

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

На правах рукописи

Шарабрин Сергей Валерьевич

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

1.5.3 Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Карпенко Лариса Ивановна**

Кольцово – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Вирус гриппа.....	12
1.2. Вирус SARS-CoV-2.....	14
1.3. История разработки вакцин от гриппа.....	16
1.4. Виды вакцин против гриппа на современном этапе	17
1.5 Разрабатываемые новые типы вакцин.....	19
1.6 Вакцины против COVID-19.....	22
1.7 мРНК-вакцины.....	23
1.7.1 Общие сведения.....	23
1.7.2 Структура мРНК-вакцины.....	26
1.7.2.1 Кэп.....	26
1.7.2.2 5'Нетранслируемый регион (5'НТО).....	30
1.7.2.3 Кодирующая область.....	31
1.7.2.4 3'Нетранслируемый регион (3'НТО).....	35
1.7.2.5 Поли(А)хвост.....	36
1.7.3 Механизм работы мРНК-вакцины.....	37
1.7.4 Взаимодействие мРНК с системой врожденного иммунитета.....	39
1.7.5 Доставка мРНК-вакцины.....	42
1.8 Разрабатываемые мРНК-вакцины против гриппа и COVID-19.....	45
1.9 Заключение по обзору литературы.....	46
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
2.1. Материалы	47
2.1.1. Плазмиды, штаммы бактерий, культуры клеток.....	47
2.1.2. Лабораторные животные.....	47
2.1.3. Олигонуклеотиды.....	48
2.1.4. Нуклеотидные последовательности нетранслируемых областей.....	49
2.1.5. Коммерческие наборы, ферменты и реактивы.....	50
2.1.6. Растворы и буферы.....	51
2.2. Методы.....	52
2.2.1. Получение ПЦР-продуктов для клонирования в плазмидный вектор pVAX, pVAX-C1, pVAX-C2, pVAX-C3 и др	52

2.2.2. Электрофоретический анализ плазмидной ДНК или мРНК в агарозном геле.....	53
2.2.3. Измерение концентрации нуклеиновых кислот.....	53
2.2.4. Получение ДНК-матриц для синтеза мРНК.....	53
2.2.5. Подготовка матрицы для синтеза мРНК.....	54
2.2.6. Синтез мРНК in vitro.....	54
2.2.7. Транфекция клеток НЕК293 мРНК-GFP.....	55
2.2.8. Электрофорез и иммуноблоттинг культуральной среды после трансфекции клеток мРНК.....	56
2.2.9. Моделирование вторичной структуры НТО мРНК.....	56
2.2.10. Очистка мРНК от примесей дцРНК.....	57
2.2.11. Анализ мРНК на биоанализаторе Agilent 2100 BioAnalyse.....	57
2.2.12. Дот-блот анализ дцРНК.....	57
2.2.13. Определение уровня IFN- α	58
2.2.14. Выделение спленоцитов.....	58
2.2.15. Определение маркера активации лимфоцитов CD 69.....	58
2.2.16. Иммунизация лабораторных животных для оценки эффективности экспериментальных мРНК вакцин	59
2.2.17. Иммуноферментный анализ.....	60
2.2.18. ELISpot.....	60
2.2.19. Реакция вируснейтрализации	61
2.2.20. Оценка защитной эффективности мРНК-вакцины против гриппа на инбредных мышах.....	61
2.2.21. Оценка защитной эффективности мРНК-вакцины против COVID-19 на инбредных мышах.....	62
2.2.22. Статистическая обработка результатов.....	62
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	63
3.1. Конструирование ДНК-матриц для синтеза мРНК.....	63
3.1.1. Кэпирование и полиаденилирование мРНК ферментативным способом.....	63
3.1.2. Кэпирование и полиаденилирование РНК котранскрипционным способом.....	66
3.1.3. Выбор нетранслируемых областей для повышения эффективности трансляции мРНК.....	70
3.1.3.1. Моделирование вторичной структуры НТО мРНК.....	71

3.1.3.2. Получение универсальных ДНК-матриц для синтеза мРНК.....	77
3.2. Очистка мРНК от примесей дцРНК.....	80
3.2.1. Оценка очистки мРНК от примесей дцРНК <i>in vitro</i>	82
3.2.2. Оценка очистки мРНК от примесей дцРНК <i>in vivo</i>	84
3.3. Разработка экспериментальной мРНК-вакцины против гриппа.....	86
3.3.1. Конструирование матрицы для синтеза мРНК-С3-Н1.....	86
3.3.2. Синтез мРНК-С3-Н1.....	87
3.3.3. Анализ трансляции мРНК-С3-Н1 в трансфицированных клетках НЕК-293.....	87
3.3.4. Иммунизация лабораторных животных.....	88
3.3.5. Оценка иммунного ответа.....	89
3.4. Разработка экспериментальной мРНК-вакцины против COVID-19.....	94
3.4.1. Конструирование матрицы для синтеза мРНК-С1-RBD.....	94
3.4.2. Синтез мРНК-С1-RBD.....	95
3.4.3. Анализ экспрессии мРНК-С1-RBD в трансфицированных клетках НЕК-293.....	95
3.4.4. Оценка иммунного ответа.....	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
ВЫВОДЫ.....	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	105

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ARCA - Anti-Reverse Cap Analog / Антиреверсный аналог кэпа;
- BSA – бычий сывороточный альбумин;
- CD – кластер дифференцировки;
- ChM – Химерная последовательность Moderna;
- CYBA – альфа цепь цитохрома b-245;
- eEF – эукариотический фактор элонгации;
- eIF – эукариотический фактор инициации трансляции;
- ELISpot – Enzyme-Linked ImmunoSpot;
- EMA – European Medicines Agency / Европейское агентство лекарственных средств;
- FBS – фетальная бычья сыворотка;
- GFP – зелёный флуоресцентный белок;
- HA – гемагглютинин;
- HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота);
- ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses / Международный комитет по таксономии вирусов;
- IFN – интерферон;
- IIV – Inactivated Influenza Vaccine / инактивированные противогриппозные вакцины;
- IRES – внутренний сайт посадки рибосомы;
- LAIV – Live Attenuated Influenza Vaccine / живые аттенуированные противогриппозные вакцины;
- m1Ψ – N1-метилпсевдоуридин;
- m5C – 5-метилцитидин;
- m6A – N6-метиладенозин;
- MDCK – клетки почек собаки Мадина-Дарби;
- MFE – минимальная энергия сворачивания;
- МЛД50 – мышьяная полумлетальная доза;
- NA – нейраминидаза;
- PAVP – поли(A)-связывающий белок;
- PAMP – патоген-ассоциированный молекулярный паттерн;
- PBST – фосфатно-солевой буфер с твином;
- PIC – преинициаторный комплекс;
- PKR – РНК-зависимая протеинкиназа;
- PRR – рецептор распознавания паттернов;
- QIV – четырехвалентные инактивированные вакцины;

RBD – рецептор-связывающий домен;
RIG-1 – retinoic acid-inducible gene / ген индуцируемый ретиноевой кислотой;
RNP – рибонуклеопротеин;
SARS – тяжёлый острый респираторный синдром;
SDS-ПААГ – Электрофорез белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия;
TIV – трехвалентные инактивированные вакцины;
TLR – toll Like Receptor / toll-подобный рецептор;
VCE – вирус коровьей оспы;
Ψ – псевдоуридин;
АПК – антиген-презентирующие клетки;
АТФ – (АТР) – аденозинтрифосфат;
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;
ВПЧ – вирусоподобные частицы;
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
ГТФ – (GTP) – гуанозинтрифосфат;
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
дцРНК – двуцепочечная рибонуклеиновая кислота;
ИД50 – 50%-я инфицирующая доза;
ИФА – иммуноферментный анализ;
ЛНЧ – липидные наночастицы;
МНС – главный комплекс гистосовместимости;
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;
НТО – нетранслируемая область;
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;
оцРНК – одноцепочечная РНК;
ПЦР – полимеразная цепная реакция;
ПЭГ – полиэтиленгликоль;
РКЭ – развивающиеся куриные эмбрионы;
рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота;
СК – сиаловая кислота;
ТМВ – тетраметилбензидин гидрохлорид;
тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота;
УТФ – (UTP) – уридинтрифосфат;
ЦПД50 – 50%-я цитопатическая доза;
ЦТФ – (CTP) – цитозинтрифосфат;

ВВЕДЕНИЕ

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. Ряд особенностей отличает их от других вакцинных платформ. Например, в отличие от белковых и инактивированных вакцин, они способны активировать оба звена иммунитета, как клеточный, так и гуморальный. Так как их получают простым ферментативным синтезом *in vitro*, производство мРНК-вакцин относительно недорого и его легко масштабировать. В отличие от ДНК-вакцин, для мРНК не требуется проникновения в ядро клетки для обеспечения экспрессии целевого гена; мРНК-вакцина не способна интегрироваться в геном хозяина, благодаря чему устраняется риск, связанный с онкогенезом [1, 2].

Во время пандемии COVID-19 в 2020 году были одобрены к экстренному применению первые мРНК-вакцины. Американские разработчики мРНК-вакцины против COVID-19 (компания Moderna Inc. совместно с NIAID) создали прототип вакцины мРНК-1273 примерно за полтора-два месяца. На сегодняшний день, вакцинами мРНК-1273 (Moderna Inc) и BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) уже привито сотни миллионов человек, и вакцины продемонстрировали безопасность и высокую эффективность [3, 4, 5].

Серьезным недостатком мРНК вакцин, мешавшим развитию данной платформы, была их нестабильность *in vivo*, в частности из-за активации системы врождённого иммунитета [6]. Решением этой проблемы стало использование модифицированных нуклеотидов, например псевдоуридина, предложенное Карико с соавторами [7]. 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 [8, 9].

Еще одной из задач, которую необходимо решить при получении мРНК *in vitro*, связана с тем, что в процессе её синтеза могут образовываться примеси дцРНК, которые через активацию систем врождённого 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.

COVID-19, вызванный вирусом SARS-CoV-2, появился в конце 2019 года и за 4 года успел закрепиться в популяции и заразить более 700 млн. человек [10]. Из-за быстрой изменчивости поверхностного белка S, на сегодняшний день уже выделено более 10 линий штаммов коронавируса, которые обладают разной трансмиссивностью и вирулентностью [11]. SARS-CoV-2 является относительно новым человеческим вирусом, который продолжает развиваться и приобретать новые свойства.

Сезонные вирусы гриппа А и В, вызывающие около 3–5 миллионов тяжелых случаев заболевания в год и до 600 тыс. случаев летальных исходов во всем мире, представляют собой серьезную опасность для общественного здравоохранения [12]. Постоянный антигенный дрейф циркулирующих вирусов гриппа приводит к тому, что сезонные вакцины против гриппа становятся неэффективными и возникает необходимость ежегодного перевыпуска таких вакцин. мРНК-вакцины в данном случае имеют преимущества перед стандартными технологиями получения гриппозных вакцин. Низкая стоимость производства мРНК-вакцины в сравнении с «обычной» расщепленной субъединичной вакциной, наработанной на РКЭ и возможность быстро и легко заменять целевой ген в мРНК-вакцине, не меняя саму технологию производства, позволяет своевременно реагировать на появление новых штаммов вируса [13].

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

Цель исследования

Цель данной диссертационной работы являлось в получении экспериментальных мРНК вакцин против гриппа, вызываемого вирусом гриппа A/California/4/2009(H1N1pdm09), 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(H1N1pdm09). Оценить её 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 её иммуногенные и протективные свойства на модели лабораторных животных.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость

В рамках данного исследования разработан оригинальный протокол для лабораторного получения мРНК с использованием котранскрипционного способа кэпирования и полиаденилирования с добавлением AG-Cap аналога в реакционную смесь и 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: pVAX-C1, кодирующая 5'- и 3'-НТО α -глобина человека; pVAX-C2, содержащая 5'- и 3'-НТО альфа цепь цитохрома b-245 (CYBA); pVAX-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(H1N1pdm09) 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.

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

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 pVAX-C1, pVAX-C2 и pVAX-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-C3-H1, кодирующей белок гемагглютинаина вируса гриппа A(H1N1)pdm09, методом струйной инъекции приводит к индукции вирусспецифических и нейтрализующих антител, формирует клеточный иммунный ответ и обеспечивает 100 %-ную защиту при заражении летальной дозой вируса A/California/4/2009(H1N1pdm09).

5. Двукратная иммунизация мышей мРНК-C1-RBD, кодирующей рецептор связывающих 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 «Молодёжное 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 тезисов 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 таблицы. Список литературы содержит 210 литературных 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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Вирус гриппа

Вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae*. Они представляют собой вирионы, покрытых липидной оболочкой, несущей в своем составе поверхностные белки гемагглютинин и нейраминидазу. В икосаэдрическом белковом капсиде вируса упакована сегментированная вирусная РНК, отрицательной направленности [14]. Согласно таксономии вирусов 2022 года, семейство состоит из девяти родов: *Alphainfluenzavirus* (вид *Alphainfluenzavirus influenzae*), *Betainfluenzavirus* (вид *Betainfluenzavirus influenzae*), *Deltainfluenzavirus* (вид *Deltainfluenzavirus influenzae*), *Gammmainfluenzavirus* (вид *Gammmainfluenzavirus influenzae*) (соответствуют прежним родам А, В, С, D), а также родов *Isavirus*, *Mykissvirus*, *Quaranjavirus*, *Sardinovirus* и *Thogotovirus* [15].

Ежегодно вирус гриппа вызывает миллионы заболеваний и сотни тысяч смертей во всем мире. Грипп — это инфекционное респираторное заболевание, обычно вызываемое у людей вирусами гриппа Alpha и Beta, реже Gamma (вирусы гриппа А, В и С, согласно старой номенклатуре). Как правило, грипп характеризуется ежегодными сезонными эпидемиями, а спорадические пандемические вспышки связаны со штаммами вируса гриппа Alpha зоонозного происхождения. Пандемия гриппа происходит каждые 10–50 лет и характеризуется введением в человеческую популяцию нового штамма вируса гриппа А, который по антигенному составу сильно отличается от ранее циркулировавших штаммов; отсутствие ранее существовавшего иммунитета у человека часто связано с тяжестью инфекции и увеличением смертности [14].

Вирусы гриппа типа А являются наиболее вирулентными для человека и могут вызывать тяжелое респираторное заболевание или смерть. Именно вирусы этого типа имеют высокий пандемический потенциал. Вирусы гриппа типа В также вызывают эпидемии сезонного гриппа у людей. В человеческой популяции ранее циркулировали две генетические линии гриппа В, В/Yamagata и В/Victoria, которые были включены в вакцины против сезонного гриппа [16]. Однако с 2019 года циркулирует только одна линия, В/Victoria. Вирусы гриппа типа С обычно вызывают легкое течение заболевания и не приводит к эпидемиям.

Вирус имеет отрицательный геном одноцепочечной РНК (оцРНК), который разделен на восемь (вирусы гриппа А и В) или семь (вирус гриппа С) отдельных сегментов [17]. Сегментированная природа вирусного генома обеспечивает реассортацию, то есть обмен сегментами геномной РНК, когда два вируса одного и того же типа (то есть два вируса гриппа А или два вируса гриппа В) инфицируют одну и ту же клетку.

Уникальной особенностью вирусов гриппа А является то, что они циркулируют не только у человека, но и у домашних животных, свиней, лошадей и домашней птицы, а также у диких перелетных птиц, которые считаются естественными резервуарами.

Вирусы гриппа типа А и В неразличимы по форме при просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Они имеют сферическую или нитевидную форму диаметром около 100 нм для сферических структур и часто более 300 нм в длину для нитевидной формы [18].

Вирион гриппа А несет на своей поверхности гликопротеины гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA) (рис. 1). Каждая вирусная частица имеет средний размер около 120 нм и несёт примерно 300–400 молекул HA и 40–50 NA на липидной мембране, хотя содержание каждого белка варьирует между различными подтипами [19]. Кроме выше названных белков, на поверхности вириона имеется небольшое количество трансмембранных ионных каналов, сформированных белком M2 [20]. Липидная оболочка и три ее белка (HA, NA и M2) покрывают матричный белок, называемый M1, который окружает ядро вириона. Внутренняя часть вириона содержит белок NP, ранее называвшийся неструктурным белком 2 (NS2), и рибонуклеопротеиновый (RNP) комплекс, который включает сегменты РНК, упакованные белком нуклеопротеином (NP), а РНК-зависимая РНК-полимераза состоит из трёх субъединиц: двух основных полимераз (PB1 и PB2) и одной кислой полимеразы (PA).

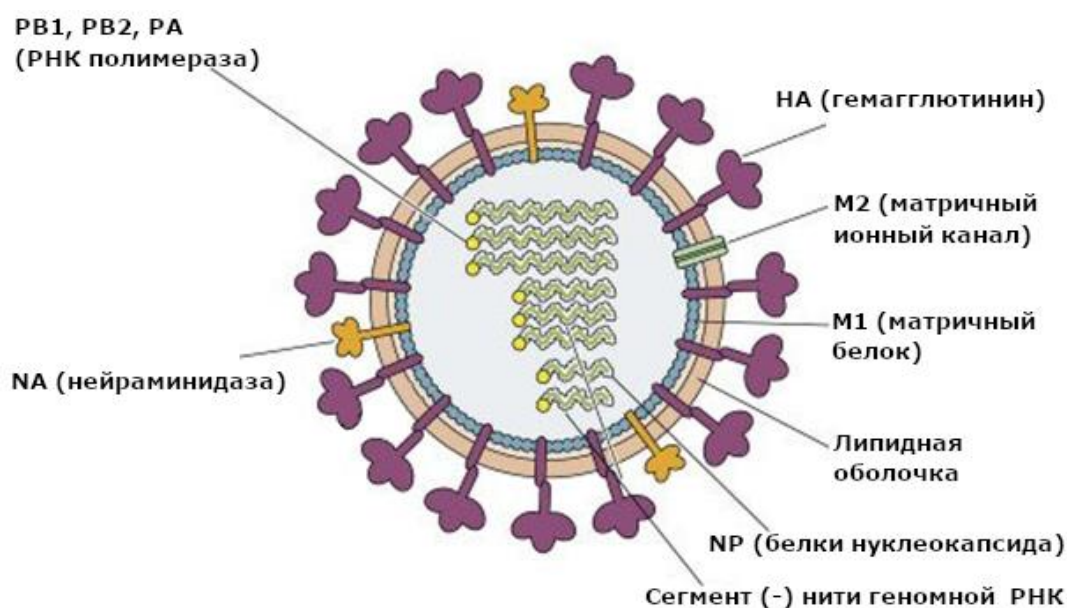


Рисунок 1. Структура вируса гриппа А. Рисунок адаптирован со статьи [21].

Структура вирионов вируса гриппа В представлена тремя трансмембранными белками: HA, NA, M и BM2. Данные белки являются ионными каналами, выполняют различные функции и используются для проникновения вируса в клетку. Вирусный геном сегментированный, и состоит из восьми фрагментов РНК [22].

Вирионы гриппа типа С структурно отличаются от вирионов вирусов А и В тем, что содержат только один первичный поверхностный гликопротеин, гликопротеин слияния НА-эстеразы, функция которого аналогична НА и NA вирусов подтипов А и В. Вирусные частицы гриппа С имеют разнообразную форму: они эллиптические или сферические диаметром 80–120 нм либо нитевидные с аналогичным диаметром, но длиной в диапазоне микрометров [23].

НА и NA являются основными трансмембранными гликопротеинами вируса гриппа. Они распознают одну и ту же молекулу клетки-хозяина, сиаловую кислоту (СК) [24]. Эти два гликопротеина определяют деление вируса гриппа А на подтипы. На сегодняшний день идентифицировано 18 подтипов НА и 11 подтипов NA. В 20 и 21 веке сезонный грипп преимущественно вызывали субтипы вируса гриппа А/Н1N1, А/Н2N2 и А/Н3N2. Заражения другими подтипами, такими как высокопатогенный Н5N1 и Н5N8, циркулирующие среди птиц, вызывают спорадические заболевания среди людей [25].

1.2. Вирус SARS-CoV-2

Вирус SARS-CoV-2 относится к семейству *Coronaviridae*. Они представляют собой оболочечные вирусы сферической формы. Размер вирионов составляет в диаметре около 108 ± 8 нм. Геном коронавирусов представлен большой одноцепочечной, не фрагментированной (+)РНК, в среднем 30 т.п.н. [26]. Геном вирусов кодирует 28 белков, в том числе 4 структурных белка: спайковый белок (S), белок оболочки (E), мембранный белок (M) и нуклеокапсидный белок (N), которые необходимы для морфогенеза вириона и инфекционности [27, 28].

Свое название коронавирусы получили из-за своего изображения на электронных микрофотографиях, так как шиповидные белки на поверхности вируса напоминают солнечную корону (рис.2).

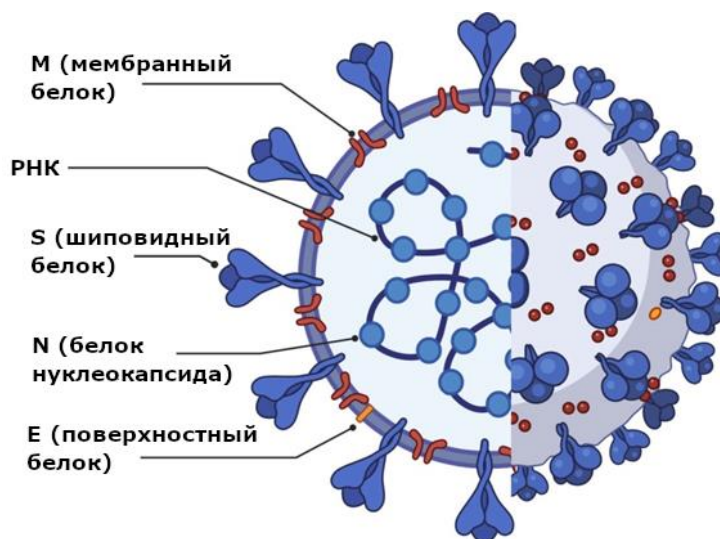


Рисунок 2. Структура вируса SARS-CoV-2. Рисунок адаптирован со статьи [29].

Согласно международной таксономии вирусов (ICTV) на 2023 год, семейство *Coronaviridae* включает 55 видов и подразделяется на три генетически однородных подсемейства: *Letovirinae*, *Pitovirinae* и *Orthocoronavirinae* [15]. Первые два включают по одному роду, и не патогенны для человека, заражают только лягушек и рыб соответственно. Подсемейство *Orthocoronavirinae* включает 4 рода: альфа-, бета-, дельта- и гаммакоронавирусы. Альфа- и бетакоронавирусы способны заражать млекопитающих, включая человека, и вызывать заболевания. На данный момент идентифицировано девять коронавирусов, поражающих человека, и четыре из них, коронавирусы человека (HCoV)-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 и HCoV-NKUI, в основном вызывают респираторную инфекцию и имеют умеренное клиническое значение [30], а три коронавируса, SARS-CoV, MERS-CoV, и SARS-CoV-2, вызывают тяжёлый острый респираторный синдром (SARS).

В ноябре 2002 г. вспышка атипичной пневмонии поразила китайскую провинцию Гуандун [31]. Причиной эпидемии был назван новый коронавирус, позже названный SARS-CoV, с уровнем смертности 10% [32]. Эпидемиологические данные указывают на то, что этот вирус возник у летучих мышей и распространился на мелких животных, которые продавались на рынках Гуандуна. Вирус попал в человеческую популяцию в результате взаимодействия с этими животными, распространился на четыре континента, заразив 8096 человек и унеся 774 жизни, прежде чем его удалось локализовать [33, 34].

За этим последовала вспышка коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) в 2012 году с очень высоким уровнем смертности — 35% [35]. Этот вирус возник на Ближнем Востоке и распространился в другие регионы и страны, приводя к изолированным инфекциям, а иногда и к вспышкам среднего размера в больницах [36]. Считается, что природным резервуаром MERS-CoV также являются летучие мыши [37].

В конце 2019 года в китайском Ухане возникла еще одна вспышка пневмонии, названная COVID-19, которая быстро распространилась во все уголки мира, став причиной миллионов смертей. Причиной этой пандемии является коронавирус, гомологичный с SARS-CoV, названный коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) у SARS-CoV-2 гораздо более низкий уровень смертности, чем у SARS-CoV или MERS-CoV, но он обладает более высокой контагиозностью. Высокая частота мутаций ортокоронавирусов и глобальный масштаб пандемии привели к быстрому появлению новых вызывающих беспокойство штаммов. Уже в 2022 году штамм омикрон, обладающий более высокой инфекционностью, но меньшей патогенностью по сравнению с исходным штаммом, привел к новой волне инфекций SARS-CoV-2 во всем мире [38]. К осени 2023 года во всём мире заболело около 770 млн. человек, и умерло почти 7 млн. [10]. Кроме того, в 2023 году появились новые варианты коронавируса, субтипы штамма омикрон, BA.2.86 Пирола и EG.5 Эрис [39, 40]. Данные

штаммы имеют множество мутаций в S белке, и обладают более высокой трансмиссивностью, чем омикрон, и могут уклоняться от иммунного ответа, сформировавшегося на другие штаммы. К концу осени 2023 года в мировой заболеваемости COVID-19 преобладает штамм линии EG.5.1, им инфицировано более 60% заболевших.

1.3. История разработки вакцин от гриппа

Целенаправленное изучение гриппа началось во время пандемии в 1918-1919 гг. Многие ученые стали активно изучать заболевание, и пытаться выделить возбудителя инфекции.

Однако только в 1933 годах английские ученые из Медицинского исследовательского совета Уилсон Смит, сэр Кристофер Эндрюс и сэр Патрик Лейдлоу, впервые смогли выделить вирус гриппа А из носовых выделений инфицированных пациентов [41]. Спустя несколько лет Уилсон Смит в Англии и Томас Фрэнсис Джуниор из США адаптировали вирус к мышинной модели.

В 1935 году было обнаружено, что вирус гриппа можно выращивать на развивающихся куриных эмбрионах, а в 1936 году из сывороток крови были выделены первые антитела, нейтрализующие вирус гриппа человека. Далее было обнаружено, наработанный в РКЭ вирус гриппа можно инактивировать формалином, и он остаётся иммуногенным для людей, а с помощью высокоскоростного центрифугирования возможна очистка вируса. Эта методика до сих пор используется для производства большинства вакцин против гриппа [42].

В 1936–1938 годах в СССР, раньше, чем на Западе, появилась первая вакцина против гриппа, которую разработал Анатолий Александрович Смородинцев на основе живого аттенуированного вируса гриппа [43]. И хотя живые вакцины вызывали ряд побочных эффектов и осложнений, они стали большим шагом вперед.

На Западе первые клинические испытания вакцин против гриппа были проведены среди вооруженных сил Англии в 1937 году с использованием подкожной вакцинации инактивированным штаммом, выделенным из легких мыши. Первая вакцина против гриппа представляла собой инактивированный вирус, который содержал только один подтип вируса гриппа А. В декабре 1942 г. начались уже крупномасштабные исследования эффективности и безопасности вакцин против гриппа. Они показали, что инактивированные вакцины против гриппа могут обеспечить эффективную защиту во время эпидемий гриппа.

Затем был обнаружен новый штамм вируса гриппа, тип В, который также может быть причиной сезонной эпидемии. Кроме того, было обнаружено, ежегодно у циркулирующего вируса гриппа могут появляться различные мутации, которые приводят к снижению эффективности вакцины, так как циркулирующий штамм не совпадает с вакцинным. Это явление

было названо "несоответствие вируса гриппа". Была разработана инактивированная двухвалентная вакцина, содержащая вирусы типа А и типа В [44].

В 1944 году Стэнли подробно описал получение и свойства вакцины против гриппа, наращиваемой на РКЭ; эта вакцина была сконцентрирована и очищена с помощью дифференциального центрифугирования и инактивирована с помощью различных процедур.

В 1960-х годах были созданы две вакцины нового типа: сплит и субъединичные вакцины. Они продемонстрировали снижение побочных реакций у детей. Эти вакцины были разделены с использованием эфира и/или детергента, а гемагглютинин и нейраминидаза были, в случае субъединичных вакцин, очищены и обогащены.

Пандемия 1968 года выявила необходимость в разработке трехвалентных инактивированных вакцин против гриппа.

