

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-79

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПОЛУЧЕНИЯ НЕВИРУСНЫХ НОСИТЕЛЕЙ мРНК НА ОСНОВЕ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ**DEVELOPMENT OF QUALITY CONTROL METHODS AND STANDARDIZATION OF PRODUCTION OF NON-VIRAL mRNA CARRIERS BASED ON LIPID NANOPARTICLES**

А. С. Иванов, Е. А. Корчевец, М. О. Неруш, Д. С. Кульчановская,
К. А. Гусев, Д. Н. Маймистов, Ю. М. Коцур, А. Р. Муслимов

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

A. S. Ivanov, E. A. Korchevets, M. O. Herush, D. S. Kulchanovskaya,
K. A. Gusev, D. N. Maymistov, J. M. Kotsur, A. R. Muslimov

Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University

✉artem.ivanov@pharminnotech.com

Аннотация

Применение продуктов на основе мРНК и липидных наночастиц требует строгого контроля качества критических параметров. Разработаны и частично валидированы методы контроля качества на этапах производства и доклинических исследований.

Abstract

The use of products based on mRNA and lipid nanoparticles requires strict quality control of critical parameters. Methods for quality control at the production and preclinical research stages have been developed and partially validated

Введение

Технологии модификации клеток на основе матричных РНК (мРНК) представляют значительный интерес в контексте создания платформенных решений в генной и клеточной терапии. Широкое клиническое внедрение требует контроля качества, включающего оценку активной фармацевтической субстанции и полупродуктов на различных этапах производства. Работа направлена на разработку методов контроля важнейших параметров качества и стандартизации на различных этапах: от синтеза мРНК методом *in vitro* транскрипции (IVT) до включения полученных нуклеиновых кислот в липидные наночастицы (ЛНЧ) и доклинических исследований *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Для отработки метода невирусной доставки была выбрана мРНК гена люциферазы (1943 п. н.), полученная в результате IVT с котранскрипционным экпированием и полиаденилированием. Параметрами контроля качества в контексте работы являлась оценка идентичности, чистоты, целостности синтезированного транскрипта, оценка посттранскрипционных изменений, оценка физико-химических показателей ЛНЧ, оценка эффективности инкапсуляции мРНК и исследование влияния комплекса мРНК-ЛНЧ на показатели жизнеспособности клеток. Идентичность синтезированной мРНК оценивалась с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующим анализом плавления с высоким разрешением (high-resolution melting — HRM). Для оценки чистоты и целостности мРНК применялись методы электрофорезов в денатурирующих агарозном (АГ) и полиакриламидном (ПААГ) гелях. Эффективность экпирования оценивалась при помощи изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в ПААГ в узком диапазоне pH, адаптированном под анализ НК. Исследование примесей было проведено при помощи ПЦР в реальном времени (РВ). Для оценки эффективности инкапсуляции мРНК, размерности и индекса полидисперсности ЛНЧ был использован метод динамического светорассеяния (Stunner, Unchained Labs). Для оценки эффективности инкапсуляции также применялись флуориметрический метод со специфическим красителем Ribo488 (Lumiprobe) и метод визуализационной полуколичественной оценки концентрации РНК по АГ-ЭФ. Цитотоксичность комплекса мРНК-ЛНЧ оценивалась с помощью теста метаболической активности с резазурином.

Результаты

Разработаны и частично валидированы методы контроля критических показателей мРНК и ЛНЧ. Идентичность транскрипта исходной ДНК-матрице была подтверждена HRM-анализом. Применение ПЦР-РВ для оценки нежелательных примесей показало полное их отсутствие. Применение АГ- и ПААГ-ЭФ продемонстрировало чистоту и целостность синтезированного транскрипта. Сравнение сходимости результатов оценки эффективности загрузки флуориметрическим методом, методом динамического светорассеяния и полуколичественным визуализационным методом по АГ-ЭФ продемонстрировало отсутствие статистически значимых различий ($p < 0,05$). По результатам теста с резазурином используемые комплексы мРНК-ЛНЧ показали отсутствие значимой цитотоксичности при использовании в рабочем диапазоне концентраций.

Выводы

Разработанные в ходе работы методы контроля качества мРНК после IVT и инкапсуляции в ЛНЧ позволяют контролировать ключевые показатели качества для дальнейшей оценки эффективности и безопасности применяемых комплексов мРНК-ЛНЧ в доклинических исследованиях, а также создают предпосылки для масштабирования производства лекарственных средств на основе мРНК и трансфера технологий.