

На правах рукописи

ШАРАБРИН СЕРГЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ мРНК-ВАКЦИН ПРОТИВ
ГРИППА И COVID-19**

1.5.3 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2024

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: **Карпенко Лариса Ивановна,**
доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты: **Коваль Ольга Александровна**
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук

Дейнеко Елена Викторовна
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук
Ведущая организация: ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «24» мая 2024 г. в 11-30 на заседании диссертационного совета 64.1.001.1 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент

Т.Н. Ильичева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одним из наиболее многообещающих подходов к созданию вакцин против заболеваний, вызванных высоковариабельными вирусами, является создание вакцин на основе нуклеиновых кислот. Среди них наиболее перспективными считаются вакцины на основе матричной РНК.

Серьезным недостатком мРНК-вакцин, мешавшим развитию данной платформы, была их нестабильность *in vivo*, в частности из-за активации системы врожденного иммунитета (Chen Y. et al., 2021). Решением этой проблемы стало использование модифицированных нуклеотидов, например псевдоуридина, предложенное Карико с соавторами (Kariko K. et al 2011). Именно псевдоуридин использовали в своих мРНК-вакцинах против COVID-19 компании Pfizer и Moderna. Модифицированные нуклеотиды в составе синтетической мРНК повышают ее стабильность и маскируют от распознавания Toll-подобными рецепторами (TLR), снижая активацию врожденного иммунитета.

Эффективность трансляции и стабильность мРНК можно значительно улучшить модификацией таких структурных элементов мРНК, как 5'-кэп, 3'-поли(А)хвост, 5'- и 3'-нетранслируемые области (НТО). Поэтому при разработке мРНК-вакцины, кодирующей конкретный ген, необходимо проводить оптимизацию вышеуказанных элементов (Adibzadeh S. et al., 2017, Cao J. et al., 2021).

Еще одна из задач, которую необходимо решить при получении мРНК *in vitro*, связана с тем, что в процессе синтеза мРНК могут образовываться примеси дцРНК, которые через активацию систем врожденного иммунитета могут снизить эффективность мРНК-вакцины. Использование сложных и дорогих методов ее очистки, таких как ВЭЖХ, применимо в лабораторных условиях, но для масштабирования процесса получения мРНК-вакцин необходим поиск более простых и экономичных способов.

При получении мРНК *in vitro* необходимо также учитывать доступность компонентов, необходимых для ее синтеза. Поэтому актуальной задачей является отработка методики синтеза мРНК-вакцины с использованием реактивов, производимых в РФ.

Разработка вакцин на основе технологии мРНК востребована для борьбы с такими заболеваниями, как COVID-19 и грипп. Она позволяет очень быстро перейти на выпуск массового производства новой вакцины с учетом актуальных штаммов вируса. Актуальность разработки новых эффективных вакцин против COVID-19 и гриппа связана с высокой вариабельностью вирусов, которые вызывают эти инфекции. мРНК-вакцины имеют преимущества перед стандартными технологиями получения вакцин для таких

инфекций. Низкая стоимость производства мРНК-вакцины по сравнению с другими технологиями и возможность быстро и легко заменять целевой ген в мРНК-вакцине, не меняя саму технологию производства, позволяет своевременно реагировать на появление новых штаммов вируса (Scorza F.B. et al., 2018).

Данная диссертационная работа направлена на решение вопросов, связанных с технологией получения мРНК-вакцин, и ее апробацию на примере разработки экспериментальных мРНК-вакцин против гриппа и COVID-19.

Цель данной диссертационной работы заключалась в получении экспериментальных мРНК-вакцин против гриппа, вызываемого вирусом гриппа A/California/4/2009 (H1N1)pdm09, и COVID-19, вызываемого вирусом SARS-CoV-2, штамм Wuhan-Hu-1, а также изучении их иммуногенных и протективных свойств.

Задачи исследования:

1) Синтезировать варианты мРНК-GFP, используя посттранскрипционный и котранскрипционный способ, сравнить эффективность их трансляции.

2) Сконструировать универсальные ДНК-матрицы для синтеза мРНК, несущие оптимизированные последовательности регуляторных нетранслируемых областей.

3) Разработать метод очистки препаратов мРНК от примесей дцРНК.

4) Получить экспериментальную мРНК-вакцину, кодирующую гемагглютинин вируса гриппа A/California/4/2009(H1N1)pdm09. Оценить ее иммуногенные и протективные свойства на модели лабораторных животных.

5) Получить экспериментальную мРНК-вакцину, кодирующую рецептор-связывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-COV-2, штамм Wuhan-Hu-1. Оценить ее иммуногенные и протективные свойства на модели лабораторных животных.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость работы. В рамках данного исследования разработан оригинальный протокол для лабораторного получения мРНК с использованием котранскрипционного способа копирования и полиаденилирования с добавлением AG-Cap аналога в реакционную смесь и использованием ДНК-матрицы с закодированным поли(А)хвостом соответственно. Разработанный протокол адаптирован для синтеза мРНК в одну стадию с использованием отечественной реagentной базы. Показано, что мРНК-GFP, полученная по данному протоколу, обеспечивает такой же уровень синтеза белка, как и мРНК, синтезированная посттранскрипционным методом. Полученные в работе данные демонстрируют преимущество котранскрипционного метода в сравнении с посттранскрипционным методом

получения мРНК, в котором необходимо проведение синтеза в несколько этапов с использованием ряда дорогостоящих ферментов.

Сконструированы три оригинальные плазмидные конструкции, содержавшие последовательности НТО из высокоэкспрессируемых генов: рVAX-C1, кодирующая 5'- и 3'-НТО α -глобина человека; рVAX-C2, содержащая 5'- и 3'-НТО альфа цепь цитохрома b-245 (CYBA); рVAX-C3, содержащая химерный 5'-НТО, разработанный компанией Moderna, и 3'-НТО β -глобина человека. Они позволяют проводить клонирование различных целевых генов в составе плазмиды для получения ДНК-матриц, предназначенных для синтеза мРНК *in vitro*, обеспечивающих высокий уровень синтеза белка в эукариотических клетках.

Разработана оригинальная методика очистки синтезированной мРНК *in vitro* с использованием целлюлозы, позволяющая эффективно удалять примеси дцРНК, возникающие в процессе синтеза. Данный метод легко масштабировать, и он не требует дорогостоящего оборудования.

С использованием разработанного протокола, включающего в себя синтез мРНК котранскрипционным способом, использование универсальных ДНК-матриц и очистку на целлюлозе, получены две экспериментальные мРНК-вакцины: одна из них против гриппа, вызываемого вирусом A/California/4/2009(H1N1)pdm09 и другая – против COVID-19, вызываемого вирусом SARS-CoV-2, штамм Wuhan-Hu-1. Полученные мРНК-вакцины продемонстрировали высокую иммуногенность и способность индуцировать формирование протективного иммунного ответа у лабораторных животных против соответствующих инфекций.

Предложенный в работе лабораторный протокол может быть использован для получения мРНК-вакцин против различных соматических и инфекционных заболеваний.

