**Дизайн стимул-чувствительной платформы доставки нуклеиновых кислот**

***Богатырева У.И.1, Козырев Н.А.2, Янковой М.В.2, Лопухов А.В.2, Клячко Н.Л.2***

*Студент, 2 курс магистратуры*

*1Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биотехнологический факультет, Москва, Россия*

*2 Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия*

*E-mail: bogatyreva.uliana@gmail.com*

Прорывы в биотехнологии и генной инженерии, такие как CRISPR-CAS, позволили лечить широкий спектр заболеваний, в том числе онкопатологии, муковисцидоз, гемофилию, нейродегенеративные заболевания. Показательным примером являются препараты на основе мРНК, используемые в период вспышки COVID-19 [1]. Однако широкомасштабное применение генной терапии сталкивается с рядом проблем, включая иммунные реакции, генотоксичность и цитотоксичность, ограничения по размеру переносимого генетического материала и сложность производства [2]. Для доставки нуклеиновой кислоты используются катионные полимеры и липиды, однако они демонстрируют заметную цитотоксичность.

В данной работе было решено исследовать трансфекцию линии клеток эмбриональных почек человека HEK293 с использованием композиции гомо- и блок-сополимеров на основе модифицированного полиаспартамида, которые обеспечат выход нуклеиновых кислот из эндосом благодаря эффекту протонной губки. Степень полимеризации составила 62 и 83 для блок-сополимера состава полиэтиленгликоль-поли{N-[N-(2-аминоэтил)-2-аминоэтил]аспартамид} и гомополимера поли{N-[N-(2-аминоэтил)-2-аминоэтил]аспартамида}, соответственно. Для снижения цитотоксичности и стабилизации комплекса использовалось введение ковалентных сшивок. В качестве сшивающего агента использовался дитиобиссульфосукцинимидил пропионат (DTSSP). Для трансфекции использовалась плазмидная ДНК pTurboGFP-C, кодирующая репортерный зеленый флуоресцентный белок.

Была продемонстрирована успешная трансфекция клеток с использованием блок-сополимера в качестве средства доставки. Продемонстрировано, что при варьировании соотношения числа первичных аминогрупп полимера к числу ортоэфирных групп нуклеиновой кислоты (параметра N/P) абсолютное значение флуоресценции лизата отличалось незначительно, однако удельная флуоресценция лизата на мг общего белка увеличивалась с ростом соотношения N/P. Можно сделать вывод о негативном влиянии высоких концентраций полимера на выживаемость клеток и синтез белка. Далее была изучена эффективность трансфекции с использованием композиции катионных носителей с добавлением сшивающего агента, теоретический процент сшивки первичных аминогрупп полимера составлял от 15 до 70%. Показано, что удельная флуоресценция лизата на содержание общего белка в клетке после трансфекции возрастает вместе с увеличением процента сшивки полиплексов. При оптимизации методики было продемонстрировано, что продолжительная инкубация при введении ковалентных сшивок является важным этапом стабилизации комплекса. Обнаружено, что увеличение процента сшивки полиплексов приводит к уменьшению содержания общего белка в клетках после трансфекции.

*Работа поддержана темой с гос. регистрацией 121041500039-8 и Программой развития МГУ.*

**Литература**

1. Mendes B.B., Conniot J., Avital A., Yao D., Jiang X., Zhou X., Sharf Pauker N., Xiao Y., Adir O. Nanodelivery of nucleic acids // Nat. Rev. Methods Primers. 2022. Vol. 2. P. 24.

2. Arabi F., Mansouri V., Ahmadbeigi N. Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview // Biomed Pharmacother. 2022. Vol. 153. P. 113324.