В 1980 году первые субъединичные вакцины были лицензированы в Великобритании и в настоящее время доступны в нескольких странах мира. Они содержали только поверхностные антигены, гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА), которые были выделены из РКЭ с помощью последовательных стадий очистки. Эта инновационная вакцина оказалась высокоиммуногенна и хорошо переносимой у людей, особенно у детей, хотя для гарантии эффективности вакцины во время эпидемий требовалось две дозы.

В 2003 году была лицензирована первая мукозальная вакцина в виде назального спрея. Мукозальные вакцины формируют иммунный ответ с выработкой иммуноглобулинов класса А в слизистых оболочках, которые наиболее эффективны против респираторных инфекций.

В 2012 году ВОЗ дает первую рекомендацию по составу для четырехвалентной вакцины. В этом же году становятся доступными вакцины, культивированные в клеточных культурах, как альтернативный метод производства вакцин против гриппа.

В сентябре 2023 г. ВОЗ рекомендовал снова перейти на трехвалентную вакцину, так как вирус гриппа В/Yamagata исчез из циркуляции в 2020 г.

1.4. Виды вакцин против гриппа на современном этапе

В настоящее время используются следующие виды вакцин:

К первой группе относятся вакцины, содержащие убитый вирус - инактивированные противогриппозные вакцины (ИВ – Inactivated Influenza Vaccine).

Трехвалентные инактивированные вирусные вакцины (ТІВ) против вирусов сезонного гриппа являются наиболее часто используемыми противогриппозными препаратами. Иногда, из сезона в сезон, они заменяются на четырехвалентные вакцины (QIV). Вакцины ТІВ состоят из трех штаммов вируса гриппа (2 подтипа А, H3N2, H1N1 и 1 тип В), отобранных на основе

циркулирующих вирусов в текущем сезоне, и прогнозируемых на следующий сезон. Вакцины QIV включают в себя две генетические линии вируса типа В.

Вакцины выпускаются в трех разных формах; цельновирионные, расщепленные и субъединичные вакцины. Цельновирионные вакцины получают из куриных эмбрионов, инокулированных вирусом, с последующим этапом химической инактивации и очистки. Расщепленные (сплит) вакцины получают методом обработки полученных тем же путем вирусов гриппа диэтиловым эфиром или детергентом, который разрушает вирусную липидную оболочку, освобождая все вирусные белки. Субъединичные вакцины, содержащие только поверхностные вирусные белки гемагглютинин и нейраминидазу, получают так же из куриных эмбрионах, но применяют дополнительные стадии очистки.

Инактивированные вакцины в первую очередь индуцируют гуморальный иммунитет, который формирует антитела против эпитопов гемагглютинина вируса гриппа. Расщепленные и субъединичные составы используются чаще, чем цельновирионные, вызывая сопоставимый иммунитет. Цельновирионные вакцины в последнее время все меньше используются, из-за более высокой реактогенности, особенно у детей младшего возраста и пожилых людей. Они могут вызывать болезненность в месте прививки, лихорадку, головная боль и другие побочные эффекты [45].

Ко второй группе относят живые аттенуированные противогриппозные вакцины (LAIV— Live Attenuated Influenza Vaccine). Они вызывают ослабленную инфекцию обычно без выраженных клинических проявлений. Интраназальное введение LAIV имитирует естественный путь заражения гриппом, что приводит к локализованному иммунному ответу в слизистой оболочке в месте заражения. В отличие от инактивированных вакцин, LAIV индуцирует сильные IgA-реакции слизистой оболочки и клеточно-опосредованные иммунные реакции, которые повышают эффективность иммунного ответа против гриппа. Они индуцируют как гуморальный, так и клеточный иммунитет. Аттенуированные вакцины обычно являются холодоадаптированными и эффективно размножаются в верхних, но не в нижних дыхательных путях. Они назначаются в виде назального спрея, были лицензированы в СССР в 1980 г., и в США в 2003 г [46].

Несмотря на свою эффективность, использование LAIV вызвало две основные проблемы. Во-первых, вирус в LAIV теоретически может подвергнуться мутации, и стать патогенным штаммом гриппа. Однако, еще нет доказательства этого, и необходимы дополнительные исследования. Вторая проблема связана с использованием LAIV у детей младшего возраста: вакцина вызывала одышку у детей в возрасте до 2 лет. Поэтому LAIV в настоящее время одобрен для использования у детей и взрослых в возрасте от 2 до 49 лет [47].

Кроме того, новые генетические технологии в сочетании с обратной генетикой вируса гриппа позволяют генерировать специально созданные штаммы в очень короткие сроки. Эти новые технологии могут быть использованы как для кандидатных вакцин IV, так и для LAIV.

Обычные противогриппозные вакцины на основе куриных эмбрионов всё еще эффективны и используются чаще всего. Но они имеют некоторые существенные ограничения: сложная и медленная технология производства; необходима большая производственная мощность, так как для одной дозы вакцины требуется два куриных яйца, что дополнительно удорожает производство; аллергические реакции на яичные компоненты у некоторых людей и слабый перекрестный иммунный ответ к другим подтипам вируса гриппа [48, 49]. Различные исследования показали, что культивирование вируса гриппа в РКЭ часто приводит к мутациям в гемагглютинине вируса, приводящим к его адаптации к клеточным рецепторам куриных эмбрионов, что может изменить антигенность и снизить эффективность вакцины [50, 51].

Многие страны переходят от куриных эмбрионов на различные клеточные культуры для наработки противогриппозных вакцин. Использование клеточных технологий может сделать производство вакцины против гриппа независимым от глобальной поставки куриных эмбрионов и обеспечить простое расширение процесса. Несколько клеточных линий, в том числе клетки MDCK (клетки почки собаки Madin-Darbey), клетки Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки) и некоторые другие использовались для производства вакцин против гриппа. Вакцина, полученная из клеток млекопитающих, дает несколько преимуществ, по сравнению с вакцинами на основе куриных эмбрионов. Вирус гриппа, культивированный в клетках млекопитающих, остается неизменным и обеспечивает лучшую или сопоставимую защиту. Кроме того, само производство вакцин на основе клеток, дает большое преимущество. Контролируемая производственная система, включает в себя биореакторы, которые обеспечивают более высокий выход, быстрый производственный цикл и легко расширяемое производство путем добавления биореакторов [50]. Было показано, что выход вируса из 1000-литрового биореактора сравним с 30800 куриных яиц [52]. Эти преимущества повышают экономическую эффективность клеточных вакцин против гриппа. Но, система культивирования клеток также имеет и некоторые ограничения, например серьезной проблемой применения клеточных линий при производстве живых вакцин, является опасность их контаминации вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами.

1.5 Разрабатываемые новые типы вакцин

Появление рекомбинантных белков существенно упростило получение вакцинных антигенов, а также исключило необходимость работать с вирулентным патогеном во время производства. Их использование имеет свои преимущества для выпуска вакцин против гриппа.

К ним относятся быстрое производство, его низкая стоимость, отсутствие инфекционного вируса во время работы, независимость от поставок куриных эмбрионов, простота масштабирования, возможность использовать для вакцины генетические последовательности вируса, полученные непосредственно из клинических образцов. Недостатком этого подхода является использование только одного антигена вируса гриппа, обычно гемагглютинина. Поэтому, эти вакцины не формируют многогранный иммунный ответ против других белков, которые могут обеспечить защиту. Многочисленные рекомбинантные белковые вакцины, в основном на основе гемагглютинина, в настоящее время находятся в доклинической и клинической разработке. Для производства белка используются такие клеточные системы, как системы экспрессии бакуловируса на клетках насекомых, агробактерий на некоторых растениях и классическая бактериальная система с использованием *Escherichia coli*. Кроме того, для производства белковых кандидатных вакцин были исследованы лактобактерии, водоросли, дрожжи и бесклеточные системы экспрессии. Большим недостатком таких систем является то, что полученные в них гемагглютинины могут отличаться от белков, которые синтезируются в клетках млекопитающих. Дело в том, что сворачивание белка в клетке (фолдинг) после его синтеза в разных организмах происходит по-разному. Например, один и тот же белок, полученный в эукариотических и бактериальных клетках, может иметь разные свойства, так что и рекомбинантный белок может не обладать необходимыми антигенными свойствами для эффективной работы вакцины [47]. К недостаткам этого метода так же можно отнести необходимость правильных посттрансляционных модификаций (таких как гликозилирование), которые могут различаться у клеток-хозяев, дрожжей или бактерий. Рекомбинантные белки, как правило, также должны быть растворимыми, что создает проблему для белков с трансмембранным доменом. К тому же, вакцины на основе рекомбинантных белков не могут стимулировать клеточный иммунитет.

Другой платформой, разработанной для производства вакцин против гриппа, является использование вирусоподобных частиц (ВПЧ). Вирусоподобные частицы являются неинфекционными частицами белковых мультимеров и лишены генетического материала вируса. Они имитируют конформационные, структурные и антигенные свойства нативных вирусов гриппа. ВПЧ могут быть получены путем наработки структурных белков вируса гриппа в клетках млекопитающих, насекомых или растений, а затем происходит их самосборка в вирусоподобную частицу, без генетического материала вируса внутри. ВПЧ вакцины против пандемического гриппа прошли клинические испытания и показали хорошие профили безопасности и эффективности. Например, ВПЧ вакцина, содержащая рекомбинантный НА вируса гриппа A(H1N1)pdm09, от Novavax была оценена в фазе 2 клинических испытаний в 2012 году на предмет безопасности и иммуногенности [53]. Эта противогриппозная ВПЧ вакцина

продемонстрировала сильный иммунный ответ после однократной вакцинации с легкими побочными эффектами.

Следующая платформа - вирусный вектор. Он представляет собой вирус, в геном которого встроена последовательность необходимого антигена [54]. Вирусный вектор не является патогенным для хозяина, но может продуцировать антиген в течение определенного периода времени. Протестированы вакцины на основе вирусного вектора с использованием вирусов с двуцепочечной ДНК (аденовирус и поксвирус) и одноцепочечных РНК вирусов (альфа-вирус, вирус парагриппа). Например, недавно был разработан аденовирусный вектор, экспрессирующий белки нуклеокапсида и белок М2 [55]. Вакцина обеспечивала защиту от гомологичных штаммов вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09. Вакцины на основе вирусных векторов обладают рядом преимуществ, в том числе способностью индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет, высокий уровень экспрессии белка и длительную стабильность. Некоторые из этих векторных систем могут имитировать естественную инфекцию вируса гриппа из-за их прямой доставки в слизистую оболочку. Векторные вакцины также имеют ряд недостатков, в том числе снижение иммуногенности в присутствии ранее существовавшего иммунитета к вектору, риск развития заболевания у людей с иммунодефицитом, и самое важное – развитие антивекторного иммунитета. Так как вакцина по своей сути является вирусом, против нее в организме так же будут образовываться антитела, и в результате повторная иммунизация такой же векторной системой будет крайне неэффективна [47].

Наиболее современной платформой для разработки вакцин являются мРНК-вакцины. Но прежде, чем перейти к разбору платформы мРНК, следует отметить, что для противодействия пандемии COVID-19 использовались новые типы вакцин, рассматриваемые в данном разделе.

В настоящее время существуют две основные проблемы, связанные с вакцинами против пандемического гриппа, которые необходимо решить. Первая — это временной разрыв между идентификацией пандемического вируса, разработкой вакцины и вакцинацией населения. Когда выявляется новый пандемический вирус, требуются месяцы для разработки, тестирования, производства и применения новой вакцины. После вакцинации человека проходит еще 2–3 недели, пока не появится защитный иммунный ответ. Вторая проблема - низкая иммуногенность при несовпадении вакцинного и эпидемического штамма. Поэтому, быстрое производство вакцин в ответ на новый штамм вируса пандемического гриппа имеет огромное значение для снижения общей заболеваемости и смертности, в случае пандемии. В данном случае недавно появившаяся новая технология мРНК-вакцин имеют некоторые преимущества перед «классическими» технологиями производства гриппозных вакцин. Возможность простой замены целевого гена в ДНК матрице для синтеза мРНК-вакцины, позволяет быстро реагировать на

появление новых штаммов вируса [13]. Более подробно информация об мРНК вакцинах будет изложена в главе 1.7.

1.6 Вакцины против COVID-19

Экстренная ситуация с пандемией COVID-19 привела к мобилизации всех технологических решений для разработки и производства вакцин, и на 2023 год уже одобрено около 40 различных вакцин.

Так, например, были разработаны классические вакцины на основе аттенуированного вируса SARS-CoV-2, например Российская вакцина КовиВак, разработанная в ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» [56], Китайские вакцины Sinopharm BBVBP-CoV [57], SinoVac CoronaVac [58] и Индийская Bharat Biotech BBV152/Covaxin [59]. В данных вакцинах изолированный вирус SARS-CoV-2 культивировали на клетках Vero, химически инактивировали и смешивали с адьювантом.

Были разработаны субъединичные вакцины, например Американская вакцина Novavax NVX-CoV2373. Рекомбинантная субъединичная вакцина была получена в системе экспрессии клеток насекомых бакуловируса-Sf9 [60]. Она содержит стабилизированный полноразмерный гликопротеин S вируса SARS-CoV-2. В России в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора была разработана пептидная вакцина «ЭпиВакКорона» на основе трех химически синтезированных пептидов S-гликопротеина, экспрессируемых в виде химерного белка [61].

Среди современных платформ высокую эффективность показали вакцины на основе аденовирусных векторов. Наиболее высокую эффективность среди векторных вакцин показала Российская вакцина «Спутник V», разработанная ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» на основе двух аденовирусных векторов (Ad26 и Ad5), несущих ген, кодирующий полноразмерный белок S [62]. Среди других векторных вакцин были одобрены Oxford-AstraZeneca AZD1222, на основе аденовируса шимпанзе [63] и Janssen AD26.CoV2.S из нереплицирующегося аденовируса Ad26 [64].

Индийская вакцина Zydus Cadila ZyCoV-D стала первой в мире ДНК-вакциной, одобренной к применению. Она включает в себя плазмидный вектор pVAX1, несущий ген, кодирующий S-гликопротеин и сигнальный пептид IgE [65].

Наибольший интерес в мире вызвали вакцины на основе мРНК, которые впервые были одобрены к применению во время пандемии COVID-19 в конце 2020 года. Обе вакцины, mRNA-1273 компании Moderna и BNT162b2 от Pfizer, представляют собой мРНК, кодирующие модифицированный S белок вируса, инкапсулированную в липидные наночастицы [66, 67, 68, 69, 70].

1.7 мРНК-вакцины

1.7.1 Общие сведения

Вакцины на основе мРНК являются следующим этапом развития вакцин на основе нуклеиновых кислот и обладают рядом преимуществ по сравнению с ДНК-вакцинами. В 1989 г. Malone с соавторами впервые предложили концепцию мРНК в качестве терапевтического препарата и успешно трансфицировали эукариотические клетки, используя инкапсулированную в липосомы мРНК [71]. Уже в 1990 году было продемонстрировано, что внутримышечная инъекция мРНК, синтезированной *in vitro*, приводит к экспрессии кодируемого белка в мышечной модели [72]. Однако больше внимания было уделено использованию плазмидной ДНК, а не мРНК, из-за низкой стабильности мРНК. По сравнению ДНК, она очень нестойка, и легко разрушается нуклеазами. Примерно 10 лет назад, при синтезе мРНК было предложено использовать модифицированные нуклеотиды. Так, использование псевдоуридина вместо уридина приводило к тому, что мРНК была более стабильной и обладала повышенной трансляционной способностью [73]. Применение модифицированных нуклеотидов, таким образом, решало ключевую проблему для мРНК - стабильность, и к тому же увеличивало продукцию кодируемого белка.

В отличие от ДНК-вакцин, которые функционируют путем проникновения ДНК в ядро клетки-хозяина, мРНК-вакцине необходимо попасть только в цитоплазму, где на рибосомах начнется трансляция закодированного белка. мРНК синтезируют путем транскрипции *in vitro*, с ДНК-матрицы при помощи фермента, который называется Т7 ДНК зависящая РНК полимеразы. Сам процесс легко масштабируется, и занимает всего несколько часов, тем самым превосходя по скорости производство ДНК вакцины, где наработка бактериальной плазмиды занимает несколько дней. Хотя для синтеза мРНК-вакцины необходимо вначале наработать ДНК-матрицу, её требуемое количество не значительно, по сравнению с количеством ДНК, необходимого для ДНК-вакцины. Кроме того, это не постоянная процедура, за один раз можно наработать матрицу для производства миллионов доз мРНК-вакцины. Затем, по окончании транскрипции, матрица удаляется путем расщепления ДНКазой, а мРНК очищается и после некоторых модификаций, которые также происходят *in vitro*, может быть использована. Производство мРНК путем транскрипции *in vitro*, таким образом, даже более привлекательно, чем производство плазмидной ДНК, потому что, хотя это также общий процесс (то есть, независимый от вставки гена), он по сути является ферментативной химической реакцией без животных или клеточных компонентов, хотя появляются значительные финансовые расходы на необходимые ферменты для синтеза. Производственный процесс может руководствоваться принципами GMP для фармацевтических продуктов, а не для биологических препаратов, что является вероятным преимуществом.

Конечно, любые составы или добавление иммуномодуляторов, адъювантов или систем доставки могут увеличить сложность и стоимость изготовления либо для мРНК, либо для плазмидной ДНК.

мРНК является промежуточным этапом между ДНК, несущей информацию о белке, и рибосомами в цитоплазме, обеспечивающими трансляцию белка. В клетках, в момент транскрипции РНК с ДНК, она одновременно модифицируется добавлением так называемого кэпа на 3' конце, который необходим для узнавания и посадки на рибосому, а также добавлением поли А хвоста на 5' конце для замедления гидролиза экзонуклеазами.

«Зрелая» мРНК представляет собой одноцепочечную последовательность нуклеотидов, которая выглядит следующим образом: на 5' конце находится кэп, за ним следует 5' нетранслируемая область (5'-НТО), которая несет в себе регуляторные элементы, выполняющие роль инициации трансляции и стабилизации молекулы. Далее находится открытая рамка считывания, начинающаяся со старт кодона и заканчивающаяся стоп кодоном, в которой непосредственно закодирована последовательность белка-антигена. За ней следует 3' нетранслируемая область (3'-НТО), которая в первую очередь необходима для стабилизации молекулы мРНК. Замыкает молекулу мРНК длинный поли-А-хвост, состоящий из 100-200 аденинов. Он защищает мРНК от деградации, и в некоторой степени регулирует её время жизни, так как постепенно после трансляции белка он укорачивается. К тому же, клеточная мРНК покрывается различными белками, которые защищают ее от рибонуклеаз, в большом количестве присутствующих в клетках, и белками, обеспечивающими транспорт мРНК из ядра в цитоплазму. Для того чтобы мРНК-вакцина работала, она по своему строению должна быть аналогичной клеточной мРНК.

Существует много способов модификации РНК *in vitro*. Непосредственно при синтезе РНК, было предложено использовать встречающиеся в природе модифицированные нуклеотиды, например, уже упомянутый псевдоуридин. Они повышают стабильность РНК, снижая узнавание её рибонуклеазами и рецепторами неспецифического врожденного иммунитета. Наряду с этим применяются следующие модификации: оптимизация состава кодонов (замена редких кодонов часто используемыми синонимичными кодонами); оптимизация длины поли-А-хвоста; поиск подходящих регуляторных элементов в 5' и 3'-НТО; использование химических аналогов и модифицированных кэпов. Все это в той или иной степени повышает как стабильность мРНК, так и уровень выхода белка после трансляции. Немаловажным фактором является степень очистки готовых мРНК от различных примесей и компонентов реакции синтеза. Примеси могут стимулировать работу неспецифического врожденного иммунитета, тем самым подвергая мРНК раннему разрушению, не давая ей попасть в клетку и выполнить свою функцию [74].

Одна из серьезных проблем применения мРНК вакцин – это разработка эффективного способа доставки вакцины в клетку. Для реализации своей задачи мРНК-вакцина должна попасть в цитоплазму клетки, где будет происходить трансляция закодированных белков. Одна из основных преград – это клеточная мембрана. Основой мембраны является двойной слой, образованный фосфолипидами. Слои организованы так, что гидрофильные "головы" фосфолипидов ориентированы наружу, а взаимодействие между двумя слоями осуществляется гидрофобными "хвостами" фосфолипидов. Различные мембранные белки образуют ионные насосы и ионные каналы, которые помогают поддерживать отрицательный потенциал, за счет перекачки различных ионов внутрь и из клетки. Отрицательный потенциал создает серьезное препятствие для проникновения молекул мРНК, также несущих значительный отрицательный заряд [13].

Помимо клеточной мембраны, препятствием для мРНК являются различные внеклеточные рибонуклеазы, присутствующие в тканях, межклеточном пространстве, которые приводят к её деградации. В начале исследований мРНК в качестве вакцины использовали «голую» мРНК. Впоследствии, для защиты от деградации нуклеазами и экранирования ее отрицательного заряда начали использовать различные материалы в качестве невирусных векторов. Наиболее изученным способом доставки мРНК является использование липидных наночастиц. Также используют разные по своему составу и размеру полимерные структуры, электропорацию, липидные наночастицы, дендримеры. Использование модифицированных нуклеотидов может позволить применять и «голую» мРНК, простой инъекцией ее внутримышечно.

Преимущество мРНК вакцин (как и ДНК вакцин) по сравнению с классическими вакцинами состоит также в том, что в них можно закодировать последовательности антигенов сразу нескольких подтипов вируса гриппа, тем самым создав модель универсальной вакцины, против циркулирующих на данный момент штаммов. При необходимости, можно будет создать новую вакцину от внезапного пандемического штамма в короткие сроки. К тому же, они могут стимулировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет. В 2019 году Moderna Therapeutics опубликовала результаты 1 фазы клинических испытаний модифицированной мРНК-вакцины, кодирующей белок гемагглютинаина гриппа H10N8, и мРНК-вакцины, кодирующей гемагглютинаина гриппа H7N9, упакованных в липидные наночастицы (ЛНЧ), и продемонстрировала ее устойчивую иммуногенность у людей [75].

Таким образом, перечисленные выше преимущества делают мРНК перспективной платформой для разработки вакцин.

1.7.2 Структура мРНК-вакцины

Информационная РНК (мРНК) представляет собой одноцепочечную полинуклеотидную цепь, несущую кодирующую белок информацию. За последние десятилетия основные технологические инновации сделали синтетическую мРНК возможным терапевтическим средством [76].

Как было уже сказано, синтетическая мРНК, подобно эндогенной клеточной мРНК, классически включает в себя все необходимые структуры: кэп, 5'-НТО, кодирующая область, 3'-НТО и поли(А)-хвост (рис.3) [77]. Такое деление участков мРНК зависит от наличия стартовых и стоп-кодонов, которые распознаются рибосомой внутри клетки. Точность распознавания старт и стоп-кодона зависит от контекста последовательности и факторов трансляции. На это влияют 5'-НТО и 3'-НТО, элементы которых взаимодействуют с рибосомами, а также с РНК-связывающими белками. Кроме того, они влияют на внутриклеточную стабильность мРНК, которая неотъемлемо связана с трансляционным выходом.

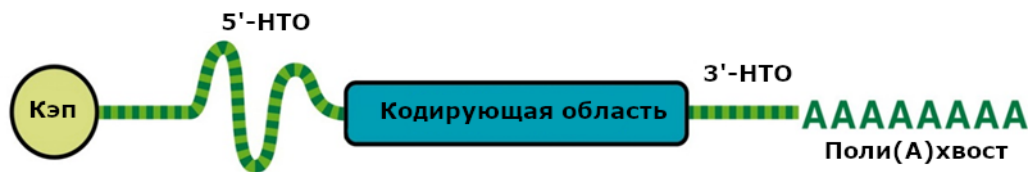


Рисунок 3. Структура мРНК.

1.7.2.1 Кэп

Кэп представляет собой модифицированный рибонуклеотид — 7-метилгуанозин (рис.4). Он присутствует почти во всех эукариотических клеточных мРНК на 5'-конце молекулы. Концевой 5'гуанин с N7 -метильной группой соединен с первым нуклеотидом мРНК 5'-5'-связью через две пирофосфорильные связи. В клетках процесс кэпирования происходит при транскрипции в ядре, когда РНК достигает длины нескольких десятков нуклеотидов. Процесс осуществляется несколькими ферментами: РНК-трифосфатазой, гуанилилтрансферазой и метилтрансферазой. Помимо 5'-концевого кэпа (называемого кэп-0), первые нуклеотиды мРНК также могут быть метилированы по 2'-гидроксилу с образованием кэп-1 ($m^7 GpppN_1mN_2$) или первые два нуклеотида метилируются с образованием кэп-2 ($m^7 GpppN_1mN_2m$). Метилирование этих нуклеотидов является наиболее распространенной модификацией эукариотической мРНК и обеспечивает молекулярную сигнатуру для различения собственных и чужих мРНК [78]. Некэпированные транскрипты или мРНК со структурой кэп 0 могут распознаваться рецептором врожденного иммунитета RIG-1 [79]. Следовательно, кэпированные

мРНК склонны избегать распознавания сенсорами врожденного иммунитета, что важно для синтеза мРНК-вакцин.

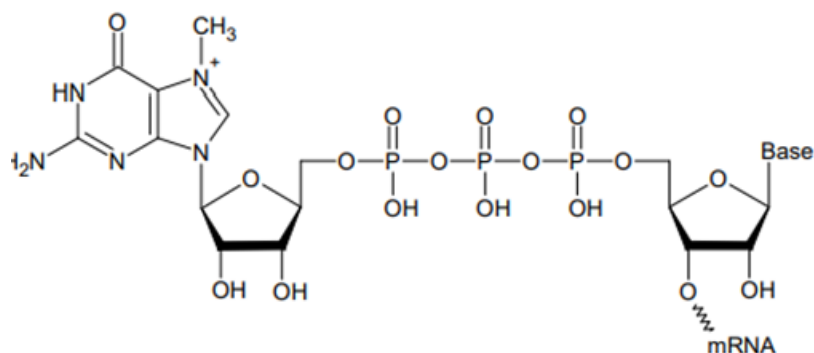


Рисунок 4. Структура кэпа

Кэп имеет значение для полиаденилирования, стабильности мРНК и, самое главное, для трансляции [80]. В цитозоле структура кэпа рекрутирует эукариотический фактор инициации трансляции 4E (eIF4E), необходимый для распознавания рибосомой и инициации трансляции. Что касается стабильности, кэп защищает мРНК от деградации 5'→3' опосредованными экзонуклеазами. В результате, кэпированные транскрипты имеют более длительный период полураспада, чем некэпированные аналоги. Способствуя трансляции и повышая стабильность мРНК, кэп-структура, очевидно, увеличивает выход белка в ходе синтеза внутри клеток.

При синтезе мРНК *in vitro*, существует два основных подхода для получения кэпированных молекул: ферментативный, например, кэпирующим ферментом вируса оспы коров (VCE), и использование химических аналогов кэпа. Каждый подход обладает своими преимуществами и недостатками.

Первый подход называется «посттранскрипционный», что означает образование кэпа после транскрипции РНК. Кэпирующий фермент VCE обладает фосфатазной, гуанилилтрансферазной и метилтрансферазной активностью, образуя естественную для эукариотических клеток структуру кэпа на 5' конце РНК (рис.5). Для получения структуры кэп-1 в реакцию дополнительно добавляют фермент 2'-О-метилтрансферазу. Данный метод, как правило, приводит к 100% кэпированию всех молекул РНК в реакции. Несмотря на такое преимущество, крупномасштабное производство кэпированной РНК с помощью VCE требует дополнительную стадию синтеза и очистки.