Методология и методы исследования. Работа выполнена с помощью общенаучных методов исследования и широкого спектра специальных методов, включая методы генетической инженерии, молекулярной биологии и иммунологии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. мРНК, полученная котранскрипционным способом с добавлением AG-Cap аналога в реакционную смесь и с использованием ДНК-матрицы, кодирующей поли(А)хвост, обладает такой же эффективностью, как и мРНК, полученная ферментативным способом кэпирования и полиаденилирования.

2. Плазмиды рVAX-C1, рVAX-C2 и рVAX-C3, содержащие НТО из различных высокоэкспрессируемых генов, могут использоваться для получения ДНК-матриц, предназначенных для синтеза мРНК *in vitro*, обеспечивающих высокий уровень синтеза белка в эукариотических клетках.

3. Предложенный метод очистки мРНК на целлюлозе приводит к удалению примесей дцРНК из препарата, наличие которых не обнаруживается моноклональными антителами к дцРНК.

4. Двукратная иммунизация мышей мРНК-С3-Н1, кодирующей белок гемагглютинина вируса гриппа А(Н1N1)рdm09, методом струйной инъекции приводит к индукции вирусспецифических и нейтрализующих антител, формирует клеточный иммунный ответ и обеспечивает 100 %-ную защиту при заражении летальной дозой вируса А/California/4/2009(Н1N1)рdm09.

5. Двукратная иммунизация мышей мРНК-С1-RBD, кодирующей рецептор-связывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2, методом струйной инъекции приводит к индукции вирусспецифических и нейтрализующих антител, формирует клеточный иммунный ответ и достоверно снижает вирусную нагрузку в тканях легких животных при заражении вирусом SARS-CoV-2 (Гамма-вариант) в сравнении с интактным контролем.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов подтверждена статистической обработкой полученных данных. Результаты всех экспериментов получены с использованием сертифицированного оборудования и современных молекулярно-биологических и иммунологических методов.

Результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции OpenBio (Кольцово, 2021 г.), XX научной конференции с международным участием «Молодежное научное творчество – эффективный путь подготовки медико-биологических кадров» (Бишкек, 2021 г.), международном онлайн-симпозиуме «Chronic viral infection and cancer, openings for vaccines» (онлайн, 2021 г.), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Взаимодействие науки и практики. Опыт и перспективы» (Екатеринбург, 2022), OpenBio (Кольцово, 2023 г.).

Результаты работы отражены в 6 публикациях в отечественных и зарубежных рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 20 тезисах докладов на всероссийских и международных конференциях. Получен патент РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 119 страницах, включает 46 рисунков и 5 таблиц. Список литературы содержит 210 источников.

Личный вклад автора. Все молекулярно-генетические работы, такие как ПЦР, клонирование, конструирование ДНК-матрицы, моделирование вторичной структуры мРНК, синтез мРНК, очистку мРНК от примесей дцРНК,

а также анализ результатов выполнены лично автором. Иммунизация животных, ИФА и ELISpot выполнены при участии автора или сотрудниками отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Все работы с живым вирусом проводились квалифицированными сотрудниками отделов коллекции микроорганизмов и зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Секвенирование образцов ДНК, кодирующих матрицы и целевые гены, проведены в центре коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Оценка чистоты мРНК на капиллярном электрофорезе проведена в Объединенном Центре геномных, протеомных и метаболомных исследований Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. Обзор литературы включает в себя несколько разделов и заключение. В первых разделах изложены общие сведения о вирусах гриппа и новом коронавирусе SARS-CoV-2. В следующих разделах рассматривается краткая история развития вакцин против гриппа и типы вакцины против гриппа и COVID-19 на текущий момент. Далее следует основной раздел, в котором подробно описывается мРНК-вакцина, ее структура, механизм работы, взаимодействие мРНК с системой врожденного иммунитета и способы доставки мРНК-вакцины. Далее рассматриваются разрабатываемые в мире мРНК-вакцины против гриппа и COVID-19.

Материалы и методы. Глава содержит описание материалов, использованных в работе, и методов молекулярной биологии, иммунологии и вирусологии (получение генно-инженерных конструкций, синтез мРНК *in vitro*, электрофорез белков и нуклеиновых кислот, ИФА, иммуноблоттинг, ELISpot, вируснейтрализация), методов работы с животными и культурами клеток млекопитающих, методов биоинформатического анализа (моделирование вторичных структур мРНК), методов статистической обработки результатов.

Результаты исследования и обсуждение результатов. Раздел «Результаты и их обсуждение» представлен в виде четырех частей, в которых изложены все полученных результаты, графики и рисунки. Первая часть посвящена конструированию ДНК-матриц и синтезу мРНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP). Вторая часть описывает разработанный способ очистки мРНК от примесей дцРНК. Третья и четвертая части посвящены конструированию и исследованию иммуногенности двух экспериментальных мРНК-вакцин. Первая вакцина – против гриппа, кодирующая полноразмерный гемагглютинин вируса гриппа A(H1N1)pdm09, вторая – против COVID-19, кодирующая рецептор-связывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2, штамм Wuhan-Hu-1.

Часть № 1. Конструирование ДНК-матриц для синтеза мРНК

Для получения синтетической мРНК-вакцины в первую очередь необходимо сконструировать ДНК-матрицу, так как именно с нее, под контролем промотора фага Т7, будет происходить синтез РНК с помощью ДНК-зависимой РНК полимеразы. В матрице закладываются все необходимые для эффективной работы мРНК элементы: генетическая последовательность белка-антигена, регуляторные 5'- и 3'-НТО и другие элементы. Перед стартовым кодоном, АТГ, необходимо встроить консенсусную последовательность Козака, GCCGCCACC, для направления преинициативного комплекса и рибосомы к месту инициации трансляции, обеспечивая трансляцию правильной последовательности белка.

Как уже было сказано, есть два основных подхода получения зрелой мРНК: первый – ферментативный, или посттранскрипционный, что означает присоединение кэпа и формирование поли(А)хвоста, после синтеза РНК с помощью отдельных ферментативных реакций; второй подход – котранскрипционный, в ходе которого получение кэпа и поли(А)хвоста происходят одновременно с синтезом мРНК.

Для получения мРНК котранскрипционным способом необходимо использовать химические аналоги кэпа, например, AG-Сар аналог, а для полиаденилирования – последовательность поли(А)хвоста необходимо встроить непосредственно в ДНК-матрицу.

Для использования AG-Сар аналога кэпа необходимо изменить стандартные после Т7 промотора иницирующие нуклеотиды GG, т.е. нуклеотиды, с которых начинается транскрипт РНК на вариант с AG (рис. 1). Это связано с тем, что AG-Сар аналог состоит из пары нуклеотидов, AG, где к аденину через 5'-5' связь уже присоединен Кэп. Поэтому необходимо, чтобы первые нуклеотиды в транскрипте после Т7 промотора были ему комплементарны.

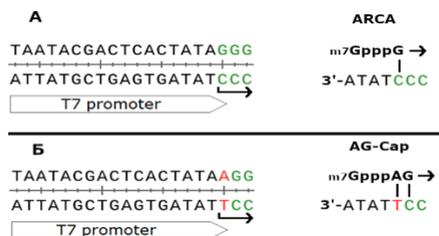


Рисунок 1. Изменение иницирующих нуклеотидов после Т7 промотора. А – стандартные нуклеотиды GG, Б – измененные нуклеотиды AG.

