в растворах мРНК-GFP в присутствии 0.5% Tween 20 и смеси липидов в той же концентрации, что и в опытных образцах. Флуоресценцию растворов наночастиц до и после их солюбилизации детергентом измеряли с помощью планшетного ридера Hidex Sense Beta Plus (Hidex, Финляндия) при $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{исп}} = 480/520$ нм, каждая точка в двух повторностях. Эффективность включения РНК ($E, \%$) вычисляли по формуле:

$$E = \left(\frac{C_{\text{РНК}}(\text{Tween})}{C_{\text{РНК}}(\text{TE})} - 1 \right) \times 100,$$

где $C_{\text{РНК}}(\text{Tween})$ – концентрация РНК после разрушения наночастиц, $C_{\text{РНК}}(\text{TE})$ – концентрация РНК до разрушения наночастиц.

Трансфекция. Клетки HEK293T (коллекция ГНЦ ИБХ РАН) культивировали в среде DMEM, дополненной 10%-ной эмбриональной бычьей сывороткой, 2 мМ L-глутамином, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Перед проведением экспериментов культуру клеток тестировали на выявление контаминации микоплазмой с помощью набора Myco Real-Time (Евроген, Россия).

За день до трансфекции клетки рассевали в 24-луночный планшет (Corning Costar, США) в плотности 7×10^5 кл./мл. Через 24 ч в лунки вносили ЛНЧ (5 мкл), содержащие 0.5–1 мкг мРНК. Контрольную трансфекцию проводили с реагентом Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. На 1 мкг мРНК использовали 1 мкл Lipofectamine 3000. Через 36 ч инкубации детектировали флуоресценцию клеток на флуоресцентном микроскопе ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, США) при стандартных настройках (увеличение 175×) и проводили измерения на проточном цитометре LongCye C1040 (Challenbio, Китай). Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo v10.10 (FlowJo LLC, США). Эксперимент проводили в двух повторностях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика синтеза нового кationного ионизируемого липида An-1. Синтез отличается простотой и экономичностью применения реагентов. При использовании липидной платформы, аналогичной по составу вакцине Pfizer/Biontech, липид An-1 и липид Pfizer ALC-0315 формируют наночастицы, сходные по размерам и эффективности включения модельной мРНК. мРНК-ЛНЧ на основе липида An-1 более эффективно трансфицируют клетки в культуре по сравнению с наночастицами на основе липида ALC-0315. Ранее на мышной модели показана способность мРНК-ЛНЧ с липидом An-1 вызывать экспрессию модельного белка при внутривенном введении [8]. Для оценки биологических эффектов в организме необходимы дальнейшие эксперименты *in vivo*. Предполагается, что новый ионизируемый липид может найти применение в производстве мРНК-вакцин.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания № 124051400038-8. Конструирование и синтез мРНК проведены в рамках гранта Российского научного фонда № 22-75-10153.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – ЕЛВ, ИАБ; экспериментальные работы – КШГ, ЕВР, ДОК, ИИМ, ЕСЖ; написание статьи – ЕЛВ, КШГ, ДОК, ГАС; анализ данных – ЕВР, КШГ, ЕЛВ; администрирование проекта – ЕЛВ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cullis P.R., Felgner P.L. // Nat. Rev. Drug Discov. 2024. V. 23. P. 709–722.
<https://doi.org/10.1038/s41573-024-00977-6>
2. Han X., Mitchell M.J., Nie G. // Matter. 2020. V. 3. P. 1948–1975.
<https://doi.org/10.1016/j.matt.2020.09.020>
3. Han X., Zhang H., Butowska K., Swingle K.L., Alameh M.-G., Weissman D., Mitchell M.J. // Nat. Commun. 2021. V. 12. P. 7233.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-27493-0>
4. Semple S.C., Akinc A., Chen J., Sandhu A.P., Mui B.L., Cho C.K., Sah D.W., Stebbing D., Crosley E.J., Yaworski E., Hafez I.M., Dorkin J.R., Qin J., Lam K., Rajeev K.G., Wong K.F., Jeffs L.B., Nechev L., Eisenhardt M.L., Jayaraman M., Kazem M., Maier M.A., Srinivasulu M., Weinstein M.J., Chen Q., Alvarez R., Barros S.A., De S., Klimuk S.K., Borland T., Kosovrasti V., Cantley W.L., Tam Y.K., Manoharan M., Ciufolini M.A., Tracy M.A., de Fougerolles A., MacLachlan I., Cullis P.R., Madden T.D., Hope M.J. // Nat. Biotechnol. 2010. V. 28. P. 172–176.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1602>
5. Mrksich K., Padilla M.S., Mitchell M.J. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2024. V. 214. P. 115446.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2024.115446>
6. European Medicines Agency, Comirnaty Assessment Report. COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified).
https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf
7. Jørgensen A.M., Wibel R., Bernkop-Schnürch A. // Small. 2023. V. 19. P. 2206968.
<https://doi.org/10.1002/smll.202206968>
8. Болдырев И.А., Шендрюков В.П., Кислова С.О., Потешнова М.В., Андреев Д.Е., Рубцов Ю.П., Рубцова М.П., Водовозова Е.Л. // Патент RU2823298C1, 2024.
9. Schoenmaker L., Witzigmann D., Kulkarni J.A., Verbeke R., Kersten G., Jiskoot W., Crommelin D.J.A. // Int. J. Pharm. 2021. V. 601. P. 120586.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>
10. Cheng X., Lee R.J. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2016. V. 99. P. 129–137.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.022>
11. Münter R., Larsen J.B., Andresen T.L. // J. Colloid Interface Sci. 2024. V. 674. P. 139–144.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2024.06.158>
12. Schultz D., Münter R.D., Cantin A.M., Kempen P.J., Jahnke N., Andresen T.L., Simonsen J.B., Urquhart A.J. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2024. V. 205. P. 114571.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2024.114571>
13. Zalba S., Ten Hagen T.L.M., Burgui C., Garrido M.J. // J. Control. Release. 2022. V. 351. P. 22–36.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.09.002>
14. Fedorovskiy A.G., Antropov D.N., Dome A.S., Puchkov P.A., Makarova D.M., Konopleva M.V., Matveeva A.M., Panova E.A., Shmendel E.V., Maslov M.A., Dmitriev S.E., Stepanov G.A., Markov O.V. // Pharmaceutics. 2024. V. 16. P. 684.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16050684>