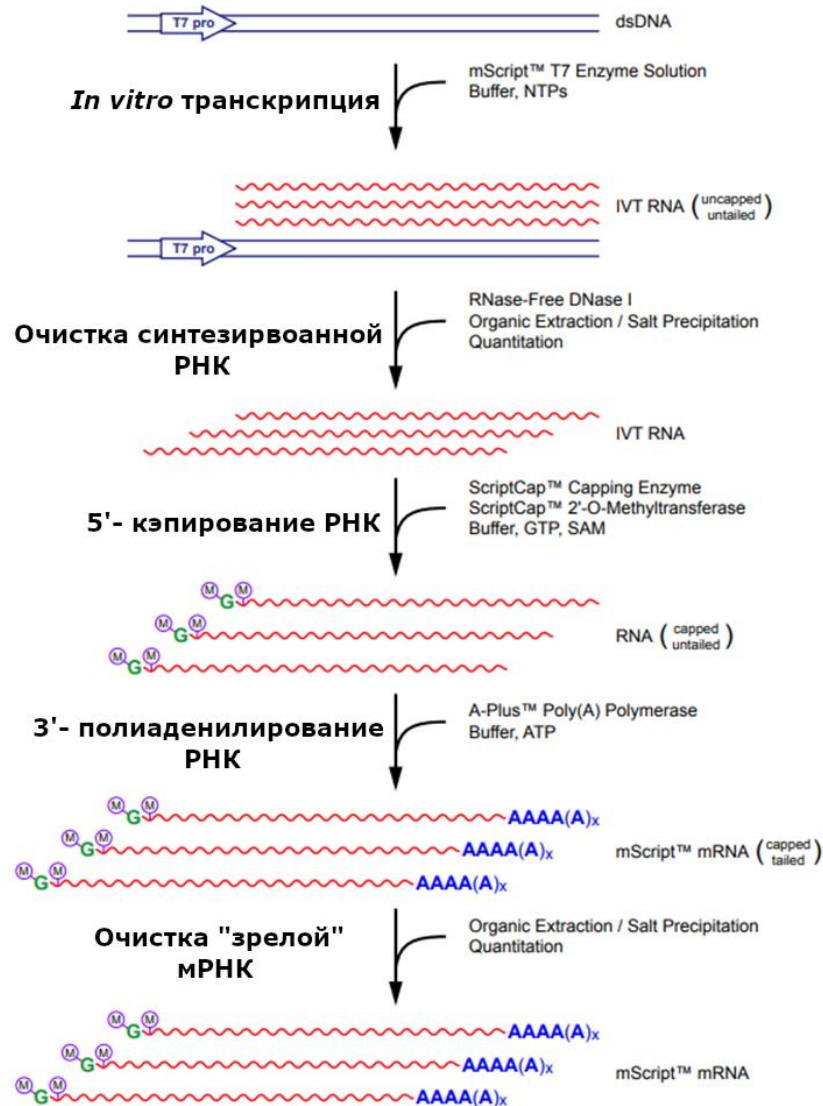


Рисунок 5. Схема ферментативного синтеза мРНК с использованием коммерческого набора T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CellScript, США)

Второй подход называется «котранскрипционный», что означает образование кэпа непосредственно в реакции синтеза РНК *in vitro*. В данном подходе используются различные химические аналоги кэпа, которые добавляются в реакцию вместе с четырьмя рибонуклеотидами во время синтеза РНК. Данный подход имеет существенное преимущество по сравнению с ферментативным способом, так как позволяет добиться получения мРНК в одну стадию. На сегодняшний день существует уже несколько поколений таких аналогов кэпа.

Первый вариант представлял собой химически синтезированный кэп-0, $m^7GpppGp$, однако, он мог встроиться в молекулу РНК двумя ориентациями, нормальной и обращённой: $m^7GpppGpN$ или $Gpppm^7GpN$. Это приводило к тому, что только половина кэпированной РНК имела кэп в правильной ориентации. Чтобы этого избежать, был разработан antireverse cap analogs (ARCA), такой же кэп-0, в котором группа 3'-ОН рядом с m^7G была заменена на 3'-OCH₃, для предотвращения присоединения кэпа в обратной ориентации (рис.6) [81]. мРНК, кэпированная

ARCA, показала хорошую эффективность трансляции наряду с пролонгированной экспрессией белка в различных типах клеток [82]. Существенным недостатком первых двух поколений аналогов кэпа является их конкуренция с GTP за РНК-полимеразу. Это приводит к тому, что экпирование РНК достигает только 60-80%, в зависимости от подбора реакционной смеси (соотношение ARCA и GTP). Кроме того, прямое включение аналогов кэпа не приводит к образованию структур кэп-1 или кэп-2, которые необходимы для эффективной работы мРНК в эукариотических клетках.

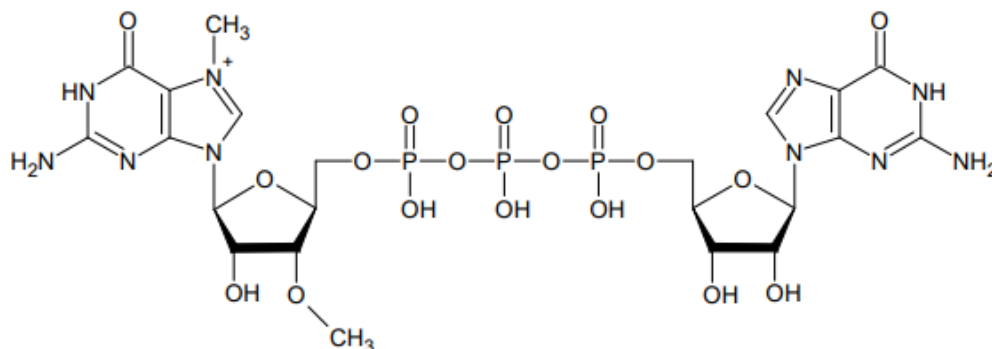


Рисунок 6. Структура антиреверсивного аналога кэпа (ARCA)

Третьим поколением аналогов кэпа, AG-Cap, является технология, в которой аналоги представляют собой тринуклеотид – кэп соединён сразу с двумя нуклеотидами: А и Г ($m^7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG$) (рис.7). По представлению авторов данной технологии, тринуклеотид первым попадает в активный сайт T7 РНК-полимеразы, находит свои комплементарные основания на ДНК матрице, которые необходимо заранее спроектировать сразу после T7 промотора, и с него начинается транскрипция РНК. Данный аналог кэпа позволяет экпировать до 98% транскриптов, и, кроме того, аденозин в первой позиции оказывается метилирован, что приводит к образованию эукариотического кэп-1 [83].

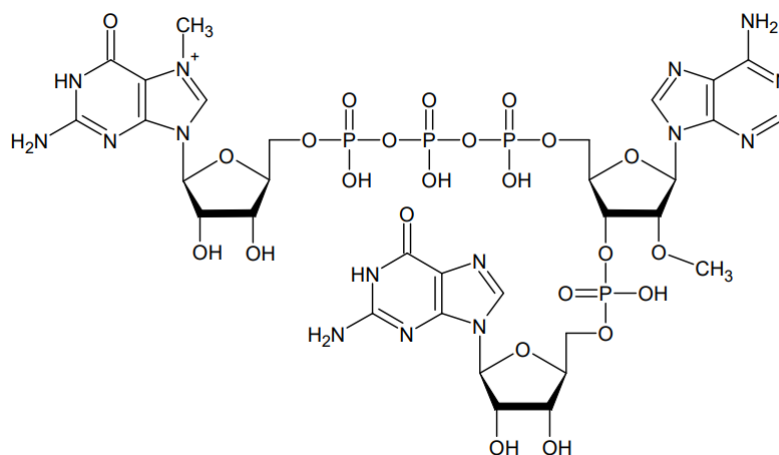


Рисунок 7. Структура AG-Cap аналога кэпа.

1.7.2.2 5'Нетранслируемый регион (5'НТО)

Сами по себе нетранслируемые регионы не кодируют белок, они участвуют в регуляции экспрессии и стабильности мРНК.

Когда на эукариотической мРНК собирается комплекс инициации трансляции, он сканирует РНК в поисках кодона инициации (AUG). Собственно, 5'НТО — это структурная область мРНК от кэпа до стартового кодона. Регуляция инициации трансляции в эукариотических мРНК в первую очередь обеспечивается особенностями 5'НТО, включая вторичные структуры, элементы рибонуклеотидной последовательности и длину 5'НТО [84]. У млекопитающих средняя длина 5'-НТО колеблется примерно от 100 до 200 нуклеотидов. Хотя ультракороткая 5'НТО способна инициировать трансляцию, обычно считается, что для эффективного распознавания стартового кодона рибосомой необходима минимальная длина 20 нуклеотидов.

Вторичные структуры в 5'НТО влияют на эффективность инициации трансляции и активно участвуют в регуляции синтеза белка. Сложные не структурированные шпильки служат дорожными блоками, препятствуя загрузке рибосом и процессу сканирования [85]. В тоже время, структуры «стебель-петля» в качестве энхансеров или активаторов трансляции могут способствовать трансляции белка путем взаимодействия с eIF3 и связанной с ним рибосомой [86]. Сложные структуры РНК в 5'-НТО, такие как G-квадруплексы РНК, могут служить стерическими блоками для раскручивания структуры РНК с помощью сканирующей рибосомы, эукариотического фактора инициации 4A (eIF4A) и других геликаз [84]. Внутренние сайты посадки рибосомы (IRES) рекрутируют 40S рибосом к 5'-НТО независимым от кэпа способом [87]. Многие клеточные IRES активируются при стрессе, тогда как некоторые необходимы в обычных физиологических условиях. Кроме того, 5'НТО может содержать такие структуры, как терминальный олигопиримидин, сайты узнавания miRNA, короткие открытые рамки считывания, которые также участвуют в регуляции мРНК [88].

На текущий момент, для достижения высокого синтеза белков, кодируемых мРНК-вакциной, сравнивались различные эукариотические 5'НТО. Наиболее популярной последовательностью является 5'НТО α - или β -глобина человека. Они использовались в клинических испытаниях, а также в фундаментальных исследованиях [89]. Чтобы свести к минимуму процесс сканирования, рекомендуется более короткий 5'НТО, по крайней мере, с 20 нуклеотидами [90], [91], [92]. Наконец, важно избегать присутствия высокостабильных вторичных структур, особенно вблизи 5'-конца, которые могут нарушить загрузку на рибосому и поиск стартового кодона.

1.7.2.3 Кодирующая область

Из-за вырожденности генетического кода каждая аминокислота часто кодируется несколькими синонимичными кодонами, за исключением метионина и триптофана. Синонимичные кодоны имеют свои соответственные тРНК, которые встречаются с разной частотой, универсально у разных видов. Уровни количества копий генов тРНК коррелируют с использованием кодонов. Следовательно, кодоны можно разделить на оптимальные и неоптимальные на основе содержания тРНК. Принято считать, что оптимальные кодоны транслируются быстрее и точнее, чем неоптимальные.

Вырождение кодонов предлагает несколько вариантов конструирования различных последовательностей кодирующих областей, представляющих один и тот же желаемый белок. Замена редких кодонов более многочисленными и часто используемыми на основе предпочтений тРНК называется оптимизацией кодонов. Было показано, что высокое содержание гуанина и цитозина (G и C) увеличивает стабильность мРНК и эффективность трансляции по сравнению с их аналогами, богатыми аденином и уридином (A и U) [93, 94]. В результате оптимизация содержания GC в кодирующей области с одновременным истощением уридина является широко применяемой стратегией дизайна мРНК-вакцин [95, 96]. Кодон-оптимизированные мРНК успешно применялись в терапевтических средствах на основе мРНК, таких как вакцины против вирусных инфекций и заместительная терапия. Помимо улучшения скорости элонгации и эффективности трансляции, оптимизация кодонов может изменять вторичные структуры РНК и другие особенности, которые мешают экспрессии генов. Доступно множество биоинформационных инструментов для оценки индекса адаптации кодонов (CAI), свойства GC-rich и предсказания структуры РНК [97].

Помимо основной кодирующей последовательности, терапевтические мРНК могут содержать дополнительные последовательности, кодирующие N-концевые сигнальные последовательности/пептиды. Кроме того, желаемые белки могут быть перенаправлены с помощью сконструированных сигнальных последовательностей из мембраносвязанной версии в секреторируемую [98].

1.7.2.3.1 Модифицированные нуклеотиды

Наиболее значимой вехой в разработке мРНК вакцин стало использование модифицированных нуклеотидов. В 2005 г. Карико и соавт. [99] сообщили, что модификация синтезированной мРНК природными аналогами нуклеотидов, такими как псевдоуридин (Ψ), 5-метилцитидин (m5C), N6-метиладенозин (m6A), которые содержатся в эукариотических клетках, снижает уровень врожденного иммунного ответа и уменьшает высвобождение воспалительных

факторов, о чём будет говориться в следующих разделах. За это открытие Каталин Карико и Дрю Вайсман стали Лауреатами Нобелевской премии по физиологии и медицине в 2023 году.

Природные мРНК содержат АТФ (АТР), ЦТФ (СТР), ГТФ (GTP) и УТФ (UTP) в качестве основных четырех нуклеотидов. Во время посттранскрипционной модификации молекул мРНК, некоторые нуклеотиды могут быть модифицированы, например такие как псевдоуридин и 5-метилцитидин. Модификации природной РНК зависят от контекста [100]. Это означает, что они могут оказывать различные эффекты на разные РНК, и эти эффекты могут также зависеть от того, где они находятся в РНК (например, НТО, кодирующая последовательность).

Транспортная РНК представляет собой наиболее сильно модифицированную подгруппу РНК. В тРНК млекопитающих модифицировано до 25% нуклеотидов, что обеспечивает их длительную стабильность в цитоплазме. Кроме того, такая модификация нуклеотидов позволяет клеточной мРНК избегать активации врождённого иммунитета. Так, например, Карико и соавт. было показано, что цитоплазматическая мРНК приводит к небольшой индукции IFN- α , в то время как тРНК не индуцировала какого-либо определяемого уровня IFN- α [99]. С тех пор, модифицированные нуклеотиды широко используются в терапевтических мРНК для смягчения иммунного ответа, опосредованного RIG-1 рецепторами [101]. В качестве модифицированных нуклеотидов обычно используются 5-метилцитидин (m5C), псевдоуридин (Ψ) и N(1)-метилпсевдоуридин (m1 Ψ) [73].

Псевдоуридин и N(1)-метилпсевдоуридин

Псевдоуридин (Ψ) является первым модифицированным нуклеотидом, который обнаружили почти 60 лет назад, он присутствует во многих клеточных РНК, например в тРНК и рРНК [102], [103] (рис.8).

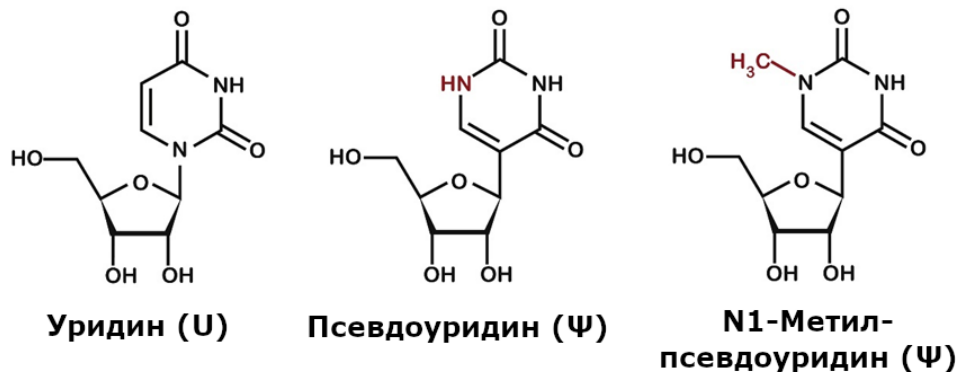


Рисунок 8. Структура уридина, псевдоуридина и N1-метилпсевдоуридина

Псевдоуридин является изомером уридина (5'-рибозилурацил), который образуется путем изомеризации. Изомеризация катализируется ферментами псевдоуридинсинтазами [104].

Химические свойства Ψ отличаются от свойств уридина. Например, Ψ делает фосфодиэфирный остов более жестким, а спаривание оснований между Ψ и аденином сильнее, чем между уридином и аденином. Из-за этих свойств присутствие Ψ в мРНК может влиять на локальные вторичные структуры и, соответственно, на сплайсинг пре-мРНК, трансляцию и стабильность мРНК [105]. Например, основная роль псевдоуридилрования в тРНК заключается в повышении их стабильности благодаря описанным химическим свойствам Ψ [106]. Псевдоуридины были обнаружены во всех частях мРНК, включая 3'-НТО, кодирующей области и 5'-НТО-области. Их роль до конца не известна, но замечено, что Ψ значительно увеличивает время полужизни мРНК во время теплового шока [107] и, как предполагается, обеспечивает более высокую трансляционную способность некоторых мРНК [73].

N1-метилпсевдоурин (сокращенно m1Ψ) впервые был обнаружен в тРНК архей [108]. Он образуется из псевдоуридина при помощи псевдоурин-N1-метилтрансферазы.

Использование m1Ψ и Ψ в мРНК вакцинах было предложено Карико [99]. Было показано, что m1Ψ больше снижает активацию иммунного ответа на мРНК, и приводит к более высокому уровню трансляции белка. Кроме того, в другой работе показано, что при транскрипции *in vitro*, модифицированные нуклеотиды могут встраиваться ошибочно, но m1Ψ встраивается с большей точностью, чем Ψ [109].

Способность m1Ψ и родственных модификаций снижать иммуногенность синтетической мРНК объясняется как минимум несколькими механизмами.

А) Снижение синтеза антисмысловой РНК. При транскрипции, T7 РНК-полимераза иногда использует произведенную ею РНК для «самопраймирования», что приводит к синтезу небольших количеств дуплексной антисмысловой мРНК [110]. Было показано, что псевдоурин снижает образование дцРНК, по сравнению с обычным уридином [111].

Б) Изменение взаимодействия одноцепочечной РНК с иммунными рецепторами. В иммунных клетках одноцепочечная полиуридиновая РНК воспринимается TLR7 и является одним из наиболее мощных индукторов интерферона [112]. Псевуридин и метил-псевдоурин имеют измененную структуру, что нарушает взаимодействие с иммунными сенсорами, например TLR7.

N6-метиладенозин

N6-метиладенозин (m6A) является наиболее распространенной внутренней меткой эукариотической матричной РНК. Впервые он был обнаружен в 1974 г. как основная форма внутреннего метилирования мРНК млекопитающих [113] (рис.9). В клетках модификация m6A устанавливается метилтрансферазами m6A, такими как METTL3/14/16, RBM15/15B, ZC3H3, VIRMA, CBLL1, WTAP и KIAA1429, и удаляется деметилазами, включая FTO и ALKBH5. Он

распознается m6A-связывающими белками YTHDF1/2/3, YTHDC1/2, IGF2BP1/2/3 и HNRNPA2B1. Модификация m6A идентифицирована как один из посттранскрипционных регуляторных маркеров в различных типах РНК [114]. Она играет важную регуляторную роль в разнообразных молекулярных процессах, таких как транскрипция, сплайсинг пре-мРНК, экспорт мРНК, стабильность мРНК и трансляция. Основная локализация модификаций m6A в мРНК – последние экзоны, область стоп кодона и 3'НТО. Нарушение метилирования m6A может привести к обширному спектру заболеваний, от нарушения гемопоэза до онкологии. Данная модификация играет важнейшую роль в регуляции транскриптома клетки и жесткой регуляции экспрессии генов [115].

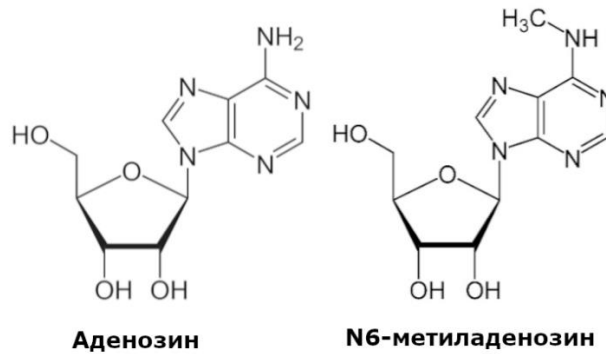


Рисунок 9. Структура аденозина и N6-метиладенозина

Использование N6-метиладенозина в контексте мРНК-вакцины спорно, и скорее всего мало применимо, так как при матричном синтезе *in vitro* мы не можем выбирать, куда устанавливать данные модификации и как правило их использование может приводить к снижению уровня транслируемого белка.

5-метилцитидин

В эукариотических клетках 5-метилцитидин (m5C) является эпигенетической модификацией мРНК и играет важную роль в различных биологических процессах, включая контроль стабильности РНК, синтез белка и регуляцию транскрипции (рис.10). Было обнаружено, что m5C играет роль не только в регуляции стабильности мРНК, но и в регуляции стабильности рРНК и тРНК. На молекулярном уровне m5C стабилизирует структуры РНК, способствуя укладке оснований и увеличивая термическую стабильность водородных связей с гуанином [116]. Таким образом, m5C, присутствующие в рРНК, скорее всего помогают стабилизировать сворачивание рРНК внутри функционально важных областей рибосомы. В большом количестве исследований сообщается, что модификация m5C жизненно важна для регуляции трансляции тРНК и рРНК [117]. В тРНК m5C поддерживает гомеостаз, оптимизирует спаривание кодон-антикодон, регулирует реакцию на стресс и контролирует эффективность и

точность трансляции [118]. У эукариот метилирование цитозинов в мРНК катализируется ферментами семейства доменов NOL1/NOP2/SUN, а также гомологом ДНК-метилтрансферазы DNMT2. Различные исследования показали, что модификации m5C в основном находятся в кодирующей области и обогащены вокруг сайта инициации трансляции [119]. Другое исследование также обнаружило, что модификация m5C локализована в нетранслируемых областях транскриптов мРНК [120]. Нарушение эпигенетического механизма регуляции 5-метилцитидина может привести к множеству заболеваний [121].

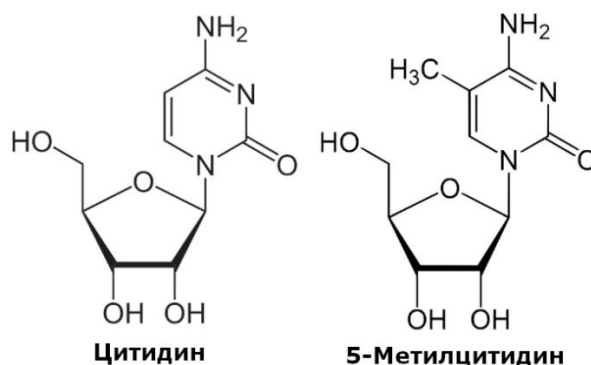


Рисунок 10. Структура цитидина и метилцитидина

В отличие от N6-метиладенозина, использование 5-метилцитидина в мРНК вакцинах эффективно, так как данные модификации могут находиться в любой части мРНК, снижают активацию врожденного иммунного ответа и повышают трансляцию белка.

1.7.2.4 3'Нетранслируемый регион (3'НТО)

3'НТО также содержит множество регуляторных элементов, которые вносят значительный вклад в стабильность и период полураспада мРНК. Длина 3'НТО сильно варьирует - от нескольких десятков до тысяч нуклеотидов. Обычно считается, что более короткая 3'НТО делает транскрипт более стабильным, предположительно из-за потери сайтов связывания микроРНК, что позволяет избежать деградации мРНК. Для эндогенных транскриптов длина 3'-НТО в первую очередь определяется сайтом полиаденилирования и путем альтернативного полиаденилирования [122, 123].

3'-НТО содержит множество цис-регуляторных элементов, таких как AU-богатые элементы, GU-богатые элементы, CU-богатые элементы, CA-богатые элементы, GC-богатые элементы, и элементы, чувствительные к железу [124]. Их функциональные воздействия различно, но в основном направлено на деградацию мРНК.

На сегодняшний день обычно используют 3'НТО из мРНК α - и β -глобина [89, 125]. Кроме того, многочисленные вирусные 3'НТО проверяют на возможность применения в мРНК-вакцинах. Для поисках новых 5'- и 3'НТО разработаны подходы с высокой пропускной

способностью, такие как массовые параллельные анализы и скрининг клеточных библиотек [126, 127].

1.7.2.5 Поли(А)хвост

Большая часть транскриптов мРНК в эукариотах несет поли(А)-хвост на 3'-конце. Полиаденилирование начинается, когда завершается транскрипция гена, то есть образование первичного транскрипта. Перед началом полиаденилирования особый мультисубъединичный белковый комплекс садится на сайты полиаденилирования или альтернативного полиаденилирования, проводит расщепление данного участка, и на образовавшемся 3'-конце компонент белкового комплекса поли(А)-полимераза осуществляет синтез поли(А)-хвоста, используя 3'-концевой нуклеотид как затравку. В клетках млекопитающих наиболее активно транслируемые мРНК содержат от 100 до 250 аденозинов [128].

Поли(А)-хвост играет важную роль в транспорте мРНК из ядра, её трансляции и стабильности. Со временем поли(А)-хвост укорачивается, и, когда его длина становится достаточно малой, мРНК разрушается под действием специальных ферментов.

Полиаденилирование мРНК обеспечивает сайт связывания для множества рибонуклеопротеинов (RNP), таких как поли(А)-связывающий белок (РАВР). Поли(А)-хвост и связанные с ним белки защищают мРНК от ферментативного разрушения. Поли(А)-хвост также играет решающую роль в трансляции мРНК. При инициации трансляции образуется связь между кэпом и поли(А)-хвостом. Эта ассоциация достигается за счет взаимодействия между РАВР и eIF4G, и обеспечивает повторную посадку рибосомы на эту же молекулу мРНК.

Подходящая длина поли(А)-хвоста имеет решающее значение для его связывающей способности с РАВР. Для эффективной трансляции мРНК необходима длина хвоста минимум несколько десятков нуклеотидов. Хотя было описано, что длина поли(А)-хвоста положительно коррелирует с трансляцией мРНК, понятие «чем длиннее, тем лучше» не всегда соответствует действительности [129]. Исследование показало, что более короткая поли(А) последовательность может способствовать формированию замкнутой петли мРНК, способствующей эффективной трансляции [130]. Гистоновые мРНК не имеют поли(А)-хвостов, но содержат структуру «стебель-петля» близко к 3'-концу. Добавление этой структуры «стебель-петля» вместо поли(А)-хвоста, по-видимому, улучшает трансляционный потенциал синтетической мРНК. Поскольку поли(А)-последовательность влияет на распад мРНК, смешанный поли(А)-хвост с прерывистыми остатками не-А, такими как гуанин, может препятствовать деградации мРНК [131]. Проводятся исследования функционального разнообразия смешанных поли(А)-хвостов в дизайне мРНК-вакцин.

Как и в случае с кэпированием, существует два подхода полиаденилирования синтезированной *in vitro* мРНК – посттранскрипционный и котранскрипционный.

Посттранскрипционный способ подразумевает использование фермента поли(А)-полимеразы для добавления поли(А)-последовательности к 3'-концу мРНК после синтеза *in vitro*. Рекомбинантная поли(А)-полимераза позволяет включать различные аналоги нуклеотидов в состав поли(А)-хвоста, и регулировать длину по времени инкубации фермента. Как правило, используется поли(А)-полимераза *E. coli*, либо дрожжей.

Котранскрипционная стратегия основана на кодировании поли(А)-хвоста непосредственно в ДНК-матрице. Использование матрицы ДНК для транскрипции поли(А)-хвоста *in vitro* дает мРНК с определенной длиной поли(А)-хвоста. Таким образом, эта одноэтапная процедура предпочтительна в клинических применениях и в производстве вакцины. Однако длина кодируемого поли(А)-хвоста ограничена, поскольку кольцевая плаزمиды, содержащая длинный гомополимерный участок А, может быть нестабильна при клонировании в *E. Coli*, поэтому в матрицу можно добавить не более 100 остатков аденозина. Чтобы избежать этой нестабильности, была разработана альтернативная методика, состоящая во включении внутреннего линкера из 10 случайных нуклеотидов, в поли(А)хвост, например 30(A)GCATATGACT70(A). Кроме того, стоит учитывать выбор экзонуклеазы рестрикции, необходимый для линейаризации матрицы. Это может привести к появлению замаскированного поли(А)-хвоста, потому что расщепление стандартными рестрикционными ферментами оставляет несколько нуклеотидов, отличных от А. Чтобы преодолеть это препятствие, можно использовать рестрикционные ферменты типа PIS, поскольку их сайты расщепления и последовательности узнавания разделены [132]. Альтернативно, матрица для синтеза мРНК может быть получена с помощью ПЦР с использованием прямого праймера, расположенного выше T7 промотора, и обратного праймера, содержащего поли(Т) последовательность, следующую за 3'-концом.