Как уже было сказано, для получения поли(А)хвоста непосредственно при синтезе РНК необходимо в матрицу на 5'-конце, то есть после 5'-НТО, встроить 100 остатков аденозина с включением внутреннего линкера из 10

случайных нуклеотидов, например 30(A)GCATATGACT70(A), для повышения стабильности плазмиды. Важным моментом является выбор сайта рестрикции для получения линейной ДНК. После поли(А) нами был встроены сайт рестрикции Bso31I, обеспечивающий гидролиз ДНК сбоку от сайта узнавания, непосредственно по поли(А)хвосту, чтобы транскрипт заканчивался аденином (рис. 2). Это необходимо для нормального функционирования поли(А)хвоста в мРНК.



Рисунок 2. Сайт рестрикции для получения линейной ДНК-матрицы.

Выбор нетранслируемых областей для повышения эффективности трансляции мРНК

С целью обеспечения более эффективной трансляции разрабатываемых мРНК-конструкций было решено включить в их состав 5'- и 3'-НТО. Проанализировав данные литературы, мы выбрали несколько нетранслируемых областей высокоэкспрессируемых и стабильных мРНК известных генов, а именно: 5'- и 3'-НТО из генов человеческого α -глобина и β -глобина, а также альфа цепи цитохрома b-245 (CYBA) (Yu J. et al., 2001, Ferizi M. et al., 2016). Кроме того, эти НТО использовались и в лицензированных мРНК-вакцинах против COVID-19: так, в мРНК-вакцине BNT162b2 (Pfizer) в качестве 5'-НТО использовалась природная последовательность α -глобина человека, а в вакцине mRNA-1273 (Moderna) использовалась химерная последовательность их собственной разработки. Поэтому было решено использовать вместо 5'-НТО β -глобина химерную последовательность Moderna (5-ChM), так как она и природная последовательность α -глобина человека показали свою эффективность в ходе использования мРНК-вакцин против COVID-19. В качестве 3'-НТО были использованы природные последовательности α - и β -глобина соответственно.

Таким образом, нами были сконструированы три плазмидные конструкции: pVAX-C1, содержащая 5'- и 3'-последовательности из гена α -глобина человека, pVAX-C2, содержащая 5'- и 3'-последовательности из гена альфа цепи цитохрома b-245 (CYBA), и pVAX-C3, содержащая в качестве 5'-НТО ChM и 3'-НТО последовательность из гена β -глобина человека. Кроме того, в конструкции были встроены элементы, необходимые для котранскрипционного синтеза мРНК.

Для оценки эффективности полученных конструкций в них был встроены ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) и были получены конструкции pVAX-C1-GFP, pVAX-C2-GFP и pVAX-C3-GFP.

Для синтеза мРНК использовали матрицы, полученные на основе следующих векторов: pVAX-C1-GFP, pVAX-C2-GFP и pVAX-C3-GFP. Матрицы линейризовали по сайту рестрикции Bso3I. Синтез проводили котранскрипционным способом. В реакционной смеси уридин был заменен на метилпсевдоуридин.

Оценку влияния НТО на эффективность трансляции проводили с помощью трансфекции клеток HEK293 мРНК-C1-GFP, мРНК-C2-GFP и мРНК-C3-GFP с последующим анализом синтеза зеленого флуоресцентного белка с помощью микроскопа. На рисунке 3 представлены микрофотографии клеток HEK293, трансфицированных мРНК-C1-GFP, мРНК-C2-GFP и мРНК-C3-GFP, и результаты проточной цитофлуориметрии.

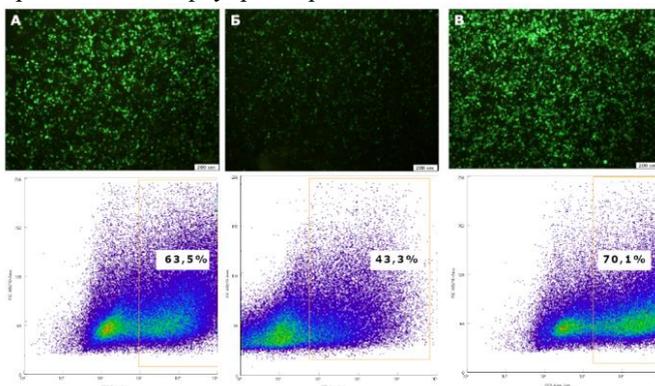


Рисунок 3. Оценки эффективности экспрессии мРНК-GFP на культуре клеток HEK293. Микрофотография клеток HEK293 и данные, полученные с помощью проточного цитофлуориметра. А – мРНК-C1-GFP, Б – мРНК-C2-GFP, В – мРНК-C3-GFP.

Наиболее высокий уровень синтеза белка был зарегистрирован в клетках, трансфицированных мРНК-C1-GFP (НТО α -глобина) и мРНК-C3-GFP (5'-НТО ChM и 3'-НТО β -глобина), 63,5% и 70,1 % светящихся клеток соответственно. Во втором варианте конструкции, мРНК-C2-GFP (НТО СУВА), результат составил 43,3 % светящихся клеток.

Часть № 2. Очистка мРНК от примесей дцРНК

Одним из технологических вопросов, которые приходится решать в процессе получения мРНК-вакцин *in vitro*, является удаление побочных abortивных продуктов реакции, в том числе примесей двуцепочечной РНК (дцРНК). Причиной появления таких нецелевых продуктов является побочная

неспецифическая активность T7-полимеразы (Dousis A. et al., 2023, Gholamalipour Y. et al., 2018), при которой короткие abortивные фрагменты РНК и 3'-конец полноразмерной РНК могут инициировать синтез комплементарной РНК из первичных транскриптов.

Примеси дцРНК в препарате мРНК-вакцины при введении в организм могут активировать ряд рецепторов дцРНК, например, Toll-подобный рецептор 3 (TLR3), тем самым снижая или полностью останавливая действие мРНК-вакцины (Karikó K. et al., 2011, Portal M.M. et al., 2015). Поэтому удаление дцРНК из синтезированной мРНК имеет важное значение для улучшения свойств мРНК-вакцин. Так, согласно требованиям European Medicines Agency (EMA), в препарате мРНК-вакцины против COVID-19 отсутствие дцРНК подтверждается с помощью иммуноблоттинга с моноклональными антителами к дцРНК, валидацией считается отрицательный сигнал в анализе.

Существует метод очистки (Baierdörfer M. et al., 2019), не требующий дорогостоящего оборудования, но позволяющий достаточно эффективно, на уровне ВЭЖХ, очищать мРНК от примесей дцРНК. Более того, его можно масштабировать, что важно для производства мРНК-вакцин. В оригинальном методе для очистки мРНК на целлюлозе предложена двухстадийная очистка с выходом очищенной мРНК около 80 %. На наш взгляд, недостаток данного метода – в длительной инкубации мРНК при комнатной температуре, что может привести к ее деградации. Мы увеличили концентрацию спирта в буфере, тем самым повышая сорбцию мРНК на целлюлозе. Это позволило проводить очистку в одну стадию с незначительными потерями мРНК.