Ionizable Cationic Lipid for Intracellular RNA Delivery

K. S. Gaisin^{*, **}, E. V. Ryabukhina^{*}, D. O. Koroev^{*}, I. I. Mikhalyov^{*}, E. S. Zhuravlev ^{*},
G. A. Stepanov^{***}, I. A. Boldyrev^{****}, and E. L. Vodovozova^{*, #}**

[#]*Phone: +7 (495) 330-66-01; e-mail: elvod.ibch@yandex.ru; elvod@ibch.ru*

^{*}*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

^{**}*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia*

^{***}*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
prosp. Ak. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

^{****}*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences,
Leninsky prosp. 31, Moscow, 119071 Russia*

Ionizable lipids are a key component of the lipid nanoparticle platform for RNA therapy. They ensure the efficient assembly of a lipid–nucleic acid complex, protect it from premature degradation, and after endocytosis, promote the release of RNA into the cytoplasm for further processing. The paper describes the synthesis of a new ionizable cationic lipid that is a diglyceride derivative of tertiary alkylamine – [5-[1,2-di(decanoxyloxy)propane-3-iloxy]pentyl-(4-hydroxybutyl)-amino]penoxy]-2-decanoxyloxypropyl]-decanoate (An-1). The synthesis is characterized by the simplicity and cost-effectiveness of reagents. Comparative experiments with the well-known ionizable lipid ALC-0315 have shown that An-1 lipid forms lipid nanoparticles (LNPs) similar in size and incorporation efficiency of the model mRNA. LNPs with mRNA of the green fluorescent protein formulated with An-1 lipid transfected cells in culture more efficiently than LNPs formulated with ALC-0315 lipid. It is assumed that the new ionizable lipid can be used in the production of mRNA vaccines.

Keywords: *ionizable lipid, synthesis, lipid nanoparticles, mRNA*