1.7.3 Механизм работы мРНК-вакцины

Так как мРНК-вакцина является синтетическим аналогом клеточной мРНК, её механизм трансляции будет аналогичен. Для трансляции большинства эукариотических мРНК необходим кэп на 5'-конце РНК, на который садится малая субъединица рибосомы 40S с последующим процессом сканирования стартового кодона [133]. Этот каноничный кэп-зависимый путь сканирования начинается со сборки 43S преинициаторного комплекса (PIC) на 5'-конце кэпированной мРНК, состоящего из малой субъединицы рибосомы и факторов инициации трансляции (eIF). После присоединения мРНК 43S PIC сканирует 5'НТО мРНК до тех пор, пока не обнаружит стартовый кодон в Р-сайте 43S PIC. За узнаванием стартового кодона следует присоединение большой субъединицы рибосомы (60S) и образование комплекса 80S, способного

к элонгации. При элонгации трансляции рибосома активно движется по кодирующей области мРНК, используя тРНК для синтеза полипептидов. Элонгация трансляции обеспечивается факторами элонгации eEF1 и eEF2, которые доставляют тРНК, загруженную аминокислотами к А-сайту рибосомы, и катализируют рибосомную транслокацию соответственно [134]. Скорость движения рибосомы регулируется различными цис- и транс- регуляторными факторами. Терминация трансляции запускается, когда рибосома достигает стоп-кодона, и он распознается эукариотическими факторами высвобождения рибосомы [135]. Впоследствии фактор рециркуляции рибосом приводит к диссоциации рибосомы от мРНК. В некоторых случаях 40S субъединица может остаться связанной с мРНК и запускать второй раунд трансляции с нижестоящего стартового кодона. Этот процесс называется реинициацией.

В случае мРНК-вакцины, мРНК доставляется каким-либо способом (см раздел 1.7.5) в цитоплазму клеток. После проникновения мРНК в клетку происходит ее трансляция с использованием клеточного механизма синтеза белка (рис.11). Трансляция может происходить как на рибосомах, находящихся в цитоплазме в свободном виде, так и на ассоциированных с мембранами эндоплазматического ретикулума. Далее, синтезированный белок может реализоваться несколькими путями. В первом случае, он поступает в протеасому, где подвергается процессингу и расщепляется на пептиды – антигенные эпитопы. Далее эпитопы переносятся в просвет эндоплазматического ретикулума с помощью транспортных белков ТАР (transporter associated with antigen processing), где связываются с образующимися молекулами МНС I класса. Образовавшийся комплекс в составе везикулы направляется к плазматической мембране клетки и экспонируется на поверхности клетки, где распознается рецепторами CD8⁺-цитотоксических лимфоцитов, что приводит к стимуляции специфического цитотоксического клеточного ответа. Во втором случае, синтезированный белок может попасть в лизосомы, где антиген расщепляется на пептидные фрагменты под действием кислых протеаз. Лизосома сливается с везикулой, которая несет молекулу МНС II класса. Внутри этой структуры образуется комплекс эпитопа с МНС II. Комплекс транспортируется к мембране клетки и выносится на поверхность, где распознается рецепторами CD4⁺-лимфоцитов. В результате происходит активация как Т-хелперного ответа, так и гуморального иммунитета (активация В-лимфоцитов). В третьем случае белок может секретироваться из клетки и, встречаясь с В-лимфоцитом, активировать гуморальный иммунный ответ, т. е. синтез антител [136].

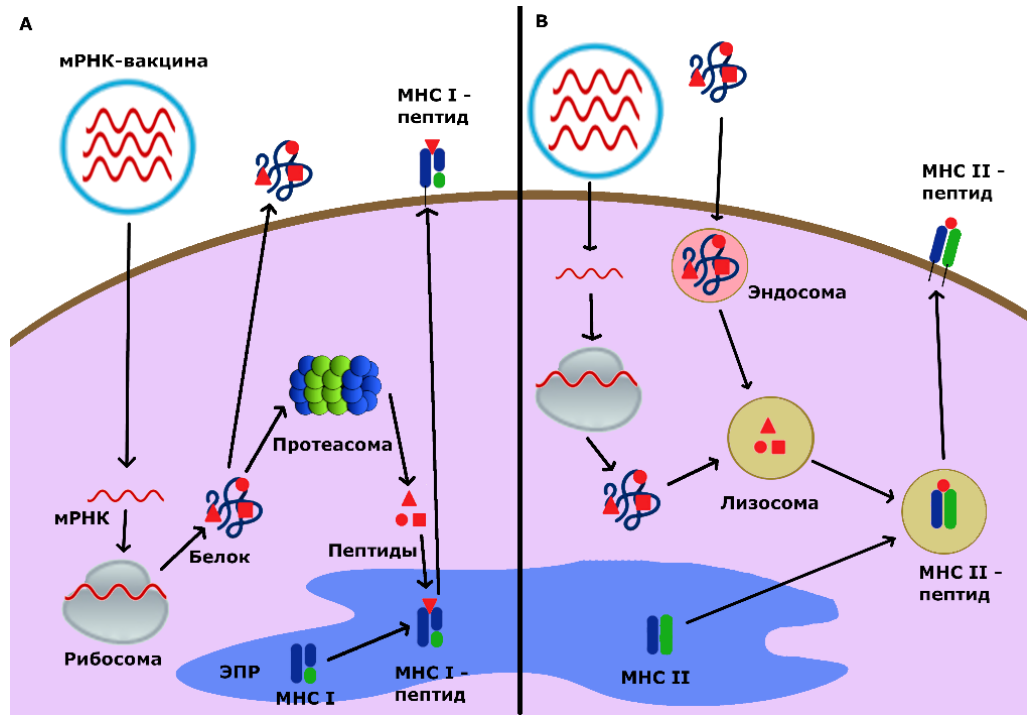


Рисунок 11. mRNA-вакцинация и презентация антигена. А – клетки мышцы; Б – антигенпрезентирующие клетки

1.7.4 Взаимодействие mRNA с системой врожденного иммунитета

mRNA сама по себе не является специфическим антигеном, на который будет активироваться иммунный ответ, это всего лишь чужеродная молекула, которая несет информацию об антигене. Но организм имеет ряд защитных систем от любых чужеродных агентов, так как любые из них потенциально могут нести вред (рис.12). Первой линией защиты организма от чужеродных агентов является врожденный иммунитет. Его задача обнаруживать экзогенные мотивы, называемые патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP), посредством рецепторов распознавания паттернов (PRR). Эти рецепторы присутствуют в различных типах клеток и особенно сильно экспрессируются в антиген-презентирующих клетках (АПК). Через сложный каскад внутриклеточных сигнальных путей PRR регулируют дифференциальную экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов.

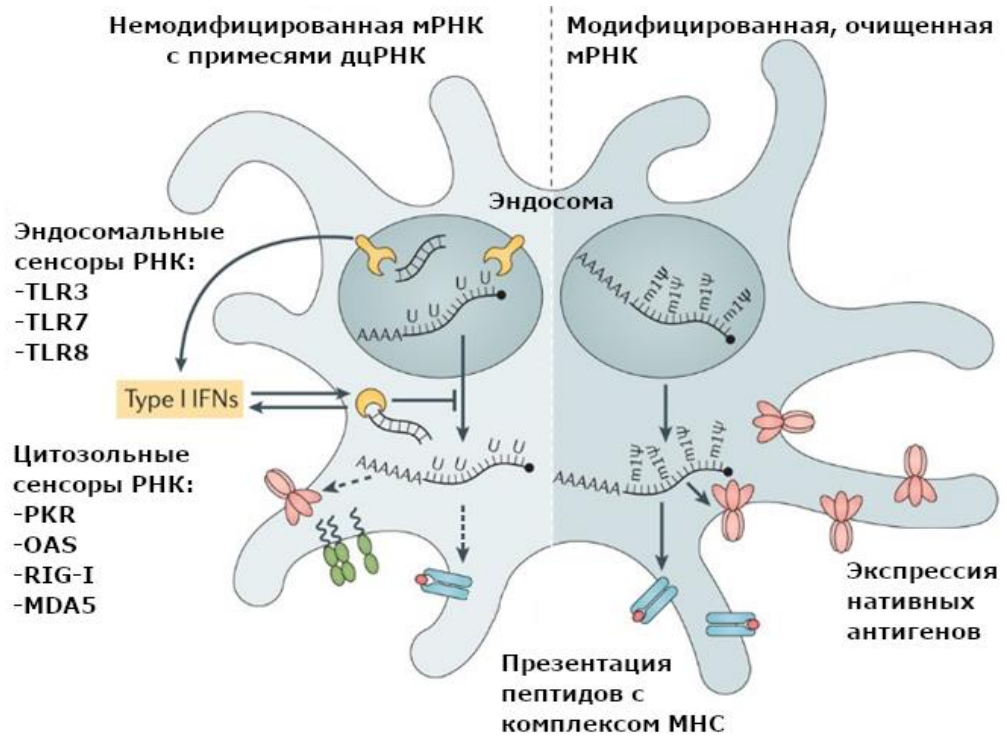


Рисунок 12. Взаимодействие мРНК с системой врожденного иммунитета. А – не модифицированная и неочищенная мРНК. Б – модифицированная и очищенная мРНК. Рисунок адаптирован со статьи [2].

Существует два основных класса PRR: внеклеточные и внутриклеточные, которые могут различать PAMP на двух уровнях соответственно. К внеклеточным PRR относятся Toll-подобные рецепторы (TLR), которые распознают чужеродные паттерны на поверхности мембраны клеток или в эндосомах. Так, TLR-3 распознает двуцепочечную дцРНК, активируя путь TRIF (TIR-домен, содержащий белок, индуцирующий интерферон 1 типа); TLR-7 и TLR-8 определяют одноцепочечную РНК, активируя путь MyD88 (маркер миелоидной дифференцировки 88), что приводит к продукции IFN- β и провоспалительных цитокинов. TLR-7 связывается с гуанозином и тририбонуклеотидом UUU [137], а TLR-8 с уридином и динуклеотидом UG [138]. U-богатая последовательность мРНК является ключевым элементом для активации Toll-подобных рецепторов [139]

В цитозоле чужеродные РНК воспринимаются другими семействами PRR. Эти подклассы включают RIG-I-подобные рецепторы (индуцируемый ретиноевой кислотой ген 1), NLR рецепторы (рецепторы, подобные домену олигомеризации нуклеотидов), OAS рецепторы (рецепторы олигоаденилатсинтазы) и PKR (РНК-зависимая протеинкиназа).

RIG-I-подобные рецепторы распознают участки дцРНК длиной больше 100 п.н. и тоже приводят к продукции IFN I типа и провоспалительных цитокинов [140, 141, 142, 143]. NLR воспринимает оцРНК и активирует выброс провоспалительных цитокинов [144]. PKR связывается с дцРНК, активирует выброс IFN- α и IFN- β а также ингибирует трансляцию мРНК

через фосфорилирование eIF-2. Протеинкиназа может приводить к отключению трансляции клеточной мРНК после обнаружения дцРНК длиннее 33 пар оснований [145].

OAS связывается с дцРНК и через ряд реакций активирует РНКазу L [146], которая, в свою очередь, расщепляет чужеродную РНК в том числе терапевтическую мРНК.

Таким образом, активация большинства РНК-зависимых PRR приводит к продукции IFN I типа. IFN типа I индуцирует сотни различных IFN-стимулируемых генов, которые нарушают трансляцию мРНК и усиливают ее деградацию, например, IFIT (IFN-индуцируемый белок с тетраэпипептидными повторами). Белки IFIT могут связываться с некэпированными РНК Кэп-0, Кэп-1 [147] или взаимодействовать с eIF3, нарушая трансляцию мРНК и синтез белка. Так что, конструируя последовательности мРНК, следует избегать чрезмерной активации врожденной иммунной системы, чтобы инициировать адаптивный иммунный ответ [7, 73].

Таким образом, системы врожденного иммунитета могут активироваться при взаимодействии с синтезированной мРНК тремя основными путями:

- 1 - уридин-зависимое распознавание различных видов РНК [138];
- 2 - распознавание двухцепочечной РНК (дцРНК) [147, 149].
- 3 – распознавание некэпированного 5'-конца мРНК [79, 150].

При производстве мРНК вакцин на каждый пункт разработано ряд подходов, для обхода активации рецепторов врожденного иммунитета.

Как ранее уже было сказано, в синтетической мРНК весь уридин заменяют на псевдоуридин либо на его производное m1Ψ. Модифицированные нуклеотиды ослабляют активацию различных сенсоров дцРНК, включая TLR3, RIG-I, PKR, и OAS. Кроме снижения неспецифического иммунного ответа, эти замены также увеличивают продукцию белка из мРНК [73].

Несмотря на преимущества модифицированных нуклеотидов, немодифицированная мРНК также может обеспечивать устойчивую экспрессию белка [96]. Компания CureVac разработала стратегию конструирования последовательностей, в которых минимизируют уридин и увеличивают содержание GC путем замены кодонов синонимичными, тем самым способствуя высокому синтезу антигена, и уменьшая обнаружение рецепторами. Этот подход, безусловно, может уменьшить вызванное уридином воспаление после доставки мРНК, но не даёт 100% результата, поскольку все уридины не могут быть удалены из последовательности мРНК. Возможно, этим объясняются различия в реактогенности и иммуногенности мРНК-вакцины CureVac против COVID-19 по сравнению с вакцинами Moderna и Pfizer/BioNTech [151, 152].

Другим компонентом мРНК-вакцины, который может значительно способствовать распознаванию врожденным иммунитетом, является дцРНК. Транскрипция мРНК *in vitro* с помощью T7 РНК-полимеразы даёт не только желаемую мРНК, но также множество

нежелательных видов РНК, включая различные короткие абортивные транскрипты, а также антисмысловые РНК, транскрибированные с конца ДНК-матрицы без промотора [7, 110]. дцРНК можно удалить из синтезированной мРНК с помощью определенных методов очистки. Хотя дцРНК не удаляется обычными методами осаждения спиртом, ее количество можно значительно уменьшить с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [7] или с использованием более простых методов, таких как адсорбция на целлюлозе [153] или расщепить РНКазой III [154]. Включение модифицированных нуклеотидов, таких как Ψ, m¹Ψ и 5-метилцитидин может снижать образование побочных продуктов дцРНК в препаратах мРНК, транскрибируемых T7 [155]. Снижение концентрации Mg²⁺ (с 30 мМ до 5 мМ) в реакционной смеси и проведение транскрипции при более высокой температуре (~50–55°C по сравнению с 37°C) с термостабильной РНК-полимеразой T7 также снижает содержание примесей дцРНК в реакционной смеси [156].

Что касается 5' конца РНК, для эффективной трансляции белка необходимо кэпировать мРНК одним из способов, указанных в соответствующем разделе.

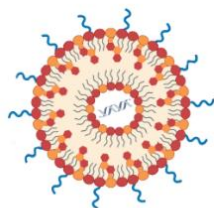
1.7.5 Доставка мРНК-вакцины

Для выполнения своей функции, мРНК-вакцина должна попасть в цитоплазму клетки, что является очень сложной и важной проблемой, 100% решение которой до сих пор не найдено. Чтобы достичь цитоплазмы, мРНК должна пройти через отрицательно заряженный фосфолипидный бислой клеточной мембраны и попасть на рибосомы, где будет транслироваться целевой белок. Как уже было сказано, экзогенная голая мРНК распознается иммунной системой, активирует ряд механизмов и быстро разрушается нуклеазами, тем самым значительно снижая фармакологические эффекты мРНК-вакцины.

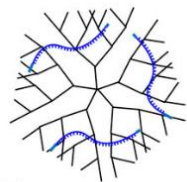
В принципе, для иммунизации можно использовать вакцины на основе «голой» мРНК, растворённой в буфере, например физиологическом растворе или растворе Рингера с последующей инъекцией непосредственно в организм [2]. До конца не ясно, как «голая» мРНК проникает через клеточную мембрану [157]. Некоторые авторы считают, что интернализация у незрелых дендритных клеток осуществляется посредством клеточного процесса, известного как микропиноцитоз [158]. Другие, что это происходит посредством гидростатического давления, предполагая, что оно может привести к разрушению клеточной мембраны и облегчить цитозольную доставку нуклеиновых кислот [159]. Введение «голой» мРНК, особенно не модифицированной, внутримышечно будет малоэффективно, так как она быстро активирует клеточные рецепторы системы врожденного иммунитета и быстро деградирует. Однако, введение «голой» мРНК может быть эффективно непосредственно в органы иммунной системы, такие как лимфоузлы, под контролем УЗИ или хирургическим способом [160].

Для повышения иммунной эффективности мРНК-вакцин необходимы специальные системы доставки, защищающие введенную мРНК от нуклеаз и обеспечивающие доставку в клетки [161, 162, 163]. Способы доставки мРНК-вакцины разделяются на химические, которые заключаются в использовании различных носителей, для защиты и транспорта мРНК, например липиды, полимеры, и т.д., а также физические, к которым относится электропорация, сонопорация, «генная пушка», магнитофекция и др (рис.13).

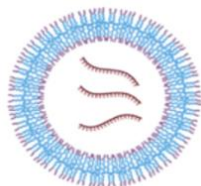
Химические способы доставки мРНК



Липидные наночастицы

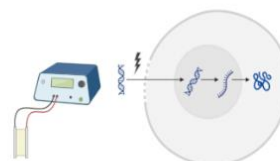


Дендримеры



Полимеры

Физические способы доставки мРНК



Электропорация



Сонопорация



Генная пушка

Рисунок 13. Способы доставки мРНК

Физические методы доставки, как правило, не требуют упаковки мРНК в какой-либо носитель, а для доставки в клетки используются различные физические явления.

Классическим представителем физического метода доставки нуклеиновых кислот является «генная пушка». Она основана на бомбардировке клеток различными металлическими частицами, к которые покрываются нуклеиновыми кислотами. В качестве металлических частиц, то есть носителя, используют микрочастицы золота, вольфрама или серебра диаметром около 1 мкм. Серьёзным недостатком генных пушек является высокая травматизация тканей-мишеней, часто приводящая к гибели трансфицированных клеток [164].

Электропорация представляет собой применение импульсов напряжения, которые генерируют электрическое поле между двумя электродами. Это нарушает целостность клеточной мембраны, вызывая перераспределение зарядов на мембране с последующим формированием

пор, через которые внутрь клетки диффундируют молекулам мРНК [165]. Основным препятствием использования электропорации *in vivo* также является повышенная гибель клеток, подвергшихся действию электрического поля.

Химические способы доставки представляют собой группу наиболее часто используемых способов доставки мРНК. Самый распространённый способ доставки, который использовали в своих мРНК вакцинах Pfizer и Moderna - это липидные наночастицы (ЛНЧ). ЛНЧ инкапсулируют мРНК, защищают ее от деградации и эффективно доставляют молекулы мРНК в клетку посредством эндоцитоза, за счёт слияния с мембраной [166]. ЛНЧ состоят из четырёх основных компонентов: катионные ионизируемые липиды, полиэтиленгликоль, фосфолипиды и холестерин.

Важным компонентом частиц являются катионные ионизируемые липиды. Именно они необходимы для образования комплексов с отрицательно заряженной мРНК за счёт электростатических взаимодействий. Именно поиск липида с подходящей константой диссоциации кислоты (pK_a) позволил использовать ЛНЧ в терапевтических целях [167]. При взаимодействии с мРНК, липид принимает нейтральный заряд при pH 7,4 в крови, тем самым ослабляя токсичность для организма, а при попадании в цитоплазму, где pH снижается до 6,5, происходит диссоциация и высвобождение мРНК. Так, компания Moderna путем длительных исследований получила катионный ионизированный липид SM-102 [168] а Pfizer ALC-0315 [169].

Молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ) необходимы для экранирования остаточного заряда на поверхности ЛНЧ. Также они обеспечивают коллоидную стабильность и предотвращают связывание частиц с белками крови, тем самым, обеспечивая более длительное пребывание частиц в системном кровотоке [170]. ПЭГ-липиды могут также повышать стабильность ЛНЧ при хранении, предотвращая их физическую агрегацию в растворе.

Фосфолипиды обеспечивают двухслойную структурную стабильность ЛНЧ, снижают токсичность и участвуют в слиянии с клеточной мембраной [171].

Холестерин представляет собой нейтральный липид, который повышает стабильность бислоя за счет повышения его жесткости и предотвращения утечки терапевтического ингредиента. Кроме того, считается, что он играет роль в слиянии мембран с ЛНЧ [163].

Для получения ЛНЧ, мРНК, растворенную в водном буфере с низким pH~4,0, смешивают в микрофлюидной системе со смесью липидов в спиртовом растворе. При замещении спиртовой фазы водной происходит упаковка мРНК в частицы. Стоит отметить, что соотношение четырех типов липидов строго регламентировано, и у каждой коммерческой мРНК оно своё.

Несмотря на то, что на сегодняшний день мРНК-вакцины получили распространение благодаря технологии ЛНЧ, они требуют соблюдения отрицательных температур при хранении и транспортировке, а также имеют ограниченный срок годности. Например, срок годности у

вакцины Moderna до 6 месяцев при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; до 30 дней при $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$, до 12 ч при комнатной температуре, а у Pfizer-BioNTech до 6 месяцев при $-80\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$; до 5 суток при $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ и не более 2 ч при комнатной температуре. Стоит также отметить сложность и дороговизну производства компонентов липидных наночастиц.

Кроме того, критическим моментом в применении ЛНЧ является их безопасность для человека. Несмотря на тщательный поиск нетоксичных составов липидов, после вакцинации населения Европы и США мРНК-вакцинами наблюдались случаи тяжелых побочных эффектов. С высокой долей вероятности, эти случаи были связаны именно с липидами, входящими в состав вакцины [172]. В частности, положительно заряженные липосомальные частицы могут связываться с отрицательно заряженными белками и прикрепляться к поверхности клетки, тем самым способствуя дестабилизации плазматической мембраны. Для реализации своей функции, мРНК-вакцины должны попадать в АПК, но из-за природы липидов, они могут связываться практически с любыми клетками, тем самым вызывая побочные эффекты у вакцинированного человека [173, 174].

1.8 Разрабатываемые мРНК-вакцины против гриппа и COVID-19

На конец 2023 года кроме мРНК-вакцин компаний Moderna и Pfizer было разрешено к применению еще две мРНК-вакцины, это китайская вакцина AWcorna от Walvax Biotechnology [151] и индийская HGC019 от Gennova Biopharmaceuticals и HDT Bio Corp [175]. В отличие от первых двух вакцин, вакцина AWcorna кодирует в себе последовательность RBD белка S коронавируса, а вакцина HGC019 представляет собой самореплицирующуюся мРНК.

Кроме этих четырех в разработке были и другие мРНК-вакцины против COVID-19, но работа над ними была прекращена. Так, компания CureVac предложила другой подход, в реализации мРНК-вакцины. Разработчики предложили не использовать модифицированные нуклеотиды, а провести оптимизацию кодонового состава последовательности белка, с максимальным истощением уридина, поскольку TLR7 и TLR8 в первую очередь распознают GU-богатые одноцепочечные последовательности РНК [96]. мРНК-вакцина ARCT-021 от Arcturus Therapeutics представляет собой самоамплифицирующуюся мРНК, кодирующую нативный S белок SARS-CoV-2 и белки репликации альфа-вируса в ЛНЧ собственной разработки [176]. Планировалось, что для иммунизации будет достаточно однократной дозы вакцины, но эффективность составила всего 62%, и было большое количество побочных эффектов.

Также ведется большое количество лабораторных исследований различных вариантов мРНК вакцин [58, 177, 178, 179].

Что касается мРНК-вакцин против гриппа, пока еще не было одобрено ни одной вакцины для применения, но такие компании как Moderna и Pfizer ведут клинические испытания.

Так, компания Moderna в 2023 году закончила 1 и 2 фазу клинических исследований вакцины mRNA-1083, представляющую собой комбинированную вакцину против сезонного гриппа и COVID-19 [180]. Предварительные результаты показывают иммунный ответ против COVID-19 на уровне их вакцины mRNA-1273, а против гриппа на уровне других коммерческих вакцин. Кроме того, у компании Moderna на 1 или 2 фазе клинических испытаний находится ряд других вакцин против гриппа: mRNA-1010/-11/-12/-20/-30 [181, 182]. Известно, что mRNA-1010 представляет собой 4х-валентную вакцину, содержащую 8 молекул мРНК, кодирующие гемагглютинин и нейраминидазу вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, H3N2, B/Yamagata и B/Victoria.

Также компания Pfizer проводит 1 и 2 фазу клинических испытаний бивалентной мРНК-вакцины PF-07252220, кодирующей гемагглютинин вирусов гриппа A(H1N1)pdm09 и B/Yamagata [183].

Кроме того, различные научные группы также ведут свои разработки мРНК-вакцин против гриппа [184, 185, 186, 187, 188].

1.9 Заключение по обзору литературы

За последние четыре года технология мРНК сделала стремительный рывок. Успешное применение первых двух в мире мРНК-вакцин против COVID-19 подтвердило их преимущества перед другими типами вакцин и показало, что платформа мРНК является безопасным и эффективным инструментом вакцинации. В настоящее время уже десятки мРНК-вакцин находятся на разных стадиях клинических испытаний.

Особо стоит отметить преимущество мРНК-вакцин против инфекций, вызываемых высоко вариабельными патогенами, такими как как вирус гриппа и SARS-CoV-2. Скорость разработки мРНК-вакцин позволяет своевременно реагировать на появление новых вирусов или опасных штаммов.

Однако в нашей стране данная технология еще находится на ранней стадии. Разработки в области мРНК технологии проводятся в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, ИХБФМ СО РАН, ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России и в других учреждениях. Данная диссертационная работа демонстрирует возможность её скорого применения в нашей стране.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Плазмиды, культуры клеток, штаммы бактерий и вирусов

В работе были использованы плазмиды pVAX-RBD, кодирующая RBD белка S вируса SARS-CoV-2, штамм Wuhan-Hu-1; и pVAX-H1, кодирующая белок гемагглютинин вируса гриппа H1N1 без трансмембранного цитоплазматического домена. Все плазмиды были получены в отделе биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия). Так же использовалась коммерческая плазида pHMGFP (Promega Corporation), кодирующая ген зеленого флуоресцентного белка (GFP).

Для анализа функциональности мРНК *in vitro* была использована перевиваемая клеточная линия почки эмбриона человека HEK293, предоставленная отделом «Коллекции микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

Для наработки плазмидной ДНК использовали штамм E.coli NEB Stable F'proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zcf::Tn10 (TetR) Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14-Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC).

Для оценки проективных свойств экспериментальной мРНК-вакцины против гриппа и постановки реакции вируснейтрализации использовался адаптированный к мышам штамм вируса гриппа A/California/04/09 (H1N1) MA8, полученный и депонированный в отделе зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Для постановки реакции вируснейтрализации с сыворотками крови мышей, иммунизированных экспериментальной мРНК-вакциной против COVID-19, использовался штамм вируса SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 выделенный и депонированный в отделе коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Для оценки проективных свойств экспериментальной мРНК-вакцины против COVID-19 использовался штамм вируса SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021, выделенный и депонированный в отделе коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

2.1.2 Лабораторные животные

Для исследования иммуногенных и протективных свойств разработанных экспериментальных мРНК-вакцин использовали самок мышей линии BALB/c массой 16–18 г, которые были предоставлены питомником ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

Эксперименты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с соблюдением требований Федерального закона от 27.12.2018 N 498-ФЗ (ред. от 14.07.2022) "Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации", Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.), а также с протоколами, утверждёнными Биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»/02-03.2023, Протокол БЭК №2 от 03.04.2023 г.).

2.1.3 Олигонуклеотиды

Все олигонуклеотиды, использованные в работе, были синтезированы БиоСет (г. Новосибирск).