Оценка очистки мРНК от примесей дцРНК *in vitro*

Для оценки эффективности очистки нами был проведен дот-блот анализ. На анализ брали 4 образца: мРНК до очистки, элюат дцРНК, очищенную мРНК и дцРНК дрожжей в качестве положительного контроля. С помощью дот-блот анализа мы показали, что антитела, специфичные к двуцепочечной РНК, выявляют ее наличие во всех фракциях, кроме очищенной мРНК (рис. 4).

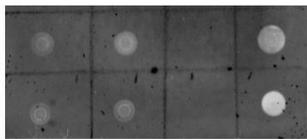


Рисунок 4. Дот-блот анализ фракций мРНК. Оценка эффективности очистки двух партий мРНК-GFP на целлюлозе с помощью антител к дцРНК. 1 – мРНК до очистки, 2 – элюат дцРНК, 3 – очищенная мРНК, 4 – положительный контроль, дцРНК.

Оценка очистки мРНК от примесей дцРНК *in vivo*

Для оценки эффективности очистки мРНК мы провели ряд экспериментов *in vivo* и *ex vivo*. В первую очередь мы оценили способность мРНК активировать систему врожденного иммунитета, путем определения уровня IFN- α в сыворотке мышей, после инъекции РНК разной степени очистки с

помощью ИФА набора для IFN- α мыши (Blue Gene). Как видно из рисунка 5А, мРНК до очистки и элюат дцРНК приводят к более высокой индукции IFN- α , в то время как очищенная мРНК практически не приводит к повышению уровня IFN- α в сыворотке мышей.

Качество очистки мРНК оценивали также по степени влияния растворов фракций на экспрессию раннего маркера активации лимфоцитов CD69, который является маркером воспалительного процесса. Результаты показали, что активация CD69 происходит при совместной инкубации лимфоцитов с неочищенной мРНК или с элюатом дцРНК. В случае очищенной мРНК активации CD69 не происходит, уровень экспрессии этого маркера соответствует контрольным значениям, полученным с лимфоцитами от интактных животных (рис. 5Б,В).

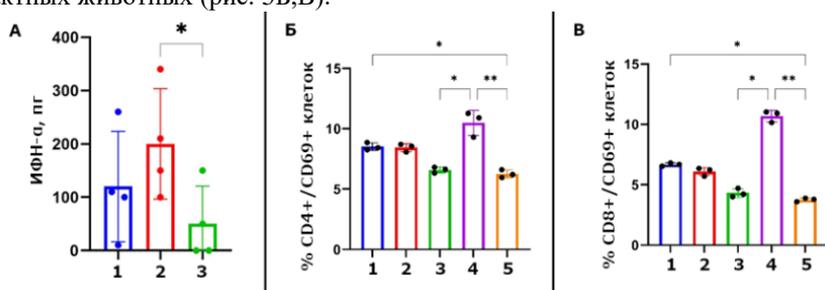


Рисунок 5. Оценка эффективности очистки мРНК *in vivo* и *ex vivo*. А. Индукция IFN- α фракциями мРНК у мышей линии BALB/c. 1 – мРНК до очистки, 2 – элюат дцРНК, 3 – очищенная мРНК (фоновый уровень IFN- α в сыворотке чистой мыши вычтен из экспериментальных образцов). Б. Результат активации CD4+ Т-лимфоцитов мышей после стимуляции мРНК. Представлено процентное содержание CD3+CD4+ Т-лимфоцитов, несущих маркер ранней активации CD69+. 1 – мРНК до очистки, 2 – элюат дцРНК, 3 – очищенная мРНК, 4 – положительный контроль, дцРНК, 5 – интактная мышь. В. Результат активации CD8+ Т-лимфоцитов мышей после стимуляции мРНК. Представлено процентное содержание CD3+CD8+ Т-лимфоцитов, несущих маркер ранней активации CD69+. 1 – мРНК до очистки, 2 – элюат дцРНК, 3 – очищенная мРНК, 4 – дцРНК, 5 – чистая мышь. Данные получены с помощью проточной цитометрии. Результаты выражены как медиана с диапазоном. Данные были проанализированы с использованием непараметрического критерия Краскала – Уоллиса (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Использованный нами модифицированный метод очистки позволяет получить препарат мРНК, свободный от примесей дцРНК, выход очищенного продукта составил около 70 %, а его целостность подтверждена на капиллярном электрофорезе. Отсутствие примесей дцРНК было подтверждено несколькими тестами, в том числе *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*. Следует отметить, что в соответствии с требованиями ЕМА доказательством отсутствия примесей дцРНК в препаратах мРНК является отсутствие сигнала в дот-блот

анализе, и, таким образом, чистота полученного в данной работе препарата мРНК соответствует стандарту ЕМА.

На основании всего вышесказанного мы предлагаем лабораторный протокол получения мРНК-вакцины, который включает следующие этапы:

1. Проведение необходимой оптимизации последовательности целевого гена.
2. Получение ДНК-матрицы, кодирующей целевой ген, поли(А)хвост длиной в 100 нуклеотидов, необходимые иницирующие нуклеотиды после Т7-промотора для использования AG-Car аналога и НТО из высокоэкспрессируемых генов.
3. Синтез мРНК *in vitro* котранскрипционным способом, с использованием сконструированной ДНК-матрицы, AG-car аналога и замены уридина на метилпсевдоуридин в реакционной смеси.
4. Очистка полученного препарата на целлюлозе от возможных примесей дцРНК.
5. Характеризация полученного препарата: оценка целостности мРНК с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле и подтверждение очистки от дцРНК с помощью дот-блот анализа с использованием моноклональных антител к дцРНК.

Предложенный лабораторный протокол использовался для получения экспериментальных мРНК-вакцин против гриппа и COVID-19. В работе использовались полученные конструкции рVAX-C1 и рVAX-C3. Для демонстрации универсальности полученных матриц они были случайным образом выбраны для конструирования мРНК-вакцин. Так, для мРНК-вакцины против гриппа была выбрана конструкция рVAX-C3, а для мРНК-вакцины против COVID-19 использовалась матрица рVAX-C1.

Часть № 3. Разработка экспериментальной мРНК-вакцины против гриппа

Экспериментальная мРНК-вакцина против гриппа разрабатывалась на модели сезонного вируса гриппа A/California/04/09 (H1N1)pdm09. В качестве антигена был выбран гемагглютинин вируса гриппа A(H1N1)pdm09 без трансмембранного и цитоплазматического домена, так как именно гемагглютинин считается основной целью для нейтрализующих антител, и он играет ключевую роль в процессе проникновения вируса гриппа в клетку.

Конструирование матрицы для синтеза мРНК-C3-H1

В качестве матрицы для конструирования мРНК-вакцины использовали плазмиду рVAX-C3, кодирующую последовательности СhМ и β-глобина человека. В качестве источника целевого гена для мРНК-вакцины использовалась плазида рVAX-H1, несущая оптимизированный ген

гемагглютини́на вируса гриппа A/California/04/09 (H1N1)pdm09 без трансмембранного и цитоплазматического домена, ранее полученная в отделе биоинженерии ГНЦ ВБ Вектор. Оптимизацию кодонного состава последовательности, необходимую для мРНК-вакцины, проводили с помощью программы GeneOptimizer.