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

Название матрицы	Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Ген	Сайт рестрикции
pVAX-GFP	GFP-F	TTTTTCTAGAGGCGCCACCATGGGCGT	GFP	XbaI
	GFP-R	TTTTTGAATTCCTATTAGCCGGCCTGGCG		EcoRI
pVAX-β-GFP	GFP-F	TTTTTCTAGAGGCGCCACCATGGGCGT	GFP	XbaI
	GFP-β-R	TTTTGGATCCCTATTAGCCGGCCTGGCG		BamHI
pVAX-βM-GFP	GFP-βM-F	TTTTTAGAGCTCAAATTAATACGACTCACT ATAAGGGAATAAGAGAGAAAAGAAGAG TAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCGC CACCATGGGCGTGAT	GFP	Psp124BI
	GFP-β-R	TTTTGGATCCCTATTAGCCGGCCTGGCG		BamHI
pVAX-C1-GFP	C1-GFP-F	TTTTTGAGCTCAAATTAATACGACTCACTA TAAGAGAATAAACTAGTATTCTTCTGGTCC CCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACCAT GGGCGT	GFP	Psp124BI
	C-GFP-R	TTTTGGATCCCTATTAGCCGGCCTGGCG		BamHI
pVAX-C2-GFP	C2-GFP-F	TTTTTGAGCTCAAATTAATACGACTCACTA TAAGGCGCGCCTAGCAGTGTCCCAGCCGG GTTCGTGTCGCCGCCACCATGGGCGT	GFP	Psp124BI
	C-GFP-R	TTTTGGATCCCTATTAGCCGGCCTGGCG		BamHI

pVAX-C3-GFP	C3-GFP-F	TTTTTAGAGCTCAAATTAATACGACTCACT ATAAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAG TAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCGC CACCATGGGCGTGAT	GFP	Psp124BI
	C-GFP-R	TTTTGGATCCCTATTAGCCGGCCTGGCG		BamHI
pVAX-C3-H1	C3-H1-F	TTTTTAGAGCTCAAATTAATACGACTCACT ATAAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAG TAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCGC CACCATGAAGGCCATCCTGGTG	H1	Psp124BI
	C3-H1-R	TTTTTGGATCCTTATCACAGAAAGGTAGAC AGCAGCA		BamHI
pVAX-C1-RBD	C1-RBD-F	TTTTTTTAGAGCTCAAATTAATACGACTCA CTATAAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAG AGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCC GCCACCATGATGCGGACA	RBD	Psp124BI
	C1-RBD-R	TTTTTGGATCCTTAGTTGAAGTTCACGCAT TTGTTCT		BamHI

2.1.4 Нуклеотидные последовательности нетранслируемых областей

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности нетранслируемых областей

Название области	Последовательность (направление 5' - 3')
5'α-глобина	GAGAATAAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAA GGC
3'α-глобина	GCTGGAGCCTCGGTGGCCTAGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCC AGCCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCCCGTGGTCTTTGAAT AAAGTCTGAGTGGGCGGC
5'CYBA	CGCGCCTAGCAGTGTCCCAGCCGGGTTCGTGTCCGC
3'CYBA	CCTCGCCCCGGACCTGCCCTCCCGCCAGGTGCACCCACCTGCAAT AAATGCAGCGAAGCCGGGA
5'ChM (химерная последовательность Moderna)	GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACC CCGGC

3'β-глобина	TAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCCSTTTGTT CCSTAAGTCCAАСТАААСТGGGGGATATTATGAAGGGCCTTG AGCATCTGGATTCTGCСТААТААААААСАТТТАТТТТСАТТGC
-------------	--

2.1.5 Коммерческие наборы, ферменты и реактивы

- 5-метилцитидин (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия);
- Anti-Influenza A H1N1 hemagglutinin antibody [C102 (IV.C102)] (abcam, США);
- BSA (VWR International LLC, США);
- Cellulose (Sigma-Aldrich, США);
- FBS (HyClone, США);
- Goat Anti-Mouse IgG Antibody, (H+L) HRP conjugate, AP308P (Sigma-Aldrich, США)
- L-глутамин (ПанЭко, Россия);
- N1-метилпсевдоуридин (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия);
- N6-метиладенозин (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия);
- TEMED (Bio-Rad, США);
- Zoletil 100 (Virbac, Франция);
- Аналог структура кэпа ARCA (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия);
- Аналог структуры кэпа m7GmAmG (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия);
- Белковый маркер Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, США);
- Буфер для быстрого лигирования 5X Quick ligation buffer (Евроген, Россия);
- Высокоактивная ДНК-лигаза фага T4 (Сибэнзим, Россия);
- Гентамицин (ПанЭко, Россия);
- Гриппозная вакцина Флю-М (ФГУП СПБНИИВС ФМБА России, Россия, 2021 год)

Состав вакцины: A/Victoria/2570/2019 (H1N1) pdm09-подобный штамм, A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)-подобный штамм и B/Washington/02/2019 (B/Victoria)-подобный штамм.

- ДНК-зависимая РНК-полимераза T7 (БиоЛабМикс, Новосибирск);
- Ингибитор РНКаз (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия);
- Канамицин сульфат (CDH, Индия);
- Краситель трипановый синий (Bio-Rad, США);
- Кроличьи антимышиные IgG-антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США);
- Маркер молекулярного веса ДНК M12 (Сибэнзим, Россия);

- Моноклональные мышинные антитела J2 против дцРНК (Jena Bioscience, Германия);
- Набор Cleanup Standard для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (Евроген, Россия);
- Набор IFN- γ ELISpot, (МАВТЕСН, Швеция);
- Набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid miniprep (Евроген, Россия);
- Набор для выделения РНК на колонках (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия);
- Набор для определения IFN- α мыши (Blue Gene, Китай);
- Набор для проведения ПЦР БиоМастер HS-Тaq ПЦР-Color (2 \times) (Биолабмикс, Россия);
- Набор для синтеза мРНК T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CellScript, США);
- Набора для высокоэффективного синтеза РНК *in vitro* (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия);
- Реагент для трансфекции эукариотических клеток Lipofectamine MessengerMAX (Thermo Fisher Scientific, США);
- Среда Лимфоген (ПанЭко, Россия);
- Среда RPMI-1640 (ПанЭко, Россия);
- Субстрат 1-Step™ NBT/BCIP Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific, США);
- Субстрат ECL Select Western Blotting Detection Reagent, (GE Healthcare, США);
- Субстрат ТМВ (Amresco LLC, США);
- Термолабильная ДНКаза (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия);
- Эндонуклеазы рестрикции BamHI, Bso31I, EcoRI, MfeI, Psp124BI, XbaI, в комплекте с буферами, (Сибэнзим, Россия);

2.1.6 Растворы и буферы

- LB-бульон: на 1 л: триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 5 г, pH 7,5 – 7,6;
- Блокирующий буфер: 1% бычьего сывороточного альбумина в буфере PBST;
- Буфер PBST: 0.1% Tween-20 в PBS;
- Буфер для загрузки образцов белка в полиакриламидный гель: 12% SDS, 0,06% бромфенолового синего, 47% глицерина, 60 мМ Трис-НСl pH 6,8;
- Буфер для лизиса эритроцитов (Sigma, США);
- Буфер для очистки мРНК от примесей дцРНК: 10 мМ HEPES (pH 7.2), 0,1 мМ ЭДТА, 50 мМ NaCl и 20% этанола;
- Концентрирующий гель для SDS-ПААГ: 30% акриламид, 0,5 М ТрисНСl pH=6,8, 50 мг персульфата аммония, 1 мкл/мл TEMED;

- Питательная среда DMEM для культивирования клеток (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% FBS (HyClone, США) и 50 мг/мл гентамицина;
- Питательная среда RPMI-1640: в 1 флаконе стерильной жидкой среды RPMI-1640 (450 мл) растворяли 1 флакон сухого L-глутамина (150 мг), добавляли 562,5 мкл раствора гентамицина (50 мкг/мл);
 - Плотная питательная среда: LB-бульон, 1,8 % агара;
 - Разрешающий гель для SDS-ПААГ: 44% акриламид, 1,5 М Трис-HCl (pH=8,8), 50 мг персульфата аммония, 1 мкл/мл TEMED;
 - ТАЕ-буфер для электрофореза ДНК в агарозном геле: 40 мМ Трис-(гидроксиметил) аминотетан, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0;
 - Электродный буфер для иммуноблоттинга: 38 мМ Трис-HCl, 48 мМ глицин, 0,05% SDS, 20% этанол, pH 8,3;
 - Электродный буфер для электрофореза белков в SDS-ПААГ: 25 мМ Трис-(гидроксиметил) аминотетан, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, pH 8,3;

2.2 Методы

2.2.1 Получение ПЦР-продуктов для клонирования в плазмидный вектор pVAX, pVAX-C1, pVAX-C2, pVAX-C3 и др.

Для клонирования целевых генов в составе конструкций проводилась ПЦР. В качестве матриц для ПЦР использовались плазмиды pHMGFP, pVAX-N1, pVAX-RBD и соответствующие пары праймеров. В структуру праймеров (таблица 1) были заложены сайты рестрикции XbaI (прямые праймеры) и BamHI (обратные праймеры) для клонирования в составе векторов «pVAX-C». Для получения варианта ДНК матриц без лишних вторичных структур использовались длинные прямые праймеры (GFP-βM-F, C1-GFP-F, C2-GFP-F, C3-GFP-F, C3-N1-F, C1-RBD-F), содержащие в своей структуре необходимые 5'-нетранслируемые области и сайт рестрикции Psp124BI. Амплификацию проводили с использованием БиоМастер HS-Тaq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, Россия) по протоколу производителя. ПЦР проводили на амплификаторе Veriti (Thermo Fisher Scientific, США), используя следующий режим – предварительная денатурация – 98 °С в течение 5 минут, затем 30 циклов: 98 °С – 10 секунд, 57 °С – 20-30 секунд, 72 °С – 45-60 секунд, финальная элонгация при 72 °С в течение 10 минут. После проведения ПЦР, полученные продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1%-м агарозном геле с последующим выделением целевого продукта из геля с использованием набора «Cleanup Standard» (Евроген, Россия).

2.2.2 Электрофоретический анализ плазмидной ДНК или мРНК в агарозном геле

Электрофоретический анализ ДНК или мРНК проводили в электрофорезной горизонтальной камере (BioRad) при напряженности электрического поля 6 В/см в течение часа, используя 1 % агарозный гель для ДНК и 2 % агарозный гель для мРНК в буфере TAE. Для визуализации нуклеиновых кислот гель окрашивали бромистым этидием (0,5 мкг/мл) и проявляли в системе визуализации iBright CL1500 (Thermo Fisher Scientific, США). Для выделения продукта ПЦР из агарозного геля использовали коммерческий набор «Cleanup Standard» (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя.

2.2.3 Измерение концентрации нуклеиновых кислот

Концентрацию и степень чистоты плазмидной ДНК или мРНК определяли на спектрофотометре NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США). Для этого 2 мкл исследуемого образца помещалось на пьедестал для капли, и измерялась оптическая плотность раствора ДНК или РНК при длинах волн 260, 280 и 235 нм, т.е. на максимумах поглощения растворов НК, белков и полисахаридов, соответственно. Для очищенной плазмидной ДНК характерны значения $A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9$ и $A_{260}/A_{235} = 2,2-2,5$. Для очищенной РНК значение $A_{260}/A_{280} = 1,9-2,0$. Согласно полученным результатам, спектрофотометр рассчитывал количество нуклеиновой кислоты в 1 мкл раствора.

2.2.4 Получение ДНК-матриц для синтеза мРНК

Для получения ДНК-матриц, плазмидные вектора (pVAX, pVAX-C1, pVAX-C2 и pVAX-C3 и др.) и ПЦР-продукты, обрабатывались эндонуклеазами рестрикции XbaI и BamHI либо Psp124VI и BamHI (Сибэнзим, Россия), в зависимости от праймеров. Реакционную смесь готовили, исходя из активности фермента (2-5 единиц активности на 1 мкг ДНК) и количества плазмидной ДНК (~3 мкг на реакцию). Условия реакции: температура, состав буфера и длительность проведения ферментативного гидролиза ДНК проводили согласно инструкции производителя. После проведения гидролиза продукты анализировали с помощью электрофореза в 1 %-м агарозном геле с последующим выделением их из геля с использованием набора «Cleanup Standard» (Евроген, Россия).

Лигирование очищенных фрагментов ДНК осуществляли с использованием T4 ДНК лигазы (Сибэнзим) по протоколу производителя.

Полученную лигазную смесь (10 мкл) добавляли к компетентным клеткам *E.coli* Neb Stable, и инкубировали на льду в течение 40 минут. Далее клетки подвергали «температурному шоку» при 42 °С в течение 40 сек. Затем клетки охлаждали на льду в течение 5 минут, добавляли 1 мл среды LB и инкубировали при 37 °С в течение 60 минут. По окончании инкубации

трансформированные клетки высевали на чашку Петри с твёрдой питательной средой LB (среда LB с 1,5% агара), содержащей антибиотик (канамицин 100 мкг/мл).

Выделение плазмидной ДНК из клеток *E.coli* проводили при помощи наборов «Plasmid Miniprep» (Евроген, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей был использован набор «Cleanup Standard» (Евроген, Россия). Отбор клонов, содержащих полученную плазмиду со встроенным геном, проводили методом ПЦР-анализа с соответствующими специфичными праймерами (таблица 1), в зависимости от гена (GFP, H1 или RBD). Для этого часть колонии брали микробиологической петлей, погружали в пробирку содержащую ПЦР-смесь (БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)) с соответствующими парами праймеров, и ставили в ПЦР-амплификатор. Результаты ПЦР оценивали с помощью электрофореза образцов в 1 % агарозном геле. Оставшуюся часть колонии высевали на чашку Петри с твёрдой питательной средой LB, содержащей канамицин (100 мкг/мл).

Структуру полученных рекомбинантных плазмид подтверждали секвенированием по методу Сэнгера [189]. При проведении анализа использовался набор CEQ2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), и 16-капиллярный автоматический секвенатор ABI 3130xl (Applied Biosystems, США). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовалась программа SnapGene 3.2.1 (GSL Biotech LLC, США).

2.2.5 Подготовка матрицы для синтеза мРНК

В качестве матриц для синтеза мРНК использовали получены генетические конструкции, несущие целевые гены под контролем T7-промотора, полученные в результате клонирования. Перед процедурой получения соответствующих мРНК, плазмиды были линейаризованы посредством гидролиза эндонуклеазами рестрикции Bso3II либо EcoRI (Сибэнзим, Россия). Условия реакции: температура, состав буфера и длительность проведения ферментативного гидролиза ДНК – в соответствии с инструкциями производителя. Для очистки линейной формы был проведён электрофорез в 1%-м агарозном геле, с последующим выделением продукта из геля с использованием набора «Cleanup Standard» (Евроген, Россия).

2.2.6 Синтез мРНК *in vitro*

Синтез мРНК проводили с использованием набора для синтеза мРНК T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CellScript, США), в котором используется посттранскрипционное кэпирование и полиаденилирование, или набора для высокоэффективного синтеза РНК *in vitro* (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия), в котором проводится котранскрипционное кэпирование и полиаденилирование.

Перед синтезом проводили линейризацию плазмидных ДНК-матриц по сайту рестрикции EcoRI или Bso31I в зависимости от матрицы. Вектора pVAX-AG-PolyA, pVAX-C1, pVAX-C2 и pVAX-C3 содержали в себе модифицированный T7-промотор (смотри раздел 3.1.2), необходимый для использования AG-Cap-аналога.

Реакционная смесь включала в себя 1 мкг линейризованной матрицы, T7-полимеразу с буфером, ДТТ, смесь рибонуклеотидтрифосфатов (7mM), в которой уридин был заменен на N1-метилпсевдоуридин (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия), ингибитор РНКаз и безнуклеазная вода. Смесь инкубировали в течение 3 часов при температуре 37°C. После инкубации в смесь добавляли 1 мкл ДНКазы I (1 единица активности/мкл) и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °C для разрушения ДНК матрицы. Выделение синтезированной мРНК из реакционной смеси проводили с помощью осаждения путём добавления 5M ацетата аммония, инкубации при -20°C в течение часа и последующей промывкой 70%-м этанолом. Осадок РНК просушивали при комнатной температуре, растворяли в безнуклеазной воде и измеряли концентрацию. Анализ гомогенности и целостности полученного продукта, а также его молекулярного размера проводили с использованием электрофореза в 2%-м агарозном геле.

Ферментативное кэпирование синтезированной РНК проводили с использованием рекомбинантного кэпирующего фермента вируса коровьей оспы, входящего в состав набора T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CellScript, США), согласно инструкции производителя. Для ферментативного полиаденилирования использовали рекомбинантную поли(А)полимеразу A-Plus™ Poly (A), также входящую в T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CellScript, США). В реакционную смесь включали переосажденную РНК, полученную на предыдущем этапе.

При котранскрипционном кэпировании в качестве кэпа в реакционную смесь добавляли AG-Cap-аналог (Аналог кэпа m7GmAmG (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия)) либо ARCA (аналог структуры кэпа ARCA (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия)) в конечной концентрации 6 mM.

Затем полученную мРНК очищали с помощью набора для выделения РНК на колонках (БиоЛабМикс, Новосибирск, Россия) согласно протоколу производителя, измеряли концентрацию и проводили анализ полученного продукта мРНК на соответствие молекулярного размера и целостность с использованием электрофореза в 2%-м агарозном геле.

2.2.7 Трансфекция клеток НЕК293 мРНК-GFP

Клетки НЕК293 выращивали в 24-луночных культуральных планшетах (Corning, США) с питательной средой DMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% FBS (HyClone, США) и 50 мг/мл гентамицина. Монослой 70–80% конфлюэнтных клеток трансфицировали мРНК,

кодирующей белок GFP, H1 или RBD с использованием Lipofectamine MessengerMAX (Invitrogen, США). Трансфицирующий агент смешивали с 1 мкг мРНК, инкубировали в течении 15 минут при комнатной температуре и добавляли к клеткам. Затем клеточные планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 24 часов. В случае мРНК-GFP, уровень флуоресценции оценивали с помощью микроскопа Olympus CKX53 (Olympus, Япония) и с помощью проточного цитометра ZE5 (Bio-Rad Laboratories Inc., США). Результаты обрабатывали с помощью программы Everest software (Bio-Rad, США). В случае мРНК, кодирующей белок H1 или RBD, культуральную среду собирали в стерильные пробирки и оценивали синтез белка с мРНК помощью электрофоретического разделения культуральных белков и последующего иммуноблотинга со специфичными антителами.

2.2.8 Электрофорез и иммуноблотинг культуральной среды после трансфекции клеток мРНК

Электрофоретическое разделение белков из культуральной среды проводили в SDS-ПААГ по Лэммли в редуцирующих условиях [190], в вертикальной камере Mini-PROTEAN (BioRad, США) при постоянном напряжении 130 V. После разделения белков в SDS-ПААГ их переносили на нитроцеллюлозную мембрану для проведения иммуноблоттинга методом полусухого переноса на системе Power Blotter XL (Thermo Fisher Scientific, США). После переноса, мембрану инкубировали в течение ночи при 4°C в блокирующем буфере (1% BSA в PBST). Затем мембрану трижды отмывали в PBST, добавляли специфические моноклональные антитела к гемагглютинуину (Anti-Influenza A H1N1 hemagglutinin antibody [C102 (IV.C102)], abcam) или мышиную сыворотку к RBD и инкубировали при комнатной температуре в течении 30 минут. После мембрану промывали PBST 3 раза и добавляли антитела козы против IgG мышей, конъюгированные с пероксидазой хрена (Goat Anti-Mouse IgG Antibody, (H+L) HRP conjugate, AP308P, Sigma-Aldrich). Мембрану инкубировали 30 минут, промывали PBST и добавляли субстрат к конъюгату ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, США). Результат визуализировали и анализировали с помощью системы обработки изображений IBright FL1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.9 Моделирование вторичной структуры НТО мРНК

Моделирование вторичных структур и расчёт MFE выбранных 5' и 3' НТО высокоэкспрессируемых генов проводил с использованием веб-сервиса ViennaRNA Web Services, используя инструмент «RNAfold Server» сервера UNA MFOLD 3.6 (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>). Моделирование проводили при стандартных параметрах

моделирования и условия температуры фолдинга 37° С. Для линейаризации вторичных структур использовали программу VARNA 3.9 (<http://varna.lri.fr>).

2.2.10 Очистка мРНК от примесей дцРНК

Удаление примесей дцРНК проводили с использованием целлюлозных волокон (С6288, Sigma-Aldrich) и буфера для очистки мРНК, содержащего 10 мМ HEPES (pH 7.2), 0,1 мМ ЭДТА, 50 мМ NaCl и 20% этанола. К целлюлозе добавляли буфер для очистки мРНК, доводили концентрацию целлюлозы до 0,1-0,2 г/мл и ресуспендировали до однородного раствора. Суспензию целлюлозы центрифугировали в течение минуты при 14000g, супернатант сливали. Затем, к целлюлозе добавляли мРНК (из расчёта 1 г целлюлозы на 3 мг РНК) в буфере для очистки мРНК (1 мл буфера на 1 мг РНК) и инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течении 40 минут, центрифугировали и собирали супернатант, содержащий очищенную мРНК. Собранный супернатант пропускали через 0.45-µm фильтр для удаления возможных примесей целлюлозы. Очищенную мРНК пересаждали в спирте с добавлением 3М ацетата натрия в течении часа при -20 °С. Осадок мРНК растворяли в воде, не содержащей нуклеаз.

Для анализа эффективности очистки мРНК, дцРНК элюировали с целлюлозы водой, не содержащей нуклеаз. Для фракций мРНК, которые подвергались дальнейшему анализу, были введены следующие обозначения: исходная неочищенная мРНК после синтеза *in vitro* - (мРНК до очистки), элюат дцРНК с целлюлозы после очистки - (элюат дцРНК) и очищенная мРНК. В качестве положительного контроля использовали препарат дцРНК дрожжей, любезно предоставленный Е.А. Волосниковой, ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора.

2.2.11 Анализ мРНК на биоанализаторе Agilent 2100 BioAnalyser

Степень чистоты, однородности и размер синтетических мРНК оценивали с использованием биоанализатора Agilent 2100 BioAnalyser (Agilent Technologies, США) путём микрочипового электрофореза с набором реагентов Agilent RNA 6000 Pico (Agilent Technologies, Lithuania) согласно протоколу производителя.

2.2.12 Дот-блот анализ дцРНК

Дот-блот анализ проводили следующим образом: на нитроцеллюлозную мембрану наносили по 1 мкл образцов РНК в концентрации 1 мкг/мкл, высушивали в течении 30 минут и проводили обработку (блокировка) мембраны 1% раствором BSA при + 4°С в течении ночи. Затем образец промывали раствором PBST и для обнаружения дцРНК мембрану инкубировали с моноклональным мышинным антителом J2 против дцРНК (Jena Bioscience, Германия) при комнатной температуре в течении часа. После промывки раствором PBST, образец инкубировали с конъюгатом антител козы к IgG мыши со щелочной фосфатазой (Sigma-Aldrich, США) при

комнатной температуре в течении часа. Окрашивание проводили с использованием субстрата 1-Step™ NBT/BCIP Substrate Solution (Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя.

2.2.13 Определение уровня IFN- α

Определение уровня IFN- α в сыворотке лабораторных животных, которым были введены растворы РНК разной степени очистки, проводили с помощью ИФА набора для IFN- α мыши (Blue Gene). Исследование проводили на самцах мышей линии BALB/c. Эксперименты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с протоколами, утверждёнными Биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол БЭК№1 от 21.03.2023). Животные были распределены на 4 группы (по 5 животных в каждой), обозначенные согласно введенной фракции мРНК: 1 – мРНК до очистки; 2- элюат дцРНК; 3 – очищенная мРНК; 4 – физиологический раствор (отрицательный контроль). Препараты вводили мышам инъекционно, внутрибрюшинно, в дозе 50 мкг РНК в 50 мкл физиологического раствора. Через 5 часов после введения у животных собирали кровь из ретро-орбитального синуса и анализировали уровни IFN- α в сыворотке крови с помощью набора ИФА (BlueGene, Biotech) согласно инструкции производителя. Оптическую плотность результатов ИФА измеряли на приборе Varioskan LUX (Thermo Scientific).

2.2.14 Выделение спленоцитов

Спленоциты выделяли путем продавливания селезенки через нейлоновые клеточные фильтры с диаметром пор 70 и 40 мкм (BD Falcon™, США). Эритроциты удаляли с помощью буфера для лизиса эритроцитов (Sigma, США). Затем спленоциты дважды промывали средой RPMI-1640 и ресуспендировали в 1 мл RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамин, гентамицина (50 мкг/мл) и 10 % фетальной бычьей сывороткой. Жизнеспособность и концентрацию клеток определяли в тесте с красителем трипановым синим (Bio-Rad, США) на автоматическом клеточном счетчике TC20 (Bio-Rad, США).

2.2.15 Определение маркера активации лимфоцитов CD 69

Анализ качества очистки мРНК проводили по оценке степени влияния растворов фракций на экспрессию раннего маркера активации лимфоцитов CD 69 у мышей. Спленоциты засеивали в 24-х луночный планшет по 1 млн. клеток на 1 мл среды RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамин, гентамицина (50 мкг/мл) и 10 % фетальной бычьей сывороткой в лунку. Затем, к клеткам добавляли по 10 мкг мРНК: мРНК до очистки, очищенная мРНК, и элюат дцРНК и инкубировали в течении 18 часов. После инкубации клетки центрифугировали 5 минут со скоростью 1600 об/мин. Супернатант удаляли, клетки промывали в 1 мл PBS, 0,02 % ЭДТА, центрифугировали в тех же условиях. Буфер удаляли и проводили фиксацию, добавляя к клеткам

1 мл буфера для фиксации и окрашивания (PBS, 0,02 % ЭДТА, 0,1 % азид натрия и 2 % инактивированной сыворотки) и центрифугировали. Затем проводили окрашивание поверхностных маркеров в ПЦР-боксе с выключенным освещением. Супернатант сливали и вносили антитела к поверхностным маркерам: Alexa Fluor 700 anti-mouse CD3 Antibody, BV786 anti-mouse CD4 Antibody, FITC anti-mouse CD8 Antibody и APC anti-mouse CD69 Antibody (BD, США) в общем объеме 100 мкл. Инкубировали в течении 20 минут при комнатной температуре в темноте. Добавляли 1,8 мл буфера (PBS, 0,02 % ЭДТА 0,1 % NaN₃), центрифугировали. Далее проводили фиксацию клеток. Супернатант сливали, добавляли 1 мл 1 % раствора параформальдегида в PBS, перемешивали на вортексе и инкубировали 10 минут при комнатной температуре и центрифугировали. Супернатант сливали, к осадку добавляли 0,350 мл 1 % раствора параформальдегида в PBS. Образцы окрашенных спленоцитов анализировали на проточном цитофлуориметре ZE5 (Bio-Rad, США), результаты обрабатывали с помощью программы Everest software (Bio-Rad, США).

2.2.16 Иммунизация лабораторных животных для оценки эффективности экспериментальных мРНК вакцин

Для исследования иммуногенности мРНК-вакцины против гриппа были использованы мыши линии BALB/c (самки) массой 16-18 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, 2020 год) в половине человеческой дозы, 250 мкл, для положительного контроля; третьей группе вводили в\м 50 мкл физиологического раствора с помощью струйной инъекции. Струйную инъекцию проводили с использованием безыгольного струйного инжектора Comfort-IN (MIKA MEDICAL CO., Китай) с характеристиками: скорость струи 220 метров в секунду, давление 6,5 бар, время инъекции 0,33 с. используя индивидуальные насадки-сопло.

На 28 день эксперимента (на 14 день после второй иммунизации) у мышей собирали сыворотку крови для проведения ИФА и анализа вирус-нейтрализации. На 29 день после иммунизации, 10 мышей из каждой группы заражали интраназально вирусом гриппа A/California/04/09 (H1N1) MA8 под инъекционным внутримышечным наркозом Zoletil 100 (Virbac, Франция). Вирус вводили в дозе 20 МЛД₅₀ в объеме 50 мкл. Через 14 дней всем выжившим животным в экспериментальных и контрольных группах проводили эвтаназию методом цервикальной дислокации. У оставшихся 5 мышей проводили выделение спленоцитов из селезенок, и проводили исследование Т-клеточного иммунного ответа методом ELISpot.

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 внутримышечно 30 мкг мРНК-C1-RBD в 50 мкл PBS с помощью струйной инъекции; второй группе животных вводили в/м 50 мкл PBS с помощью струйной инъекции. Струйную инъекцию проводили с использованием безыгольного струйного инжектора Comfort-IN (MIKA MEDICAL CO., Китай) с характеристиками: скорость струи 220 метров в секунду, давление 6,5 бар, время инъекции 0,33 с. используя индивидуальные насадки-сопло.