Клонирование проводили по стандартной схеме. Для ПЦР использовались праймеры C3-N1-F и C3-N1-R, и плазида pVAX-N1. Встройку полученного фрагмента проводили в универсальную матрицу pVAX-C3 по сайтам рестрикции Psp124VI и BamHI. В результате была получена конструкция pVAX-C3-N1.

Синтез мРНК-C3-N1

Перед синтезом мРНК проводили наработку ДНК-матрицы в необходимых количествах, затем ее линеаризовали по сайту рестрикции Bso31I. Синтез мРНК проводили с помощью T7-полимеразы (БиолабМикс, Новосибирск), с добавлением AG-Cap аналога и метилпсевдоуридина. После синтеза проводили очистку от примесей дцРНК на порошке целлюлозе, согласно предложенному ранее способу.

Анализ трансляции мРНК-C3-N1 в трансфицированных клетках HEK-293

Для анализа трансляционной способности полученной мРНК-C3-N1, была проведена трансфекция культуры клеток HEK293. Вестерн-блот культуральной среды с использованием моноклональных антител к гемагглюнину подтвердил, что мРНК-C3-N1 обеспечивает синтез целевого вирусного белка в эукариотических клетках (рис. 6).

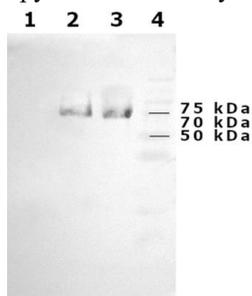


Рисунок 6. Результаты вестерн-блота культуральной среды клеток HEK293, трансфицированных мРНК-C3-N1. 1 – культуральная среда нетрансфицированных клеток HEK293 (отрицательный контроль), 2 – культуральная среда клеток HEK293, трансфицированных мРНК-N1, 3 – рекомбинантный белок N1 (положительный контроль), 4 – маркер Precision Plus Protein Dual Color Standards

Иммунизация лабораторных животных

Для доставки мРНК-вакцины был выбран метод струйной безыгольной инъекции «голой» мРНК в физиологическом растворе. Данный метод зарекомендовал себя для иммунизации ДНК-вакцинами (Dey A. et al., 2021, Kwilas S. et al., 2014), поэтому мы решили применить его для иммунизации животных мРНК-вакцинами. Для исследования иммуногенности мРНК-вакцины против гриппа были использованы мыши линии BALB/c (самки) массой 16-18 г. Эксперименты с животными проводили с соблюдением

принципов гуманности в соответствии с законодательством Российской Федерации, а также с протоколами, утвержденными Биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»/02-03.2023, Протокол БЭК №2 от 03.04.2023 г.). Было сформировано 3 группы по 15 животных в каждой. Иммунизацию мышей проводили внутримышечно в четырехглавую мышцу задней левой лапы дважды на 0 и 14 дни. Первой группе животных вводили 30 мкг мРНК-С3-Н1 в 50 мкл PBS с помощью струйной инъекции; второй группе животных в/м вводили коммерческую вакцину Флю-М (ФГУП СпбНИИВС ФМБА России, Россия, 2021 год) для положительного контроля; третьей группе вводили в/м 50 мкл физиологического раствора с помощью струйной инъекции. Через две недели проводили забор сывороток для анализа в ИФА и вируснейтрализации, на 29 день проводили ELISpot и интраназальное заражение дозой 20 МЛД₅₀ адаптированного к мышам штаммом вируса гриппа A/California/04/09 (H1N1)pdm09.

Оценка иммунного ответа

Сыворотки животных собирали на 28-й день эксперимента. Результаты ИФА показали, что титр Н1-специфических антител у мышей, иммунизированных мРНК-С3-Н1 и вакциной Флю-М, значительно превышает титр антител у мышей контрольной группы. При иммунизации мышей мРНК-вакциной средний титр антител, специфичных к рекомбинантному белку НА H1N1, составил около 1:460000, а при иммунизации коммерческой вакциной Флю-М около 1:83000 (рис. 7А). При использовании в ИФА в качестве антигена вакцины Флю-М, средний титр антител при иммунизации мРНК-С3-Н1 составил 1:21870, а при Флю-М – 1:196830 (рис. 7Б). Такая разница в титрах антител может быть вызвана антигенным несоответствием между НА H1N1 штамма вируса гриппа A/California/4/2009 (H1N1)pdm09 и штамма A/Victoria/2570/2019 (H1N1)pdm09, включенного в сезонную вакцину 2021-2022 гг.

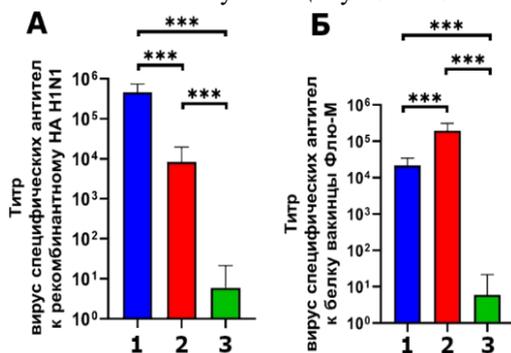


Рисунок 7. Титры специфических антител IgG в сыворотках иммунизированных мышей BALB/c (n=10). 1 – мРНК-С3-Н1, 2 – Флю-М, 3 – интактная группа. А. ИФА с

использованием в качестве антигена белка НА вируса гриппа H1N1. Б. ИФА с использованием в качестве антигена вакцины Флю-М. Результаты выражены как медиана с диапазоном. Данные были проанализированы с использованием непараметрических тестов. Достоверность была рассчитана с использованием непараметрического критерия Краскела — Уоллиса (*ns*, статистически недостоверно; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$).

Важным критерием эффективности вакцины является ее способность индуцировать антитела, способные нейтрализовать вирус. Сыворотки мышей, иммунизированных как мРНК-СЗ-Н1, так и вакциной Флю-М, продемонстрировали способность нейтрализовать A/California/04/09 (H1N1) MA8 в культуре клеток MDCK *in vitro* в реакции вирусной нейтрализации (рис. 8А) с использованием вируса A/California/4/2009 (H1N1)pdm09, средний титр составил 1:160 и 1:320 соответственно.

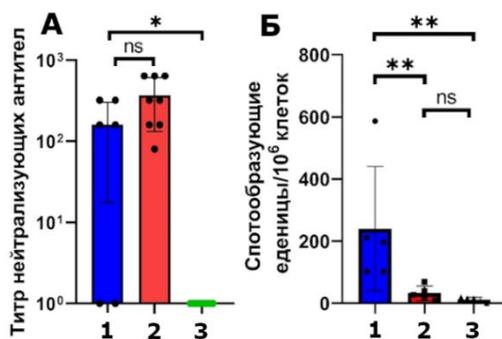


Рисунок 8. А. Вируснейтрализующая активность сывороток мышей, иммунизированных препаратами ($n=10$). 1 – мРНК-СЗ-Н1, 2 – Флю-М, 3 – интактная группа. Результаты выражены как медиана с диапазоном. Данные были проанализированы с использованием непараметрических тестов. Достоверность была рассчитана с использованием непараметрического анализа Манна-Уитни (*ns*, статистически недостоверно; * $p < 0,05$). Б. Оценка Т-клеточного иммунного ответа методом ELISpot ($n=5$). Число клеток, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов (по данным ELISpot). Каждый столбик представляет собой среднее число клеток, образующих пятна IFN- γ (SFC), на миллион стимулированных спленоцитов. Результаты выражены как медиана с диапазоном. Данные были проанализированы с использованием непараметрических тестов. Достоверность была рассчитана с использованием непараметрического анализа Манна-Уитни (*ns*, статистически недостоверно; ** $p < 0,01$).