На 30 день у мышей собирали сыворотку крови для проведения ИФА и анализа вируснейтрализации. На 35 день после иммунизации, по 6 мышей из каждой группы брали на исследование клеточного иммунного ответа методом ELISpot, а 8 мышей передавали на заражение летальной дозой вируса hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021. Мышей инфицировали дозой ИД50 (3,8 log₁₀ ЦПД50) вируса SARS-CoV-2. На 4-е сутки после заражения животных умерщвляли методом цервикальной дислокации и определяли вирусную нагрузку в тканях легких методом ОТ-ПЦР реального времени в 10% гомогената.

2.2.17 Иммуноферментный анализ

В качестве антигена для ИФА использовали эукариотический рекомбинантный белок гемагглютинина H1, либо рекомбинантный белок RBD [191], любезно предоставленные лабораторией иммунохимии отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Россия). Белки (1 мкг/мл) адсорбировали в лунках 96-луночного полистерольного планшета (Greiner Bio One GmbH, Фрикенхаузен, Германия) в PBS при 4 °C в течение 12 часов. затем промывали PBST и блокировали 1% раствором казеина в промывочном буфере (PBST) в течение 60 минут при комнатной температуре. После этого добавляли образцы сыворотки крови в трехкратном серийном разведении, начиная с 1:50, и инкубировали 60 минут при 37°C. После промывания добавляли кроличьи антимышьиные IgG-антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США), и инкубировали в течение 60 минут при 37°C. Планшет промывали PBST, добавляли субстрат TMB (Amresco LLC, США) и инкубировали в течение 20 минут. После инкубации реакцию останавливали стоп-раствором (одномолярная соляная кислота) и измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 450 нм на планшетном ридере Varioskan Lux (Thermo FisherScientific, США).

2.2.18 ELISpot

Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN- γ с помощью метода IFN- γ ELISpot. Анализ

проводили с использованием наборов IFN- γ ELISpot (MABTECH, Швеция) согласно инструкции производителя. Для стимуляции клеток использовали смесь специфических пептидов размером по 10-20 аа, соответствующих консервативным Т-клеточным эпитопам белка гемагглютинаина вируса гриппа H1N1(pdm09) или белка RBD SARS-CoV-2, штамм Wuhan-Hu-1 соответственно, синтезированных в AtaGenix Laboratories (Wuhan, China). Концентрация каждого пептида составляла по 20 мкг/мл. Подсчет количества IFN γ -продуцирующих клеток осуществляли с помощью ELISpot-ридера фирмы Carl Zeiss (Германия).

2.2.19 Реакция вируснейтрализации

Сыворотки мышей, иммунизированных мРНК-вакциной против гриппа, исследовали в реакции нейтрализации *in vitro* с вирусом гриппа A/California/04/09 (H1N1) MA8, как описано в работе [192] в модификации. Отличие состояло в методе визуализации конечного результата: через двое суток после заражения клетки окрашивали раствором клисталлвиолета (1,3 г красителя растворяли в 50 мл 96% этилового спирта, доводили дистиллированной водой до 700 мл и добавляли 300 мл 40% раствора формалина) и анализировали с помощью многорежимного ридера для визуализации клеток Agilent BioTek Cytation 5 (Thermo fisher scientific). За титр нейтрализации принимали значение самого высокого разведения сыворотки, при котором достигается $\geq 50\%$ нейтрализация вируса, что соответствует $\geq 50\%$ жизнеспособных клеток.

Сыворотки мышей, иммунизированных мРНК-вакциной против COVID-19, исследовали в реакции нейтрализации *in vitro* с использованием живого вируса SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 по методике, описанной в работе [191] и псевдотипированных вирусов, несущих на своей поверхности S гликопротеин SARS-CoV-2, полученных в отделе биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ Вектор, по методике, описанной в работе [193].

2.2.20 Оценка защитной эффективности мРНК-вакцины против гриппа на инбредных мышах

Протективные свойства вакцины изучались на иммунных животных по уровню защиты от заражения вирусом гриппа. Через 28 дней после введения вакцины, мышей BALB/c заражали интраназально в 50 мкл дозой 20 МЛД₅₀ штаммом вируса гриппа A/California/04/09 (H1N1) MA8, гомологичным вакцинному штамму. Манипуляции по заражению мышей проводили на фоне наркоза препаратом Zoletil 100 (Virbac, Франция). Наблюдение за животными после заражения осуществлялось ежедневно в течении 14 дней после заражения. При развитии у животного в результате заболевания тяжелого состояния, не совместимого с жизнью: анорексия, летаргия либо всем оставшимся в живых животных по истечению 14 дней после заражения, проводили

эвтаназию способом, указанным в протоколе, утверждёнными Биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»/02-03.2023, Протокол БЭК №2 от 03.04.2023 г.).

2.2.21 Оценка защитной эффективности мРНК-вакцины против COVID-19 на инбредных мышах

Протективность вакцины оценивали в отношении Гамма-варианта вируса SARS-CoV-2. В работе использован штамм hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021. На 35-й день после первой иммунизации животных 2-х экспериментальных групп и контроля интраназально инфицировали дозой 50 ИД50 (3,8 log₁₀ ЦПД50) вируса SARS-CoV-2.

На 35-й день после первой иммунизации 8 животных из экспериментальной группы и группы контроля интраназально инфицировали дозой 50 ИД50 (3,8 log₁₀ ЦПД50) вируса SARS-CoV-2. На 4-е сутки после заражения животным проводили эвтаназию способом, указанным в протоколе, утверждёнными Биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»/02-03.2023, Протокол БЭК №2 от 03.04.2023 г.). Количественное определение вируса оценивали в тканях легких методом ОТ-ПЦР реального времени в 10% гомогената.

2.2.22 Статистическая обработка результатов

Данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США), с использованием непараметрических тестов. Парные сравнения проводили с использованием теста Манна-Уитни. Межгрупповые различия в иммунных ответах оценивали с помощью непараметрического однофакторного дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса, с поправкой на множественные сравнения и критерий статистической гипотезы Данна. Моделирование функции выживания проводили с помощью множительной оценки Каплана-Мейера, сравнение выживания с контрольной группой с помощью критерия Мантеля-Кокса. При $p < 0.05$ различия считали статистически значимыми.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Раздел «Результаты и их обсуждение» представлен в виде четырёх частей. 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.

3.1. Конструирование ДНК-матриц для синтеза мРНК

Для получения синтетической мРНК-вакцины в первую очередь необходимо сконструировать ДНК-матрицу, так как именно с неё, под контролем промотора фага T7, 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, ATG, 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.

3.1.1. Кэпирование и полиаденилирование мРНК ферментативным способом

Для отработки условий синтеза мРНК была использована генетическая последовательность, кодирующая ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). Ген белка GFP был получен с помощью ПЦР с использованием коммерческой плазмиды pHMGFP (Promega Corporation), и клонирован в составе вектора pVAX, который имеет в своей структуре T7 промотор, но не содержит нетранслируемых областей. В результате была получена ДНК-матрица pVAX-GFP (рис.14).

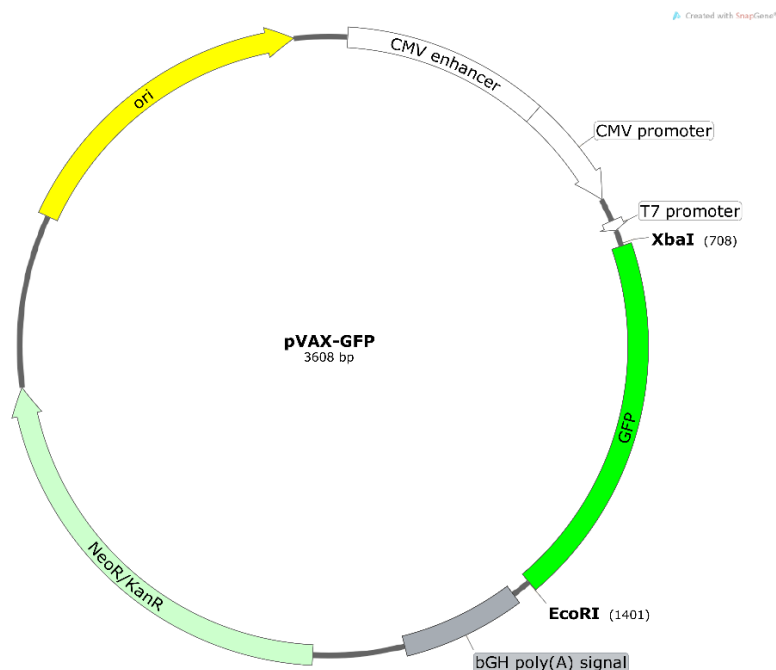


Рисунок 14. Карта плазмиды pVAX-GFP

Полученная плазида pVAX-GFP использовалась для синтеза мРНК. Для остановки полимеразы при синтезе мРНК самым эффективным способом ограничения является гидролиз ДНК, непосредственно за целевым геном. При подготовке матрицы, pVAX-GFP была линейаризована по сайту рестрикции EcoRI. Линейаризованную ДНК-матрицу вырезали из агарозного геля (рис. 15) и очищали на колонках с использованием набора Cleanup Standard (Евроген).

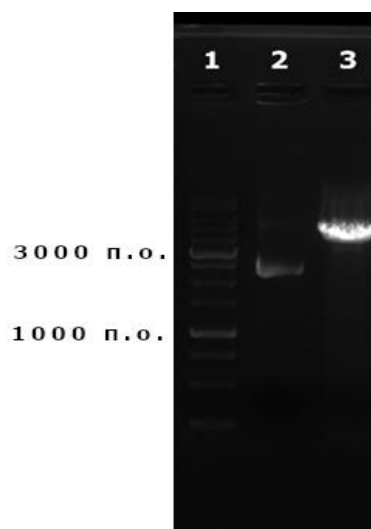


Рисунок 15. Электрофореграмма разделения продуктов расщепления pVAX-GFP эндонуклеазой рестрикции EcoRI: 1 – маркер M12 "СибЭнзайм, Новосибирск"; 2 – нативная pVAX-GFP; 3 –линейаризованная плазида pVAX-GFP.

Синтез мРНК проводили с использованием линейаризованной и очищенной ДНК-матрицы и коммерческого набора для синтеза мРНК T7 mScript™ Standard mRNA Production System

(CellScript, США), как указано в пункте 2.6.5. Согласно данным литературы, для эффективной трансляции белка с синтезированной мРНК необходима замена уридина на псевдоуридин (Ψ) либо метилпсевдоуридин (mΨ). Поэтому при синтезе в реакционной смеси была проведена 100 %-ная замена уридина на Ψ.

Кэпирование и полиаденилирование проводили поэтапно, используя ферменты, входящие в набор T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CellScript, США). В реакционную смесь включали переосаждённую РНК, полученную на предыдущем этапе. После каждого этапа проводили осаждение РНК 5М ацетатом аммония.

Степень полиаденилирования подтверждали с помощью агарозного электрофореза (рис. 16). Стоит отметить, что размер мРНК в агарозном геле не соответствует ДНК-маркеру M12 (СибЭнзайм, Новосибирск), так как РНК представляет собой одноцепочечную молекулу, и движется в электрическом поле примерно в два раза быстрее, чем ДНК. Маркер добавлен для примерной ориентации на электрофореграмме.

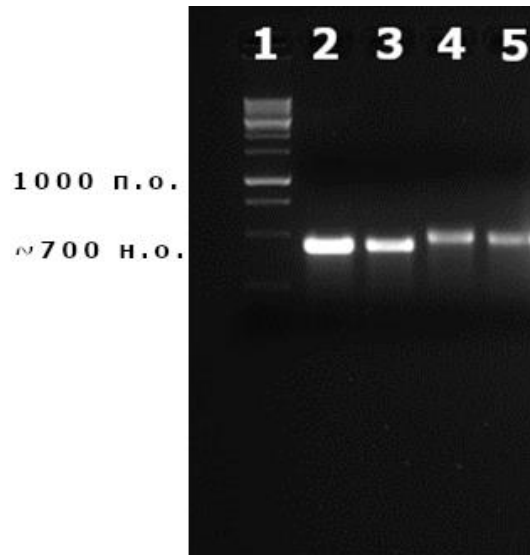


Рисунок 16. Электрофореграмма продуктов мРНК-GFP до и после полиаденилирования: 1 – маркер M12 "СибЭнзайм, Новосибирск", 2,3 – мРНК-GFP до полиаденилирования, 4,5 – мРНК- GFP после полиаденилирования

Для оценки эффективности кэпирования и полиаденилирования, синтезированной мРНК-GFP были трансфицированы клетки HEK293 с помощью Lipofectamine MessengerMAX (ThermoFisher, США) согласно инструкции производителя. Клетки, продуцирующие GFP, выявляли с помощью флуоресцентного микроскопа *Olympus BX43* и анализировали с помощью проточного цитометра ZE5 через 24 часа после трансфекции (рис.17).

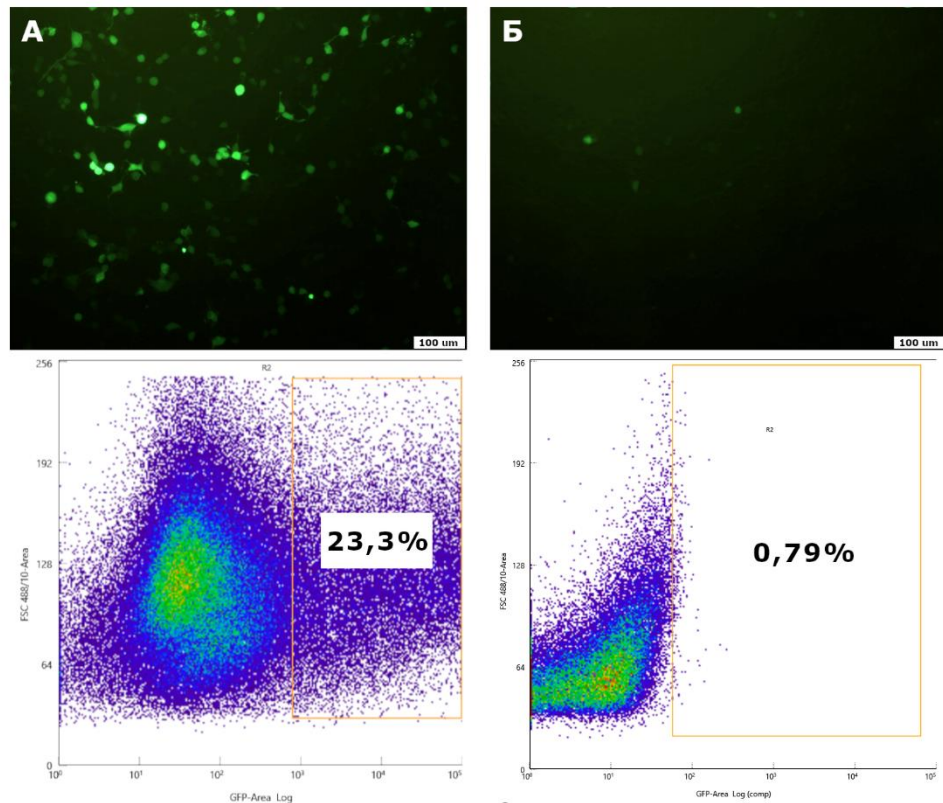


Рисунок 17. Оценки эффективности экспрессии мРНК-GFP на культуре клеток HEK293. Микрофотография клеток HEK293 и данные, полученные с помощью проточного цитофлуориметра. А- мРНК-GFP с ферментативным кэпированием и полиаденилированием, Б- мРНК-GFP без кэпирования и полиаденилирования.

Таким образом, согласно результатам было установлено, что ферментативное кэпирование и полиаденилирование обеспечивают трансляцию GFP с мРНК (23,3% светящихся клеток).

3.1.2. Кэпирование и полиаденилирование РНК котранскрипционным способом

Следующим этапом данной работы было получение кэпированной и полиаденилированной мРНК котранскрипционным способом. Для кэпирования использовали химические аналоги кэпа ARCA или AG-Cap, а для полиаденилирования последовательность поли(А)-хвоста встраивали непосредственно в ДНК-матрицу.

Для использования обоих вариантов аналогов кэпа, кроме стандартных после T7 промотора иницирующих нуклеотидов GG, т.е. нуклеотидов, с которых начинается транскрипт РНК, был получен вариант с AG (рис.18). Данная модификация необходима для встраивания AG-Cap-аналога при транскрипции РНК *in vitro*. Это связано с тем, что AG-Cap-аналог состоит из пары нуклеотидов, AG, где к аденину через 5'-5' связь уже присоединен Кэп. Поэтому необходимо, чтобы первые нуклеотиды в транскрипте после T7 промотора были ему комплементарны.

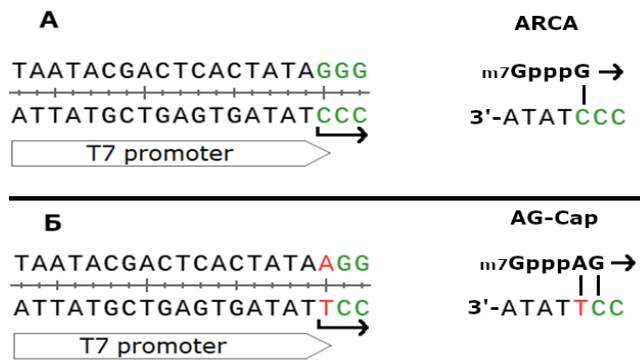


Рисунок 18. Изменение иницирующих нуклеотидов после T7 промотора. А- стандартные нуклеотиды GG, Б – измененные нуклеотиды AG.

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). Важным моментом является выбор сайта рестрикции для получения линейной ДНК. После поли(А) нами был встроен сайт рестрикции Bso31I, обеспечивающий гидролиз ДНК сбоку от сайта узнавания, непосредственно по поли(А) хвосту, чтобы транскрипт заканчивался аденином (рис.19). Это необходимо для нормального функционирования поли(А)хвоста в мРНК.



Рисунок 19. Сайт рестрикции для получения линейной ДНК-матрицы.

Для проведения котранскрипционного экэпирования и полиаденилирования мРНК, нами использовались плазмиды рVAX. Было получено две плазмиды рVAX-GG-PolyA и рVAX-AG-PolyA, содержащие разные иницирующие нуклеотиды GG и AG после T7 промотора для использования разных аналогов кэпа. После сайта гидролиза EcoRI в плазмиду был заложен поли(А)-хвост длиной 100 нуклеотидов с линкером, заканчивающимся сайтом рестрикции Bso31I. С помощью ПЦР, используя праймеры GFP-F и GFP-R, получали фрагменты гена GFP из плазмиды рhMGFP, и встраивали в соответствующие конструкции по сайтам рестрикции XbaI и EcoRI. Было получено две генетические конструкции: рVAX-GG-GFP-PolyA и рVAX-AG-GFP-PolyA (рис.20).

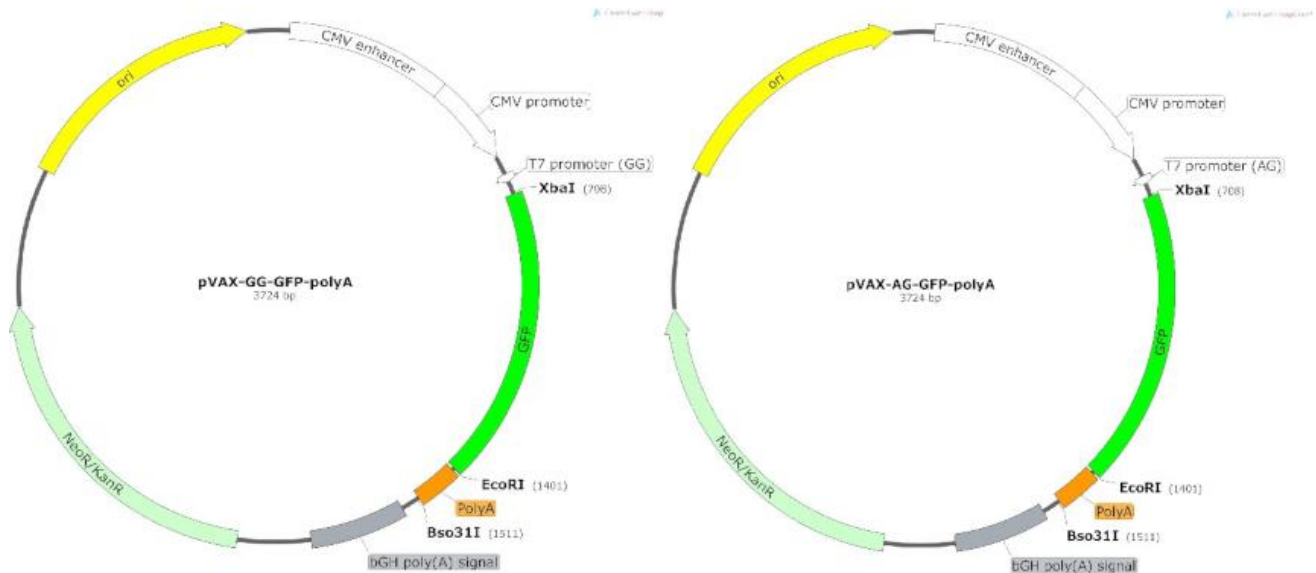


Рисунок 20. Карты плазмид *pVAX-GG-GFP-PolyA* и *pVAX-AG-GFP-PolyA*

Синтез мРНК проводили с использованием двух вариантов аналога кэпа – ARCA и AG-Cap. Для оценки эффективности мРНК, полученной с использованием ARCA, мРНК синтезировали с матрицы *pVAX-GG-PolyA-GFP*, содержащей GG иницирующие нуклеотиды. Матрицу линейаризовали по сайту Bso31I. Так как ARCA представляет собой модифицированный нуклеотид GTP, для эффективного кэпирования меняли соотношение рибонуклеотидов в реакционной смеси. Необходимо было создать избыток ARCA и недостаток GTP. Остальные нуклеотиды АТФ, СТР и Ψ использовали в конечных концентрациях по 7 mM, GTP снижали до 1 mM, ARCA добавляли в концентрации 6 mM. Синтез мРНК проводили с помощью T7-полимеразы (БиолабМикс, Новосибирск). Стоит отметить, что выход мРНК при синтезе с аналогом кэпа ARCA был значительно ниже, чем без использования этого аналога. Скорее всего это связано со значительным уменьшением GTP в реакционной смеси для более эффективного встраивания аналога кэпа.

Для оценки эффективности мРНК, полученной с использованием AG-Cap аналога, матрицу *pVAX-AG-PolyA-GFP* линейаризовали по сайту рестрикции Bso31I. Так как AG-Cap аналог представляет собой два соединённых между собой нуклеотида и может присоединиться только в начале молекулы, он не конкурирует с другими рибонуклеотидами. Поэтому все рибонуклеотиды использовали в стандартных концентрациях и добавляли AG-Cap аналог в конечной концентрации 6 mM. Синтез мРНК проводили с помощью T7-полимеразы (БиолабМикс, Новосибирск). В данном варианте, выход мРНК после синтеза не изменился, и по количеству составил примерно столько же, сколько при синтезе мРНК без использования аналогов кэпа, таким образом AG-Cap не влияет на синтез мРНК.

Оценку эффективности котранскрипционного кэпирования и полиаденилирования, а также сравнения ARCA и AG-Сар аналогов, проводили путём определения уровня синтеза белка GFP в эукариотических клетках, который обеспечивали мРНК-GFP. Для этого была проведена трансфекция клеток HEK293 синтезированными мРНК-GFP с помощью трансфицирующего агента Lipofectamine MessengerMAX. Клетки, продуцирующие GFP, выявляли с помощью флуоресцентного микроскопа *Olympus* BX43 и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра ZE5 через 24 часа после трансфекции (рис.21).

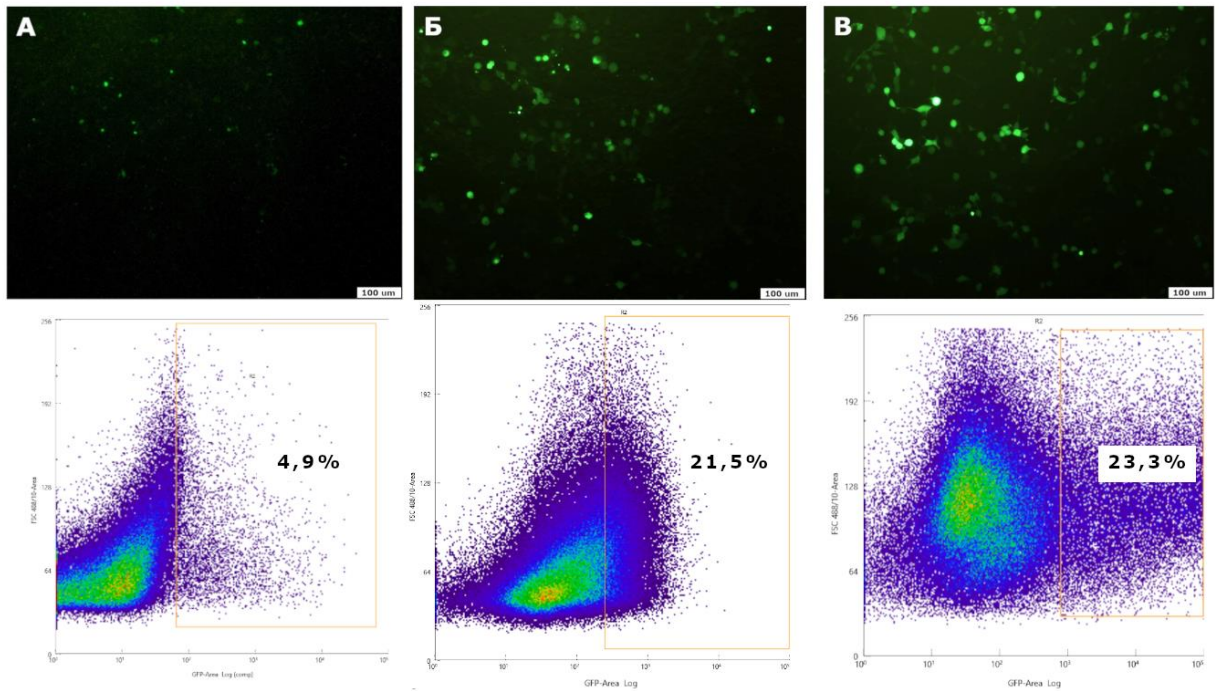


Рисунок 21. Оценки эффективности экспрессии мРНК-GFP на культуре клеток HEK293.

Микрофотография клеток HEK293 и данные, полученные с помощью проточного цитофлуориметра. А- мРНК-GFP с ARCA и встроенным поли(А)-хвостом, Б - мРНК-GFP с AG-Сар и встроенным поли(А)-хвостом, В- мРНК-GFP с ферментативным кэпированием и полиаденилированием

Как видно по рисунку 21, мРНК-GFP с ферментативным кэпированием и полиаденилированием даёт примерно одинаковые результаты с мРНК-GFP, полученной с использованием AG-сар аналога и закодированного в матрицу поли(А)-хвоста, 23,3% и 21,5% светящихся клеток соответственно. ARCA показала себя значительно хуже, 4,9%. Скорее всего, это связано с тем, что несмотря на снижение содержания GTP в реакционной смеси, рибонуклеотид все равно конкурирует с ARCA за встраивание в молекулу мРНК, и значительная часть РНК остаётся не кэпированной.

Таким образом, на данном этапе работы, нами были отработаны посттранскрипционный и котранскрипционный способ получения мРНК. Показано, что синтез мРНК котранскрипционным способом, используя при синтезе аналоги кэпа AG-Сар-аналог или ARCA, и ДНК-матрицу, имеющую встроенный поли-А хвост, даёт возможность получать мРНК за 1 стадию синтеза. Но стоит отметить, что при синтезе с ARCA, выход мРНК после синтеза был примерно в несколько раз меньше, чем после AG-Сар аналога, что связано со значительным уменьшением содержания GTP в реакционной смеси при использовании ARCA.

3.1.3. Выбор нетранслируемых областей для повышения эффективности трансляции мРНК

Следует отметить, что ДНК-матрицы и соответственно конструкции мРНК, полученные в предыдущих разделах, не содержали последовательностей НТО в своей структуре. Поэтому, заключительная часть работы по получению матриц для синтеза мРНК посвящена выбору нетранслируемых областей для наиболее эффективной трансляции в эукариотических клетках. Нетранслируемые области являются важным элементом в структуре мРНК. Как уже было сказано, кодирующая область фланкирована с обеих сторон 5'- и 3'-НТО. Сами по себе НТО не кодируют белок, но они образуют вторичную структуру молекулы мРНК, которая играет роль в регуляции трансляции мРНК. В частности, 5'-НТО участвует посадке на рибосому и инициации трансляции, а 3'-НТО в большей степени влияет на стабильность и период полураспада 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 (СУВА), их последовательности указаны в таблице 2 [194], [195]. 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.

Перед проведением экспериментальных работ по получению ДНК-матрицы, включающей последовательности НТО, было проведено моделирование вторичной структуры РНК выбранных НТО с учётом окружающих нуклеотидных последовательностей.

3.1.3.1. Моделирование вторичной структуры НТО мРНК

Вторичная структура НТО мРНК играет важную роль в регуляции работы РНК, особенно 5'-НТО. Фланкирующая стартовый кодон 5'-НТО выполняет две ключевые функции: стабилизирует вторичную структуру мРНК и облегчает поиск стартового кодона малой субъединицей рибосомы. Основным показателем, определяющим жесткость вторичной структуры, это MFE (минимальная энергия сворачивания). Данный показатель прогнозируется с использованием энергетической модели на основе циклов и алгоритма динамического программирования, представленного Zuker et al. [196]. Чем меньше значение MFE, тем более жесткую структуру имеет вторичная структура, что говорит о том, что ей будет сложнее расплестись для посадки на рибосому. В исследованиях инициации трансляции у дрожжей [197] и в клеточных линиях мышей [198] было продемонстрировано, что стабильная вторичная структура в 5'-НТО, фланкирующая стартовый кодон в исследуемых мРНК, снижает выработку соответствующих белков. Другим важным элементом, косвенно связанным с MFE, является наличие сложных структур, особенно в области стартового кодона и на 5'-конце, рядом с кэпом. Сложные и стабильные структуры могут помешать посадке рибосомы на мРНК.

Учитывая вышеизложенные данные, было проведено моделирование вторичных структур и расчёт MFE прогнозируемой мРНК с помощью веб-сервиса ViennaRNA Web Services, используя инструмент RNAfold Server. Расчёты проводились при стандартных параметрах, но уридин рассчитывался как псевдоуридин.

Кроме того, на данном этапе работы у нас возникла идея создания универсальных ДНК-матриц, содержащих различные нетранслируемые регионы, в которые можно было бы встроить любой целевой ген, используя заложенные в конструкцию сайты рестрикции.

Универсальную матрицу для синтеза мРНК решено было делать на основе вектора pVAX. Данная плазида в своей структуре имеет T7 промотор, необходимый для синтеза мРНК, и следующий сразу за ним полилинкер, требуемый для встройки генетических конструкций.

Моделирование вторичных структур РНК, соответствующих фрагменту pVAX, следующему сразу за T7 промотором (полилинкер, 5'-НТО), показало, что нуклеотидные последовательности в окружении НТО могут значительно влиять на вторичную структуру молекулы (таблица 3). Так, присутствие в анализируемом фрагменте РНК последовательности полилинкера приводило к образованию шпилек, которые, теоретически, могут мешать нормальной инициации трансляции (таблица 3, структуры №1, №3, N5). Удаление полилинкера, содержащего сайты рестрикции, привело к изменению вторичной структуры фрагмента РНК, в результате которого были удалены сложные шпильки в начале конструкции, и осталась только одна шпилька с простой конфигурацией (таблица 3, структуры №2, №4 и №6).

Таблица 3. Вторичные структуры мРНК, соответствующие фрагменту рVAX, включающему полилинкер и 5'-НТО.


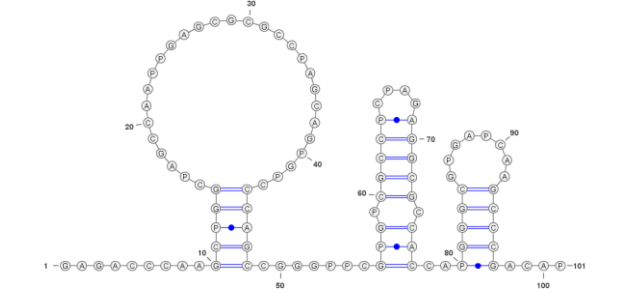
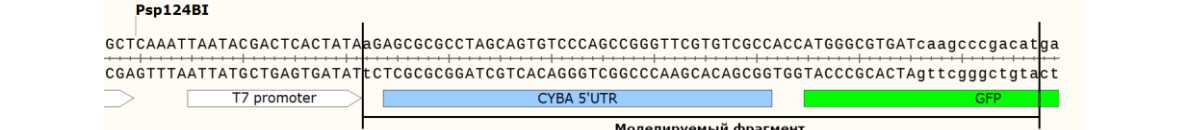

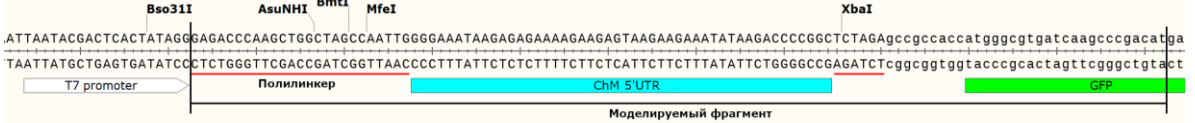
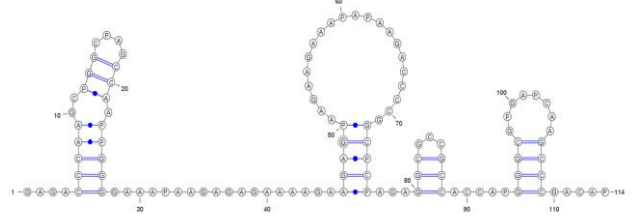
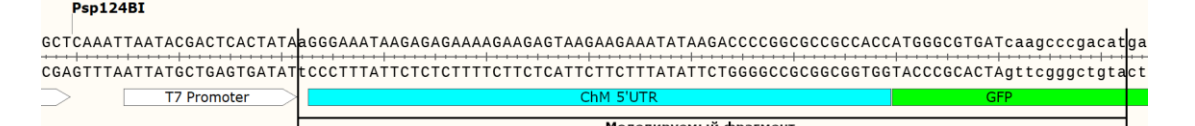

№	Фрагмент рVAX, включающий полилинкер и 5'-НТО	Вторичная структура РНК*
1		
2		
3		
4		

5	<p>ATTAATACGACTCACTATAGGAGACCCCAAGCTGGCTAGCCAATTGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGCTAGAgccgccaccatgg TAATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGTTCCGACCGATCGGTTAACCCCTTTATTCTCTTTTCTTCTCATTCTTCTTTATATTCTGGGGCCGAGATCcggcggtggtacc</p> <p>T7 promoter Полилинкер ChM 5'UTR GFP</p> <p>Моделируемый фрагмент</p>	
6	<p>GCTCAAATTAATACGACTCACTATAAGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGCGCCGCCACCATGG CGAGTTTAATTATGCTGAGTGATATCCCTTTATTCTCTTTTCTTCTCATTCTTCTTTATATTCTGGGGCCGCGCGGTGGTACC</p> <p>T7 Promoter Полилинкер ChM 5'UTR GFP</p> <p>Моделируемый фрагмент</p>	

*Моделирование вторичной структуры РНК проведено с помощью веб-сервиса ViennaRNA Web Services с использованием инструмента RNAfold Server.

Таблица 4. Вторичные структуры мРНК, соответствующие фрагменту рVAX, включающему полилинкер, 5'-НТО и 20 п.о. гена GFP

№	Фрагмент рVAX, полилинкер и 5'-НТО и 20 п.о. гена GFP	Вторичная структура РНК*
1	<p>TTAATACGACTCACTATAGGAGACCCCAAGCTGGCTAGCCAATTGAGGAATAAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAATCTAGAgccgccaccatggcggtgatcaagcccgacatgaa AATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGTTCCGACCGATCGGTTAACCCCTTTATTGATCATAAGAAGACCAAGGGGTGTCTGAGTCTCTTAGATCcggcggtggtaccgccactagtcgggctgtactt</p> <p>T7 promoter Полилинкер a-globin 5'UTR GFP</p> <p>Моделируемый фрагмент</p>	
2	<p>GCTCAAATTAATACGACTCACTATAAGGAATAAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAAGccgccaccatGGGCGTGATcaagcccgacatgaa CGAGTTTAATTATGCTGAGTGATATTCCTTTATTGATCATAAGAAGACCAAGGGGTGTCTGAGTCTCTTcggcggtggTACCCGCACTAgctcgggctgtactt</p> <p>T7 Promoter Полилинкер a-globin 5'UTR GFP</p> <p>Моделируемый фрагмент</p>	

3	 <p>TTAATACGACTCACTATAGGAGACCCAAGCTGGTAGCCAATTGAGCGCGCCTAGCAGTGTCCCAGCCGGGTTCTGTGTCGCCTTAGAgccgccaccatgggctgatcaagcccgacatgaa AATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGTTTCGACCGATCGGTTAACTCGCGCGGATCGTCACAGGGTCGGCCCAAGCACAGCGGAGATCTcggcggtggtaccgcactagtctgggctgtactt</p> <p>T7 promoter Полилинкер CYBA 5'UTR GFP</p> <p>Моделируемый фрагмент</p>	
4	 <p>GCTCAAATTAATACGACTCACTATAGAGCGCGCCTAGCAGTGTCCCAGCCGGGTTCTGTGTCGCCACCATGGGCGTGATcaagcccgacatga CGAGTTTAAATTATGCTGAGTGATATCTCGCGCGGATCGTCACAGGGTCGGCCCAAGCACAGCGGTGGTACCCGCACTAgttcgggctgtact</p> <p>T7 promoter CYBA 5'UTR GFP</p> <p>Моделируемый фрагмент</p>	
5	 <p>ATTAATACGACTCACTATAGGAGACCCAAGCTGGTAGCCAATTGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCTTAGAgccgccaccatgggctgatcaagcccgacatga TAATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGTTTCGACCGATCGGTTAACCCTTTATTCTCTTTTTCTCTCATTCTCTTTATATTCTGGGCGGAGATCTcggcggtggtaccgcactagtctgggctgtact</p> <p>T7 promoter Полилинкер ChM 5'UTR GFP</p> <p>Моделируемый фрагмент</p>	
6	 <p>GCTCAAATTAATACGACTCACTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCGCCACCATGGGCGTGATcaagcccgacatga CGAGTTTAAATTATGCTGAGTGATATCCCTTTATTCTCTTTTTCTCTCATTCTCTTTATATTCTGGGCGCGCGGTTGGTACCCGCACTAgttcgggctgtact</p> <p>T7 Promoter ChM 5'UTR GFP</p> <p>Моделируемый фрагмент</p>	

* Моделирование вторичной структуры РНК проведено с помощью веб-сервиса ViennaRNA Web Services с использованием инструмента RNAfold Server

В образование вторичных структур 5'-НТО влияет и начало самого гена, примерно первые 20 нуклеотидов после стартового кодона AUG. Моделирование вторичных структур РНК, соответствующих фрагменту рVAX, следующему сразу за T7 промотором (полилинкер, 5'-НТО, 20 п.о. гена GFP после AUG) показало, что последовательность из гена GFP значительно не повлияла на вторичную структуру НТО, во всех вариантах добавилась только шпилька, соответствующая GFP (таблица 4). Расчёт MFE у полученных конструкций с α -глобином показал, что минимальная свободная в варианте №1 составила -36,69 ккал/моль, а в варианте №2 -20,77 ккал/моль (таблица 4). У СУВА, конструкция №3, MFE составила -28,96 ккал/моль, у №4 -17,01 ккал/моль. Для конструкции с последовательностью ChM -25,70 ккал/моль варианте с полилинкером и -12,62 ккал/моль без полилинкера соответственно (таблица 4, №5 и №6).

Кроме того, нами так же были рассчитаны вторичные структуры 3'-НТО последовательностей α -глобина, β -глобина и СУВА. 3'-НТО, как уже было сказано, влияет на стабильность и время жизни мРНК, что также имеет большое значение для мРНК-вакцины, так как чем дольше мРНК просуществует в клетках, тем больше белка-антигена будет синтезировано. Но в рамках данной работы не проводилось исследование влияния микроокружения на формирование вторичных структур 3'-НТО (рис.22).

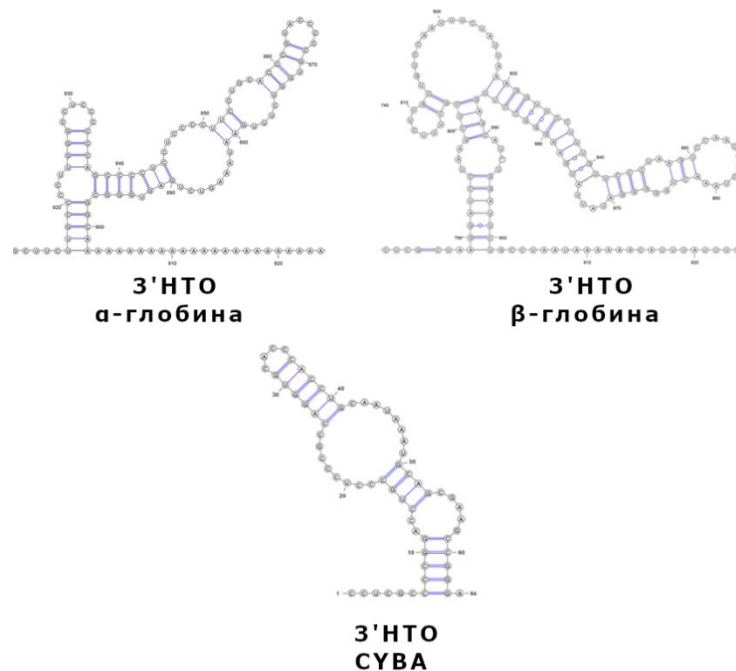


Рисунок 22. Моделирование вторичной структуры 3'-НТО α - и β -глобина и 5'- и 3'-НТО элементов СУВА.

Экспериментальную проверку влияния вторичной структуры 5'-НТО на трансляцию белка проводили на модели химерной последовательности Moderna ChM, так как она показала наилучший результат при моделировании (наибольшее значение MFE и отсутствие сложной

шпильки в варианте без полилинкера (таблица 4, №6). Была получена матрица pVAX-β, в которой 5'НТО содержала фрагмент полилинкера плазмиды pVAX, и pVAX-βМ, без сайтов рестрикции в 5'НТО (структуры, соответствующие №5 и №6 в таблице 4). Вектор pVAX использовался для получения матриц, а НТО были синтезированы в виде олигонуклеотидов с соответствующими сайтами рестрикции на 5'- и 3'- концах. Для получения матрицы pVAX-β, проводили клонирование олигонуклеотидов, кодирующих 5'НТО ChM, по сайтам рестрикции MfeI и XbaI, а олигонуклеотидов, кодирующих 3'НТО, по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI в составе вектора pVAX. В качестве модельного гена использовали репортный ген GFP, который получали с помощью ПЦР с плазмиды pHMGFP с использованием праймеров GFP-F и GFP-R, несущих сайты рестрикции XbaI и BamHI соответственно. Для получения матрицы, pVAX-βМ, ген GFP клонировали в составе плазмиды с использованием праймеров GFP-β-F и GFP-R, несущие сайты рестрикции Psp124BI и BamHI соответственно (рис. 23). В данном варианте прямой праймер содержал в своём составе только T7 промотор и 5'НТО ChM.

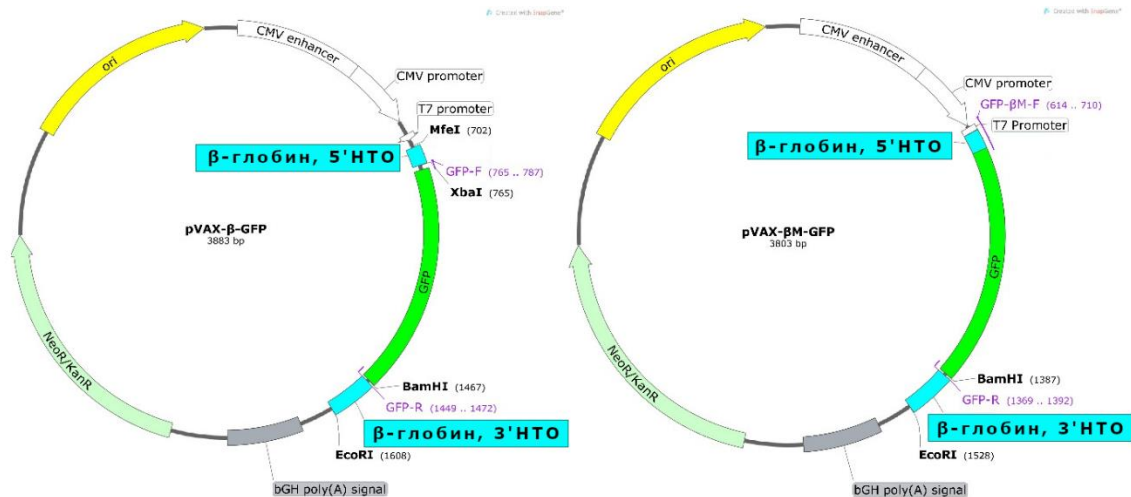


Рисунок 23. Генетические карты полученных плазмид pVAX-β-GFP и pVAX-βM-GFP

Для синтеза мРНК, кодирующих GFP, соответствующие ДНК-матрицы линейаризовали с помощью эндонуклеазы рестрикции EcoRI, сайт узнавания которой расположен сразу после 3'НТО β-глобина. Синтез мРНК проводили ферментативным способом.

Полученной мРНК-β-GFP и мРНК-βM-GFP проводили трансфекцию клеток НЕК293 с помощью трансфицирующего агента Lipofectamine MessengerMAX. В качестве контроля использовали полученную ранее мРНК-GFP, не содержащую НТО. Клетки, продуцирующие GFP, выявляли с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX43 и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра ZE5 через 24 часа после трансфекции (рис. 24).

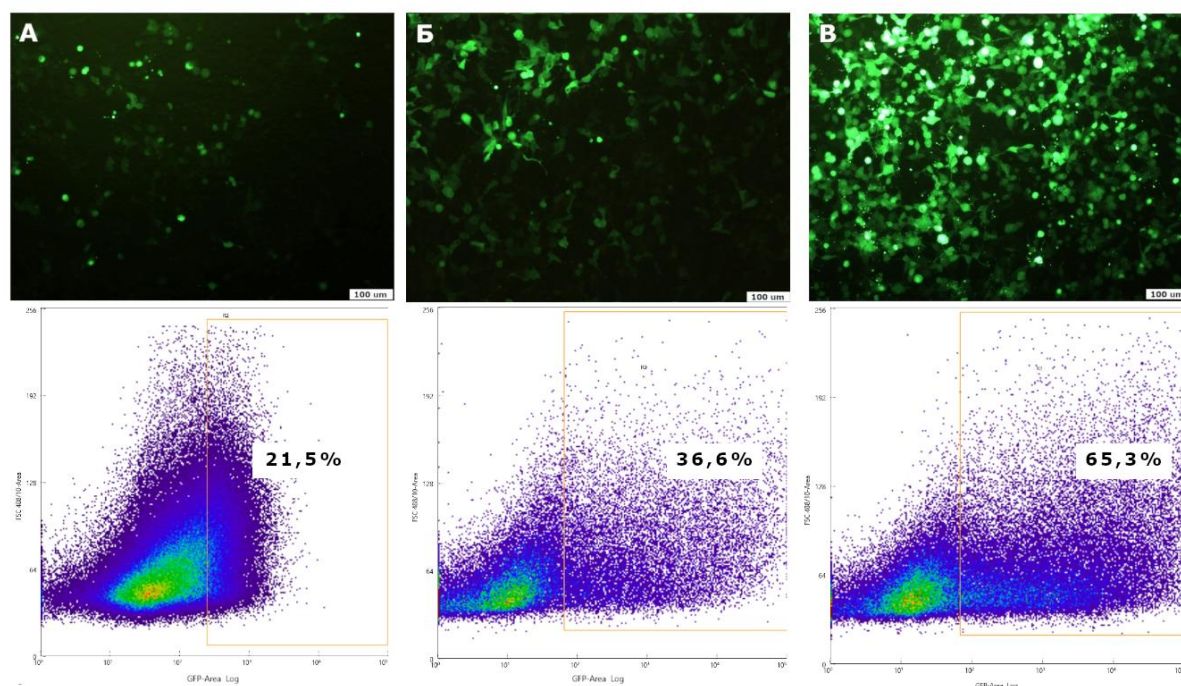


Рисунок 24. Оценки эффективности экспрессии мРНК-GFP на культуре клеток HEK293. Микрофотография клеток HEK293 и данные, полученные с помощью проточного цитофлуориметра. А - мРНК-GFP, Б - мРНК-β-GFP, В - мРНК-βМ-GFP

Как видно по рисунку, мРНК-βМ-GFP показала лучший результат, 65,3% светящихся клеток. Нетранслируемая последовательность ChM значительно усилила трансляцию белка по сравнению с мРНК без НТО (21,5%). Анализ *in vitro* различий вторичных структур показал, что вариант мРНК без лишних сайтов рестрикции работает эффективнее, чем вариант с дополнительными сайтами рестрикции (36,6%). Видимо это связано с тем, что в начале 5'-НТО варианта мРНК-βМ-GFP отсутствуют сложные вторичные структуры, и она обладает большей MFE, что говорит о более лабильной вторичной структуре, тем самым облегчая посадку рибосомы. Но тем не менее, даже не оптимизированные НТО повысили экспрессию мРНК, хотя и не так эффективно, как оптимизированные конструкции.

3.1.3.2. Получение универсальных ДНК-матриц для синтеза мРНК

Таким образом, согласно полученным результатам, нами были сконструированы три плазмидные конструкции, содержащие 5'-последовательности разных генов без сайтов рестрикции: рVAX-C1, содержащая 5'- и 3'-последовательности из гена α-глобина человека, рVAX-C2, содержащая 5'- и 3'-последовательности из гена альфа цепи цитохрома b-245 (CYBA) и рVAX-C3, содержащая в качестве 5'-НТО ChM и 3'-НТО последовательность из гена β-глобина человека (таблица 2). На предыдущих этапах работы, нами было показано, что самым эффективным способом получения мРНК является котранскрипционное экпирование с AG-Car-

аналогом и встроенным в матрицу поли(А)-хвостом, поэтому данные элементы также были включены в универсальные ДНК-матрицы.

Было решено не добавлять дополнительные сайты рестрикции между геном и 5'НТО, так как дополнительная вторичная структура может мешать трансляции белка. Поэтому, в разрабатываемых ДНК-матрицах Т7 промотор и 5'НТО будут добавляться с помощью прямого праймера. В конструкции был заложен сайт рестрикции Psp124BI, расположенный перед Т7 промотором, а после сайт рестрикции BamHI, для клонирования целевого гена. Затем в конструкции размещалась выбранная 3'НТО, а после неё в плазмиду был встроен поли(А)-хвост длиной 100 нуклеотидов с линкером, заканчивающимся сайтом рестрикции Bso31I (рис.25). Синтез нуклеотидных последовательностей был проведен коммерческой фирмой «ДНК-синтез» (Москва).

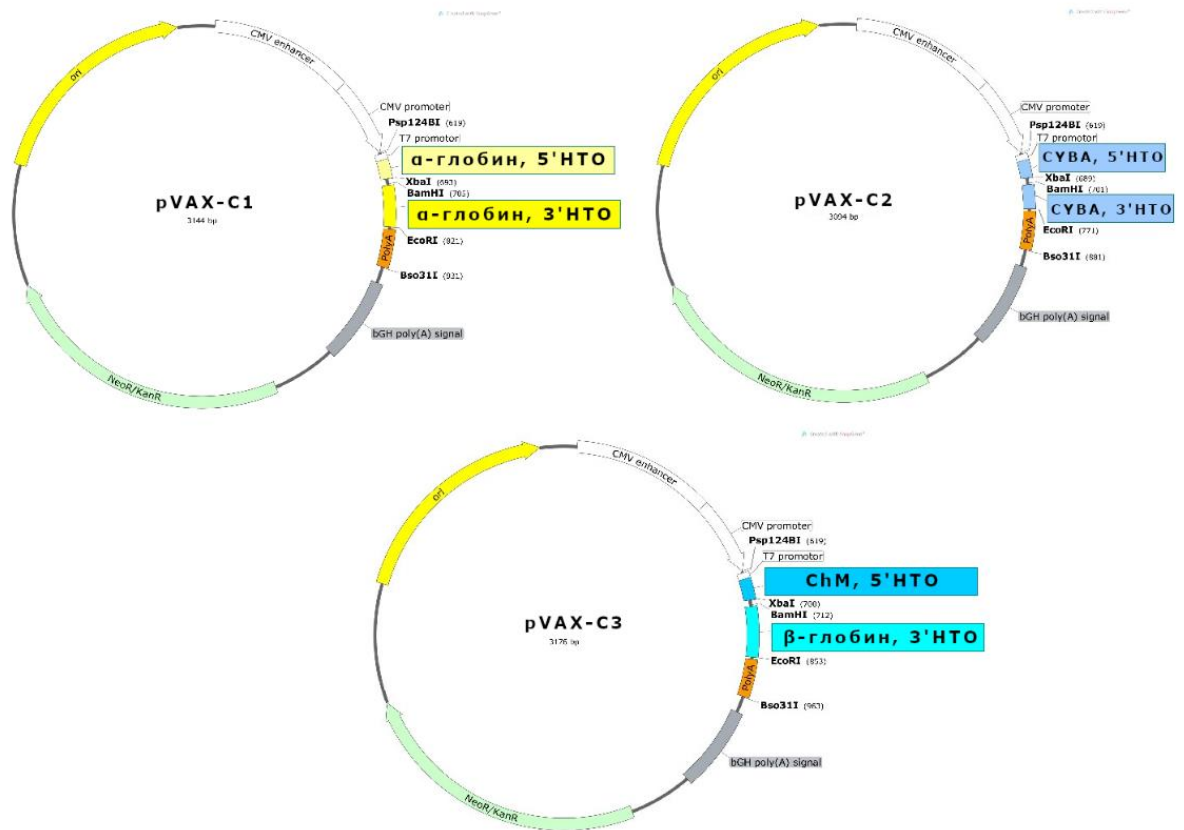


Рисунок 25. Карты плазмид pVAX-C1, pVAX-C2 и pVAX-C3

Оценку влияния нетранслируемых областей на трансляцию белка проводили на модели GFP и были получены конструкции pVAX-C1-GFP, pVAX-C2-GFP и pVAX-C3-GFP (рис.26). Структуру плазмид подтверждали с помощью секвенирования по методу Сэнгера и затем амплифицировали плазмидную ДНК в клетках E.coli NEB stable.