Данные IFN- γ -ELISpot показали, что через 2 недели после второй иммунизации наблюдается формирование Т-клеточного иммунитета у мышей, иммунизированных мРНК-вакциной, который значительно превышал уровень ответа на коммерческую вакцину (рис. 8Б). Среднее количество Т-лимфоцитов, секретирующих IFN- γ , составляло 236 на 1 млн клеток. Значения в опытных группах достоверно отличались от контроля.

Способность мРНК-вакцины индуцировать защитный иммунитет изучалась на штамме адаптированного к мышам вируса гриппа A/California/4/2009 (H1N1)pdm09 (рис. 9). Защитное действие разработанной мРНК-вакцины было изучено при интраназальном заражении летальной дозой вируса (20 МЛД50). Мышей заражали на 29 день после иммунизации. Гибель фиксировали в течение 14 дней. На рисунке 9 приведены данные о выживаемости. Полученные результаты показали, что статистически значимый защитный эффект от летальной дозы вируса A/California/04/09 (H1N1)pdm09 был зарегистрирован в двух случаях – в группе мышей, иммунизированных мРНК-вакциной мРНК-С3-Н1 ($p < 0,0001$), и в группе мышей, иммунизированных коммерческой вакциной Флю-М ($p < 0,0001$). Коэффициент выживаемости составил 100 %.

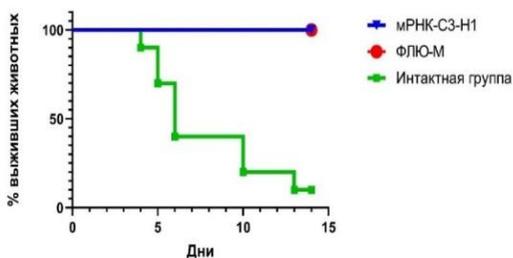


Рисунок 9. Выживаемость иммунизированных животных после летального заражения адаптированным к мышам вирусом гриппа A/California/4/09(H1N1)pdm09. Моделирование функции выживания проводили с помощью множительной оценки Каплана-Мейера, сравнение выживания – с контрольной группой с помощью критерия Мантеля-Кокса.

Таким образом, на данном этапе работы нами была сконструирована ДНК-матрица для синтеза экспериментальной мРНК-вакцины мРНК-С3-Н1, кодирующей полноразмерный гемагглютинин вируса гриппа H1N1, несущей регуляторные 5'-НТО ChM в 3'-НТО β -глобина человека. После синтеза мРНК ее работоспособность была проверена на культуре клеток HEK293. Лабораторные животные были иммунизированы двукратно с интервалом две недели методом струйной инъекции дозой 30 мкг мРНК-С3-Н1 в 50 мкл PBS. Результаты комплексного исследования иммунного ответа показали, что иммунизация мышей экспериментальной мРНК-вакциной стимулировала гуморальный иммунный ответ, средний титр антител против HA H1N1 составил 1:460000, а титр вируснейтрализующих антител – 1:160. Анализ клеточного иммунного ответа методом ELISpot у иммунизированных животных выявил активацию лимфоцитов при стимуляции их вирус-специфическими пептидами: среднее количество лимфоцитов, секретирующих IFN- γ составило 236 на 1 млн спленоцитов. Отсутствие T-

клеточного ответа в группе мышей, иммунизированных коммерческой вакциной Флю-М, может быть связано с несовпадением последовательностей пептидов, использованных для стимуляции лимфоцитов в методе ELISpot, либо же связано с низким уровнем формирования Т-клеточного иммунного ответа белковыми субъединичными вакцинами, которой является вакцина Флю-М. Исследование протективности мРНК-вакцины показало, что вакцина защищает животных от летального заражения штаммом вируса гриппа A/California/4/2009(H1N1)pdm09.

Часть № 4. Разработка экспериментальной мРНК-вакцины против COVID-19

В качестве модели для разработки экспериментальной мРНК-вакцины против COVID-19 нами был выбран вирус SARS-CoV-2, штамм Wuhan-Hu-1. Антигеном был выбран рецептор-связывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2, так как именно он является основной мишенью вируснейтрализующих антител, препятствующих проникновению вируса в клетку.

Конструирование матрицы для синтеза мРНК-C1-RBD

В разработке матрицы для мРНК-вакцины против COVID-19 нами использовалась конструкция pVAX-C1, содержащая последовательности НТО α -глобина человека. В качестве источника целевого гена была использована плаزمида pVAX-RBD, кодирующая RBD белка S SARS-CoV-2 штамм Wuhan-Hu-1, ранее полученная в отделе биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Боргоякова М.Б. и др., 2021).

Клонирование проводили с помощью ПЦР, использовались праймеры C1-RBD-F и C1-RBD-R, и плазмида pVAX-RBD. В результате была получена конструкция pVAX-C1-RBD.

Синтез мРНК-C1-RBD

Синтез мРНК проводили так же котранскрипционным способом, с учетом закодированного в матрицу поли(А)хвоста и с добавлением AG-Сар аналога и метилпсевдоуридина в реакционную смесь. После синтеза проводилась очистка мРНК от примесей дцРНК на целлюлозе.

Анализ экспрессии мРНК-C1-RBD в трансфицированных клетках НЕК-293

Для анализа работоспособности мРНК проводили трансфекцию культуры клеток НЕК293 мРНК-C1-RBD с помощью Lipofectamine MessengerMAX. Вестерн-блот культуральной среды трансфицированных клеток с мышинной сывороткой к RBD подтвердил, что мРНК-C1-RBD обеспечивает синтез целевого вирусного белка в эукариотических клетках (рис. 10).

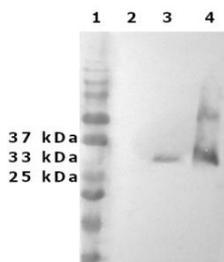


Рисунок 10. Результаты вестерн-блота культуральной среды клеток HEK293, трансфицированных мРНК-C1-RBD. 1 – маркер Precision Plus Protein Dual Color Standards, 2 – культуральная среда нетрансфицированных клеток HEK293 (отрицательный контроль), 3 – культуральная среда клеток, трансфицированных мРНК-C1-RBD, 4 – рекомбинантный белок RBD (положительный контроль).

Оценка иммунного ответа

Для иммунизации лабораторных животных использовали метод безыгольной струйной инъекции. Для исследования иммуногенности мРНК-вакцины против COVID-19 были использованы мыши линии BALB/c (самки) массой 16-18 г. Было сформировано 2 группы по 15 животных в каждой. Иммунизацию мышей проводили дважды на 0 и 14 дни. Первой группе животных вводили 30 мкг мРНК-C1-RBD в 50 мкл PBS, а второй группе 50 мкл PBS как отрицательный контроль. Через две недели проводили забор сывороток для анализа в ИФА и вируснейтрализации, на 35 день проводили ELISpot и интраназальное заражение дозой 50 ИД₅₀ штаммом вируса SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021.

На 30 день эксперимента у животных собирали сыворотку крови. ИФА сывороток животных показал наличие специфических антител к рекомбинантному белку RBD у мышей, иммунизированных мРНК-вакциной, со средним титром 1:230000, который статистически значимо отличался от значений титров в группе животных (рис. 11).

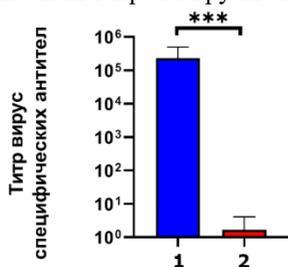


Рисунок 11. Титры специфических антител в сыворотках иммунизированных мышей BALB/c ($n=10$). В ИФА определяли титры специфических антител IgG к рекомбинантному белку RBD. Результаты выражены как медиана с диапазоном. Достоверность была рассчитана с использованием непараметрического анализа Манна-Уитни (***) $p < 0,001$.

Для защиты от вируса важно, чтобы антитела обладали вируснейтрализующей активностью. Оценка вируснейтрализации проводили в тесте как с живым вирусом, штамм вируса SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 (рис. 12А), так и с псевдотипированными лентивирусными частицами, несущими на своей поверхности S гликопротеин SARS-CoV-2 (рис. 12Б). Результаты показали, что средний титр нейтрализующих антител в первом случае составил 1:540, а во втором – 1:160.

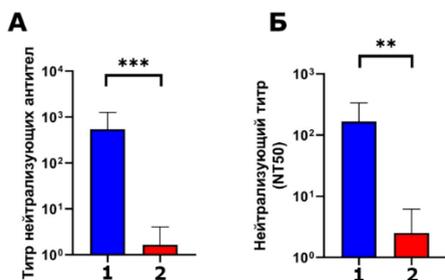


Рисунок 12. А. Вируснейтрализующая активность сывороток мышей. Две группы животных по 10 в каждой, 1 группа – мыши, иммунизированные мРНК-вакциной мРНК-С1-RBD, 2 группа – интактные мыши. А. Результаты вируснейтрализации с использованием штамма SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 (100 TCID₅₀). Б. Результаты вируснейтрализации с использованием псевдотипированных вирусов, несущих на своей поверхности S гликопротеин SARS-CoV-2. Результаты выражены как медиана с диапазоном. Достоверность была рассчитана с использованием непараметрического анализа Манна-Уитни (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Клеточный ответ анализировали с помощью метода ELISpot. Было показано, что количество спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию RBD-специфическими пептидами, в группе мРНК-С1-RBD в несколько раз превышало значение в отрицательном контроле (рис. 13). Среднее количество Т-лимфоцитов, секретирующих IFN- γ , составляло 437 на 1 млн клеток. В контрольных группах животных, иммунизированных физиологическим раствором, клеточный ответ был на уровне фона. Эти данные свидетельствуют о формировании специфического Т-клеточного иммунного ответа после иммунизации мышей экспериментальной мРНК-вакциной.

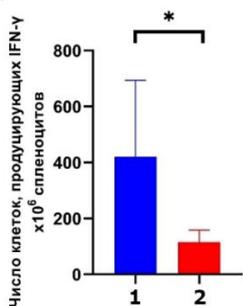


Рисунок 13. Оценка Т-клеточного иммунного ответа методом ELISpot ($n=5$). Число клеток, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов (по данным ELISpot). Каждый столбик представляет собой среднее число клеток, образующих пятна IFN- γ (SFC), на миллион стимулированных спленоцитов. Результаты выражены как медиана с диапазоном. Достоверность была рассчитана с использованием непараметрического анализа Манна-Уитни (* $p < 0,05$).

Анализ протективности мРНК-вакцины против COVID-19 оценивали в отношении Гамма-варианта вируса SARS-CoV-2. На 35 день эксперимента животных интраназально заражали дозой 50 ИД₅₀ (3,8 log₁₀ ЦПД₅₀) вируса SARS-CoV-2, штамм hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021. На 4-е сутки после заражения животных выводили из эксперимента и определяли вирусную нагрузку в 10 % гомогенатах легочной ткани методом ОТ-ПЦР в режиме

реального времени. Значения пороговых циклов (Ct) представлены в графическом виде на рисунке 14. Экспериментальная группа показала достоверное снижение вирусной нагрузки в легочной ткани животных, иммунизированных 30 мкг мРНК-C1-RBD, в сравнении с отрицательной группой.

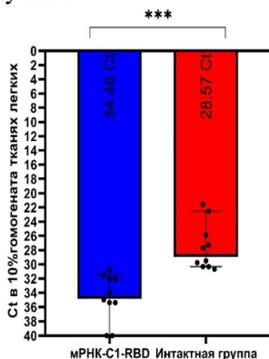


Рисунок 14. Вирусная нагрузка в тканях легких мышей BALB/c на 4-е сутки после заражения Гамма-вариантом SARS-CoV-2 (n=10). Индивидуальные значения Ct в ОТ-ПЦР реального времени представлены точками; медианы в группах – вершинами гистограмм, с указанием числовых значений Ct в основании гистограмм; границы 95 % доверительных интервалов отмечены вертикальными линиями. Статистический анализ проведен с использованием теста Манна-Уитни (***) $p < 0,001$).

Таким образом, на данном этапе работы нами была сконструирована ДНК-матрица для синтеза экспериментальной мРНК-вакцины мРНК-C1-RBD, кодирующая рецептор-связывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2 и несущая регуляторные НТО α -глобина. Работоспособность мРНК-вакцины на уровне трансляции продемонстрирована *in vitro* на культуре клеток НЕК293. Иммуногенность вакцины подтверждена в экспериментах по иммунизации лабораторных животных методом струйной инъекции в дозе 30 мкг в PBS. Наши результаты показывают, что иммунизация мышей экспериментальной мРНК-вакциной мРНК-C1-RBD стимулировала гуморальный иммунный ответ, средний титр антител составил 1:230000, в том числе нейтрализующих антител 1:560 в тесте с живым вирусом штамм SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 и 1:160 в тесте с псевдотипированными вирусами. Кроме того, мРНК-вакцина стимулировала высокий клеточный иммунный ответ, в тесте ELISpot среднее количество Т-лимфоцитов, секретирующих IFN- γ , составляло 437 на 1 млн клеток. В эксперименте с живым вирусом мРНК-вакцина обеспечивает частичную защиту животных от заражения Гамма-вариантом вируса SARS-CoV-2. Методом ОТ-ПЦР реального времени показано, что на 4-е сутки после заражения иммунизированных животных вирусная нагрузка в тканях легких ниже в сравнении с интактной группой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последнее несколько лет были достигнуты большие успехи в технологии получения мРНК-вакцин. Развитие платформы было стимулировано острой необходимостью быстрой разработки профилактических препаратов в ответ на пандемию COVID-19. Именно технология мРНК-вакцин позволила в

кратчайшие сроки создать эффективные и безопасные препараты для профилактики коронавируса. В общей сложности вакцинами против SARS-CoV-2 на основе мРНК вакцинировано около миллиарда человек во всем мире и показана их эффективность и относительная безвредность. Вакцины на основе мРНК представляют собой многообещающую платформу, которая отличается гибкостью, масштабируемостью, недорогим производством. В настоящее время Moderna и ряд других производителей ведут работы по замене отдельных «классических» вакцин мРНК-вакцинами.

В России на данный момент пока нет зарегистрированных мРНК-вакцин, однако несколькими научными коллективами ведутся активные работы по разработке и совершенствованию технологии этой вакцинной платформы.

В данной диссертационной работе решались вопросы как технологического плана, касающиеся отработки протокола получения мРНК с использованием отечественных реактивов, так и задачи, непосредственно связанные с конструированием экспериментальных мРНК-вакцин против гриппа и COVID-19 и исследованием их эффективности на модели лабораторных животных.

В результате проведенных исследований был разработан протокол, с помощью которого можно проводить синтез мРНК *in vitro* котранскрипционным способом в одну стадию с использованием линейаризованной ДНК-матрицы со встроенной поли(А) последовательностью и добавлением AG-Cap аналога в реакционную смесь. Сконструированы ДНК-матрицы, содержащие нетранслируемые области α -глобина и ChM/ β -глобина человека, позволяющие проводить клонирование различных целевых генов в их составе и получать мРНК, обеспечивающую высокий уровень синтеза белка в эукариотических клетках. Эффективность разработанного протокола первоначально протестирована на модели мРНК-GFP.

Важная часть работы была проведена по отработке протокола очистки мРНК. Предложенный модифицированный метод очистки синтезированной мРНК на целлюлозе эффективен для очистки от примесей дцРНК, и его легко масштабировать.

Успешность разработанного протокола синтеза мРНК была продемонстрирована на примере конструирования двух экспериментальных мРНК-вакцин. Одна из них – вакцина против гриппа, мРНК-C3-H1, кодирующая белок гемагглютинина вируса гриппа A(H1N1)pdm09, другая – вакцина против COVID-19, мРНК-C1-RBD, кодирующая рецептор-связывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2. Анализ иммуногенных свойств разработанных конструкций показал, что обе вакцины обеспечивают формирование протективного иммунитета у иммунизированных животных.

ВЫВОДЫ

1) Показано, что наиболее эффективным способом получения мРНК является одностадийный синтез с котранскрипционным копированием и полиаденилированием с добавлением AG-Сар аналога в реакционную смесь и с использованием ДНК-матрицы, кодирующей поли(А)хвост соответственно.

2) Сконструированы три универсальные ДНК-конструкции: рVAX-C1, содержащая НТО α -глобина человека; рVAX-C2, содержащая НТО СУВА, и рVAX-C3, содержащая НТО ChM β -глобина человека. Конструкции служат для получения ДНК-матриц, предназначенных для синтеза мРНК *in vitro*, обеспечивающих высокий уровень синтеза белка в эукариотических клетках.

3) Показано, что метод очистки синтезированной *in vitro* мРНК на целлюлозе позволяет получить препарат мРНК, свободный от примесей дцРНК. Очищенный препарат мРНК не содержит примесей, выявляемых антителами к дцРНК, не индуцирует повышенный выброс IFN- α при введении лабораторным животным и не вызывает активацию воспалительного маркера лимфоцитов CD69+ мышей.

4) Получена экспериментальная мРНК-вакцина мРНК-C3-H1, кодирующая белок гемагглютинина вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Показано, что иммунизация вакциной мышей линии BALB/c индуцирует синтез специфических антител, обладающих вируснейтрализующей активностью, формирование клеточного иммунного ответа и обеспечивает 100 %-ую защиту животных от летального заражения адаптированным к мышам вирусом гриппа A/California/7/2009 (H1N1)pdm09.

5) Получена экспериментальная мРНК-вакцина мРНК-C1-RBD, кодирующая рецептор-связывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2, штамм Wuhan-Hu-1. Показано, что иммунизация вакциной мышей линии BALB/c индуцирует выработку специфических антител, обладающих вируснейтрализующей активностью, формирование клеточного иммунного ответа и обеспечивает высокий уровень защиты от заражения вирусом SARS-CoV-2 (вариант гамма, P1). Показано достоверное снижение вирусной нагрузки в тканях легких мышей в сравнении с интактным контролем.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК

1. Ильичев А.А., Орлова Л. А. **Шарабрин С.В.** Карпенко Л.И. Технология мРНК как одна из перспективных платформ для разработки вакцины против SARS-COV-2 // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24(7). – С. 802-807. DOI: 10.18699/VJ20.676.
2. Karpenko L.I., Rudometov A.P., **Sharabrin S.V.** et al. Delivery of mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 Using a Polyglucin:Spermidine Conjugate // Vaccines. – 2021. – V. 9. – P. 76. DOI: 10.3390/vaccines9020076.
3. Starostina E. V., **Sharabrin S.V.** et al. Construction and Immunogenicity of Modified mRNA-Vaccine Variants Encoding Influenza Virus Antigens // Vaccines. – 2021. – V. 9. – №. 5. – P. 452. DOI: 10.3390/vaccines9050452.
4. Старостина Е.В., **Шарабрин С.В.**, Рудометов А.П. и др. Иммунный ответ на ДНК- и мРНК-вакцины, кодирующие искусственные иммуногены вируса гриппа // Российский иммунологический журнал. – 2022. – Т. 25. – № 3. – С. 321-326. DOI: 10.46235/1028-7221-1103-IRA.
5. **Шарабрин С.В.**, Бондарь А.А. и др. Удаление примесной дцРНК из препарата синтезированной матричным синтезом мРНК // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 176. – № 12. – С. 723-728. DOI: 10.47056/0365-9615-2023-176-12-723-728.
6. Кисаков Д.Н., Кисакова Л.А., **Шарабрин С.В.**, Яковлев В.А., Тигеева Е.В., Боргоякова М.Б., Старостина Е.В., Зайковская А.В., Рудометов А.П., Рудометова Н.Б., Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Доставка экспериментальной мРНК-вакцины, кодирующей RBD SARS-CoV-2 с помощью струйной инъекции // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 176. – № 12. – С. 723-728. DOI: 10.47056/0365-9615-2023-176-12-751-756.

Патент

Плазмидная ДНК-матрица рVAX-RBD, молекула мРНК-RBD, полученная с использованием ДНК-матрицы рVAX-RBD, обеспечивающая синтез и секрецию белка RBD SARS-CoV 2 в клетках организма млекопитающих и комплекс в виде наночастиц, содержащих молекулы мРНК-RBD, индуцирующих SARS-CoV-специфические антитела, обладающие вируснейтрализующей активностью. RU 2754230 С1 РФ. Заявка № 2021107796 от 23.03.2021 г., опубл. 30.08.2021, бюл. № 25. / Карпенко Л.И., Рудометов А.П., **Шарабрин С.В.**, Волосникова Е.А., Щербаков Д.Н., Боргоякова М.Б. и др.