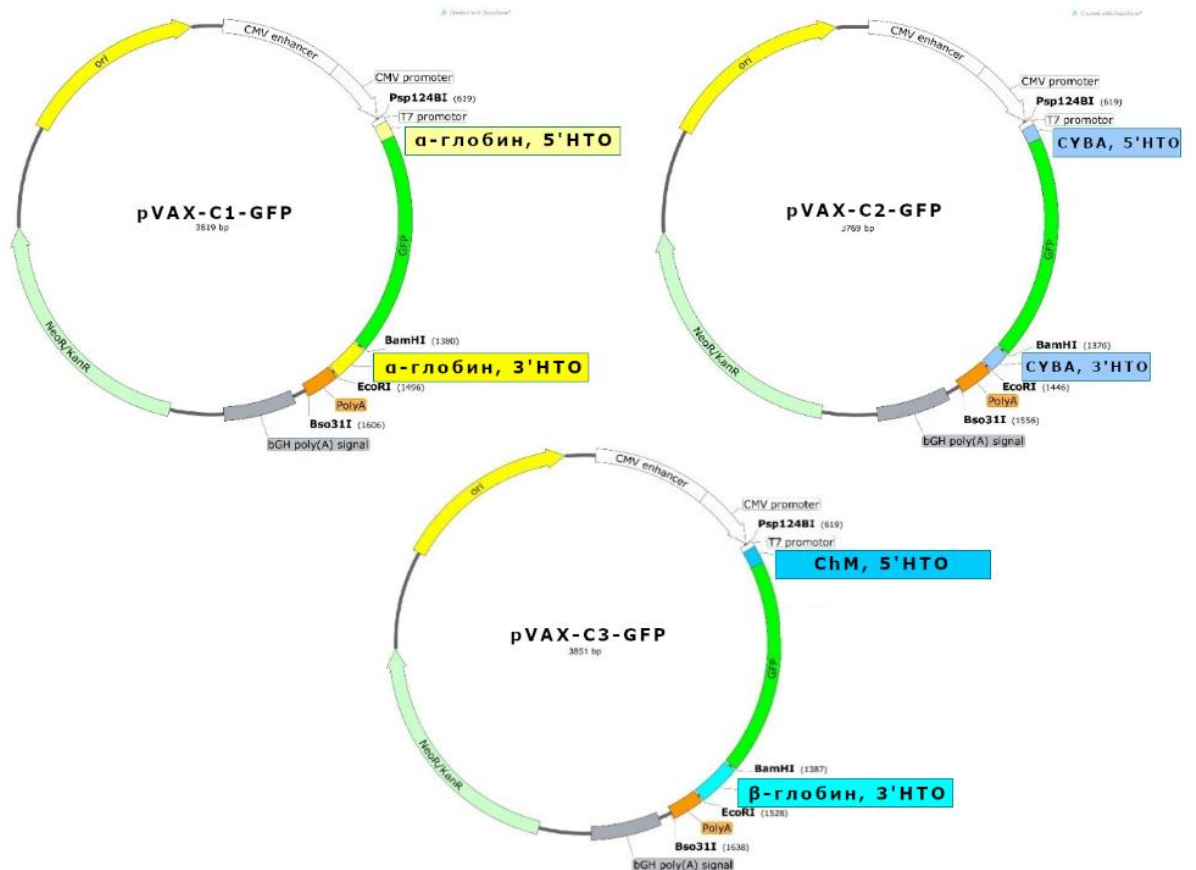


Рисунок 26. Карты плазмид *pVAX-C1-GFP*, *pVAX-C2-GFP* и *pVAX-C3-GFP*

Для синтеза мРНК использовали матрицы, полученные на основе следующих векторов: *pVAX-C1-GFP*, *pVAX-C2-GFP* и *pVAX-C3-GFP*. Матрицы линейаризовали по сайту рестрикции *Bso31I*. Синтез проводили котранскрипционным способом.

Оценку влияния НТО на эффективность трансляции проводили с помощью трансфекции клеток НЕК293 мРНК-С1-GFP, мРНК-С2-GFP и мРНК-С3-GFP с последующим анализом синтеза зеленого флуоресцентного белка с помощью микроскопа. На рисунке 27 представлены микрофотографии клеток НЕК293, трансфицированных мРНК-С1-GFP, мРНК-С2-GFP и мРНК-С3-GFP, и результаты проточной цитофлуориметрии.

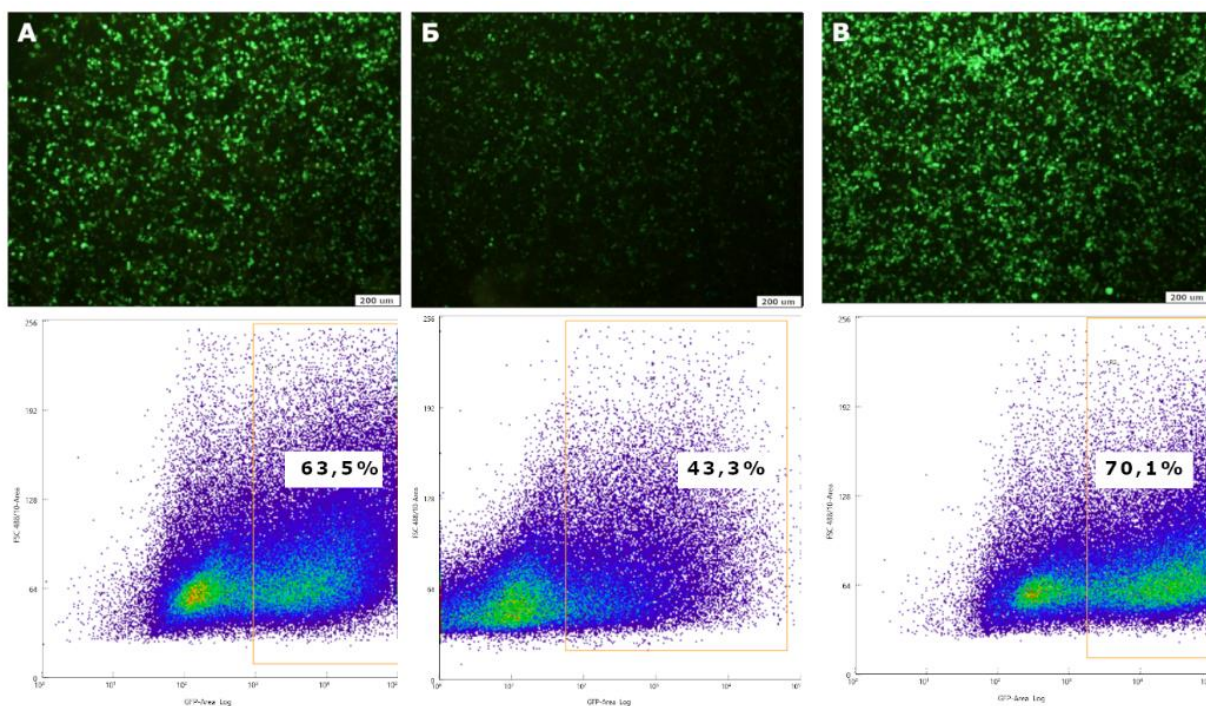


Рисунок 27. Оценки эффективности экспрессии мРНК-GFP на культуре клеток HEK293. Микрофотография клеток HEK293 и данные, полученные с помощью проточного цитофлуориметра. А- мРНК-C1-GFP, Б - мРНК-C2-GFP, В- мРНК-C3-GFP

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, что более чем в полтора раза меньше, чем у первого и третьего варианта, но в то же время в два раза больше, чем у мРНК-GFP без НТО, где результат составил 21,5%.

Таким образом, на данном этапе работы были отработаны различные методы синтеза мРНК и выбраны нетранслируемые области для эффективной трансляции белка. Были сконструированы три универсальные ДНК-матрицы для синтеза мРНК: pVAX-C, содержащая 5'- и 3'-НТО α -глобина; pVAX-C2, содержащая 5'- и 3'-НТО СУВА; pVAX-C3, содержащая 5'-НТО ChM и 3'-НТО β -глобина. Было решено не использовать pVAX-C2 в дальнейшей работе, так как она показала наименьшую эффективность, согласно оценке экспрессии мРНК на модели GFP, по сравнению с конструкциями pVAX-C1 и pVAX-C3.

3.2. 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 [199, 200], 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) или рецептор опознавания паттерна (RIG-1), и индуцировать секрецию различных цитокинов, включая интерфероны типа I, интерлейкин-6 (IL-6) и фактор некроза опухоли- α (TNF- α). Кроме того, происходит активация дцРНК-зависимых ферментов, таких как олигоденилатсинтетаза (OAS), РНК-специфическая аденозиндезаминаза и РНК-активируемая протеинкиназа (PKR), которые приводят к ингибированию синтеза белка на рибосомах, тем самым снижая, или полностью останавливая, действие мРНК-вакцины [7, 201]. 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 [202].

Одним из эффективных способов, который используется в настоящее время для удаления примесей дцРНК из препаратов мРНК, является ион-парная ВЭЖХ с обращенной фазой, проводимая в полуденатурирующих условиях [7, 203]. Однако у данного способа есть ряд существенных недостатков: высокая стоимость, необходимость специального оборудования, сложное масштабирование и использование токсичных реагентов, таких как ацетонитрил, который требует дорогой дезактивации.

Существуют метод очистки [153], 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 её 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.

Для отработки метода было синтезировано 120 мкг мРНК-GFP котранскрипционным способом. Очистку от примесей дцРНК проводили в 20 % этанолсодержащем буфере с суспендированной в нем целлюлозой. На очистку брали 100 мкг мРНК-GFP. После очистки выход мРНК составил около 70% одноцепочечной мРНК: примерно 74 мкг очищенной фракции, 22 мкг в элюате дцРНК с целлюлозы после очистки, а 4 мкг, по-видимому, осталось на целлюлозе.

В синтезированной мРНК присутствуют минорные примеси дцРНК, которые не определяются в обычном агарозном электрофорезе, в силу их низкой концентрации. Для решения этой задачи, мы использовали капиллярный электрофорез, обладающий высокой чувствительностью. На анализ брали 3 образца: мРНК до очистки, элюат дцРНК и очищенную мРНК. Оценку каждого образца выполняли в двух вариантах: с денатурацией мРНК в течение 10 минут при 70⁰ С и без денатурации.

3.2.1. Оценка очистки мРНК от примесей дцРНК *in vitro*

Результаты капиллярного электрофореза показали, что размер целевой мРНК составил около 965 нуклеотидов, что соответствует ожидаемому размеру, и одинаков как до очистки на целлюлозе, так и после очистки. Это говорит о том, что процедура очистки не приводит к повреждению мРНК (рис.28А). Анализ очищенной мРНК, подвергнутой денатурации и без денатурации, показал, что профиль мРНК практически не изменяется (рис.28В), в то время как во фракции элюата дцРНК после денатурации появляется множество сигналов разного размера (рис.28Г). Мы предполагаем, что это могут быть короткие молекулы, комплементарные целевому продукту, образованные во время синтеза мРНК. Возможно, именно они и образуют примесную дцРНК. Кроме того, на электрофореграммах наблюдается пик размером 1740 нуклеотидов, который исчезает при денатурации, но остаётся в «грязной» фракции, причем смещается в сторону большего размера (рис.28Б). Данный сигнал может быть следствием гибридизации двух комплементарных молекул между собой.

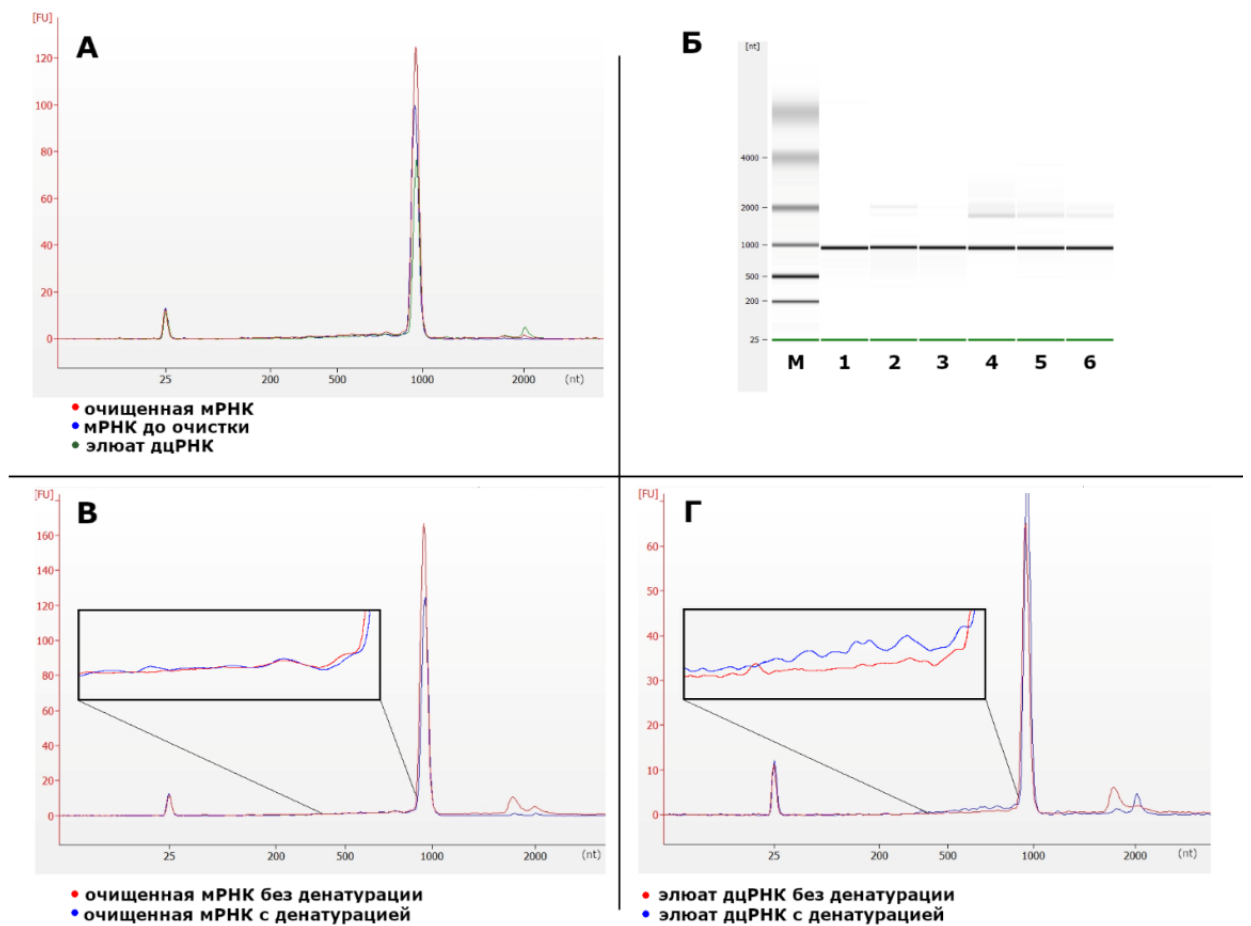


Рисунок 28. Разделение продуктов синтеза мРНК с помощью метода капиллярного электрофореза. А. Сравнение между собой всех фракций мРНК, подвергнутых денатурации; Б. Оценка длины мРНК: 1 – мРНК до очистки, 2 – элюат дцРНК, 3 – очищенная мРНК; В. Сравнение очищенной мРНК, подвергнутой денатурации и без денатурации. Г. Сравнение элюата дцРНК подвергнутого денатурации и без денатурации.

С помощью дот-блот анализа мы показали, что антитела, специфичные к двуцепочечной РНК, выявляют ее наличие во всех фракциях, кроме очищенной мРНК (рис.29).

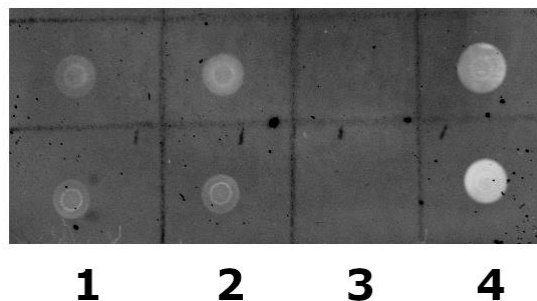


Рисунок 29. Дот-блот анализ фракций мРНК. Оценка эффективности очистки двух партий мРНК-GFP на целлюлозе с помощью антител к дцРНК. 1 - мРНК до очистки, 2 – элюат дцРНК, 3 – очищенная мРНК, 4 – положительный контроль, дцРНК.

3.2.2. 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, путём 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 30А, 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 коинкубации 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.30Б,В).

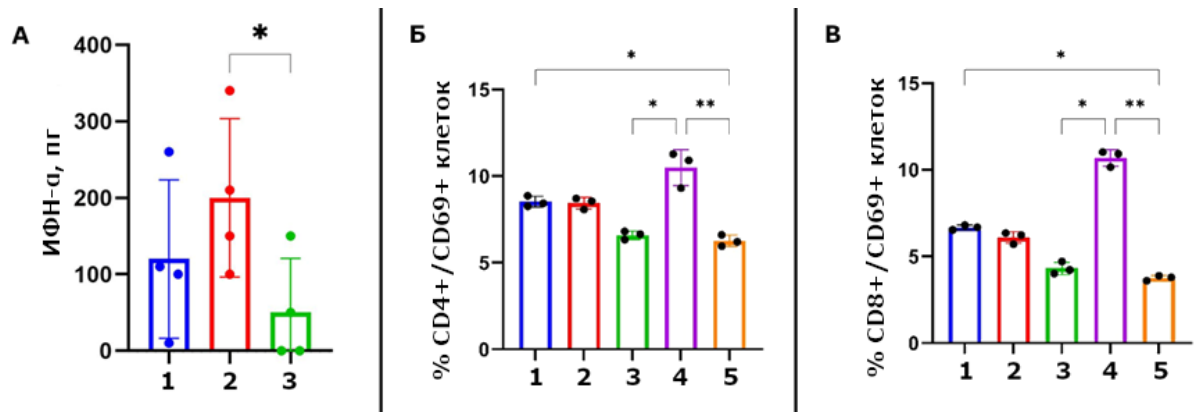


Рисунок 30. Оценка эффективности очистки мРНК *in vivo* и *ex vivo*. А. Индукция IFN- α фракциями мРНК у мышей линии BALB/c. 1 – мРНК до очистки, 2 – элюат дцРНК, 3 – очищенная мРНК (фоновый уровень IFN- α в сыворотке чистой мыши вычтен из экспериментальных образцов). Б. Результат активации CD4+ Т-лимфоцитов мышей после стимуляции мРНК. Представлено процентное содержание CD3+CD4+ Т-лимфоцитов, несущие 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, несущие 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 Краскела — 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*. Модифицированный нами метод очистки позволил получить практически аналогичные результаты, полученные по оригинальной методике [153], по дот-блот анализу и определению уровня IFN α в сыворотке крови: очищенный препарат мРНК не содержит примесей, выявляемых антителами к дцРНК, и не индуцирует повышенный выброс IFN α . Кроме того, мы провели несколько дополнительных исследований. Методом капиллярного электрофореза мы показали, что в мРНК, синтезированной с помощью T7 полимеразы, присутствуют короткие молекулы, комплементарные целевому продукту, которые с высокой вероятностью могут образовывать дцРНК. Дополнительно подтвердили очистку с помощью определения уровня активации CD69 лимфоцитов, было показано, что очищенная мРНК активирует CD69 лимфоциты на уровне интактных мышей. Следует отметить, что в соответствии с требованиями ЕМА доказательством отсутствия примесей дцРНК в препаратах мРНК является отсутствие сигнала в дот-блот анализе [204], и таким образом, чистота полученного в данной работе препарата мРНК соответствует стандарту ЕМА.

На основании всего выше сказанного 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 T7-промотора для использования AG-Сар аналога и НТО из высокоэкспрессируемых генов.
3. Синтез мРНК *in vitro* котранскрипционным способом, с использованием сконструированной ДНК-матрицы, AG-сар 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 pVAX-C1 и pVAX-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.

3.3. 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.

3.3.1. Конструирование матрицы для синтеза мРНК-C3-H1

В качестве матрицы для конструирования мРНК-вакцины использовали плазмиду рVAX-C3, кодирующую последовательности ChM и β -глобина человека. В качестве источника целевого гена для мРНК-вакцины использовалась плазида рVAX-H1, несущая оптимизированный ген гемагглютинина вируса гриппа A/California/04/09 (H1N1)pdm09 без трансмембранного цитоплазматического домена, ранее полученная в отделе биоинженерии ГНЦ ВБ Вектор. Оптимизацию кодонного состава последовательности, необходимую для мРНК-вакцины, проводили с помощью программы GeneOptimizer (<https://www.thermofisher.com/ru/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html>).

Перед получением конструкции рVAX-C3-H1, было проведено моделирование вторичной структуры 5'-НТО + 20 нуклеотидов после AUG с помощью веб-сервиса ViennaRNA Web Services и инструмента RNAfold Server. Результаты моделирования были схожими с конструкцией C3-GFP (рис.31), MFE составила -18.00 ккал/моль.

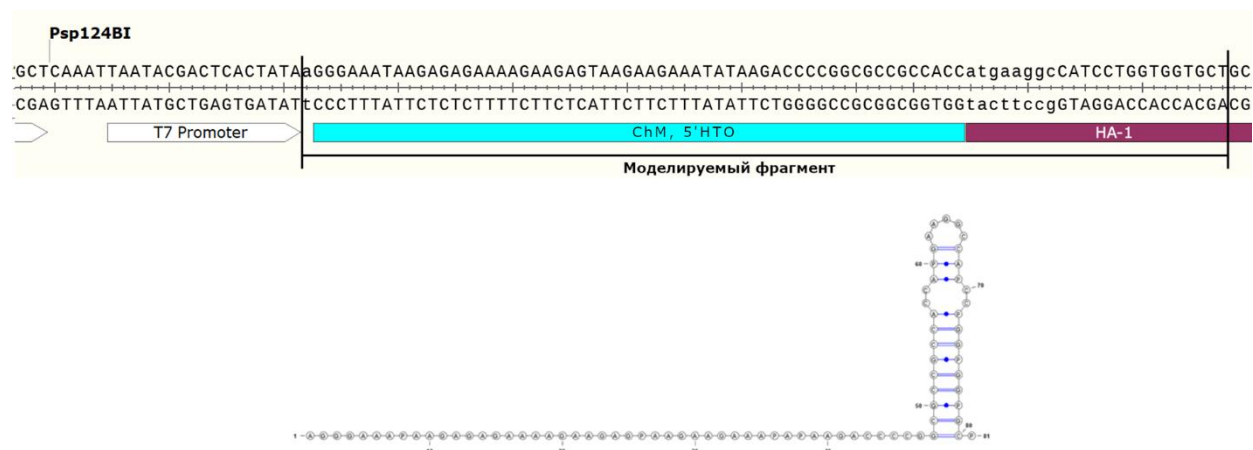


Рисунок 31. Моделирование вторичной структуры 5'-НТО элементов β -глобина совместно с 20 нуклеотидами гена HA1.

Клонирование проводили по схеме, описанной в разделе 2.2.2. Для ПЦР использовались праймеры С3-Н1-F и С3-Н1-R, и плаزمиды рVAX-Н1. Встройку полученного фрагмента проводили в универсальную матрицу рVAX-С3 по сайтам рестрикции Psp124ВI и BamHI. В результате была получена конструкция рVAX-С3-Н1 (рис.32).

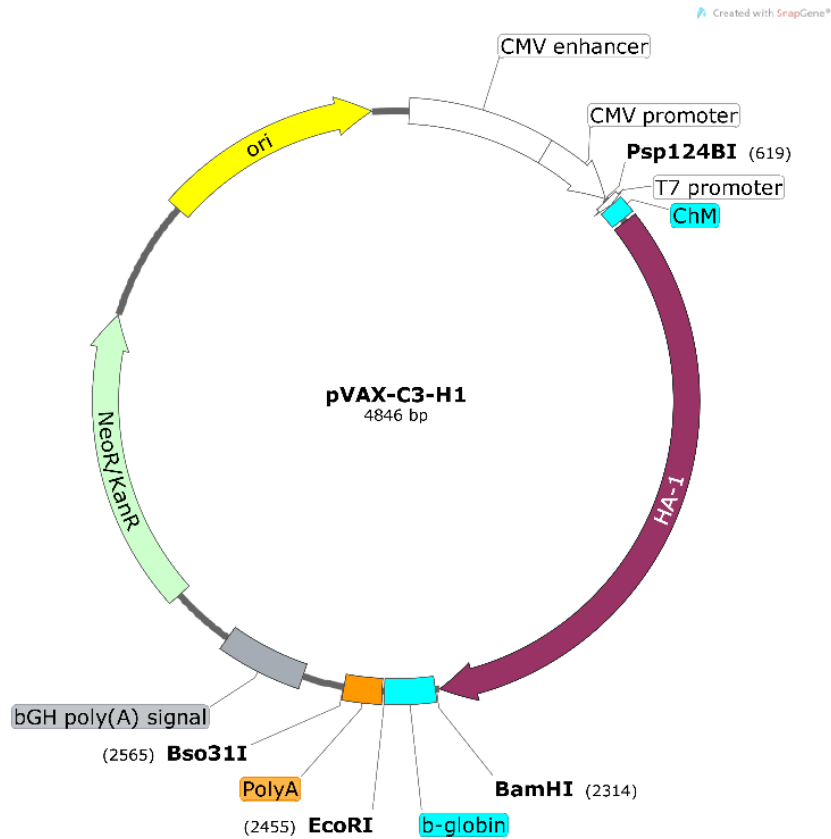


Рисунок 32. Карта плазмиды рVAX-С3-Н1.

3.3.2. Синтез мРНК-С3-Н1

Синтез мРНК проводили ранее описанным способом (см. пункт 2.2.5). Перед синтезом проводили наработку ДНК-матрицы в необходимых количествах, затем её линеаризовали по сайту рестрикции Bso31I. Синтез мРНК проводили с помощью T7-полимеразы (БиолабМикс, Новосибирск), с использованием AG-Сар аналога и метилпсевдоуридина. После синтеза проводили очистку от примесей дцРНК на порошке целлюлозе, согласно предложенному ранее способу в разделе 3.2.

3.3.3. Анализ трансляции мРНК-С3-Н1 в трансфицированных клетках НЕК-293

Для анализа трансляционной способности полученной мРНК-С3-Н1, была проведена трансфекция культуры клеток НЕК293. Вестерн-блот культуральной среды с использованием моноклональных антител к гемагглютинину подтвердил, что мРНК-С3-Н1 обеспечивает синтез целевого вирусного белка в эукариотических клетках (рис.33).

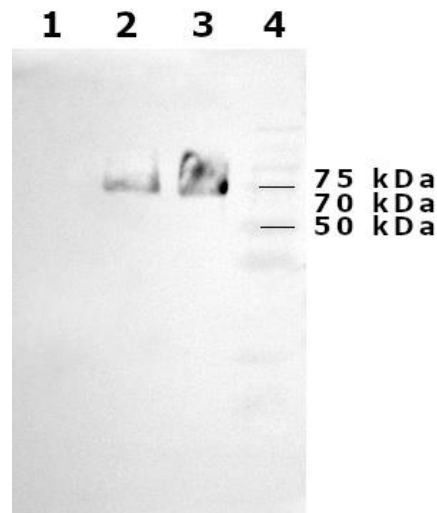


Рисунок 33. Результаты вестерн-блота культуральной среды клеток HEK293, трансфицированных мРНК-С3-Н1. 1 – культуральная среда нетрансфицированных клеток HEK293 (отрицательный контроль), 2 – культуральная среда клеток HEK293, трансфицированных мРНК-Н1, 3 – рекомбинантный белок Н1 (положительный контроль), 4 - Маркер Precision Plus Protein Dual Color Standards

3.3.4. Иммунизация лабораторных животных

Для доставки мРНК-вакцины был выбран метод струйной безыгольной инъекции «голой» мРНК в физиологическом растворе. Струйная безыгольная инъекция представляет большой интерес, как способ доставки нуклеиновых кислот. Она связана с изменением напряжения сдвига между высокоскоростной струёй, выходящей из сопла инжектора под давлением, и поверхностью клеток тканей, через которые проходит данная струя. Это приводит к образованию пор в клеточной мембране, через которые происходит усиленное поглощение клеткой нуклеиновой кислоты в обход эндоцитоза, что приводит к значительному увеличению иммуногенности мРНК-вакцин. Данный метод зарекомендовал себя для иммунизации ДНК-вакцинами [205], [206], поэтому мы решили применить его для иммунизации животных мРНК-вакцинами. Схема эксперимента указана на рисунке 34. В качестве положительного контроля использовали трёхвалентную коммерческую вакцину Флю-М 2020 года. В данной работе не ставилась задача сравнить эффективность разработанной моновалентной экспериментальной вакцины с контролем, коммерческая вакцина использовалась только как положительный контроль эксперимента.

- 3 группы по 10 животных
 1 - 30 мкг мРНК-С3-Н1 в 50мкл PBS
 2 - "+" контроль, вакцина Флю-М, 250 мкл
 3 - "-" контроль, 50 мкл PBS



Рисунок 34. Схема эксперимента исследования мРНК вакцины мРНК-С3-Н1

3.3.5. 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 (ФГУП СПБНИИВС ФМБА России, Россия, 2021 год), значительно превышают титр антител у мышей контрольной группы. При иммунизации мышей мРНК-вакциной средний титр антител, специфичных к рекомбинантному белку НА Н1N1, составил около 1:460000, а при иммунизации коммерческой вакциной Флю-М около 1:83000 (рис.35А). 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.35Б). Такая разница в титрах антител может быть вызвана антигенным несоответствием между НА Н1N1 штамма вируса гриппа A/California/4/2009 (H1N1)pdm09 и штамма A/Victoria/2570/2019 (H1N1)pdm09, включенного в сезонную вакцину 2021-2022 гг.

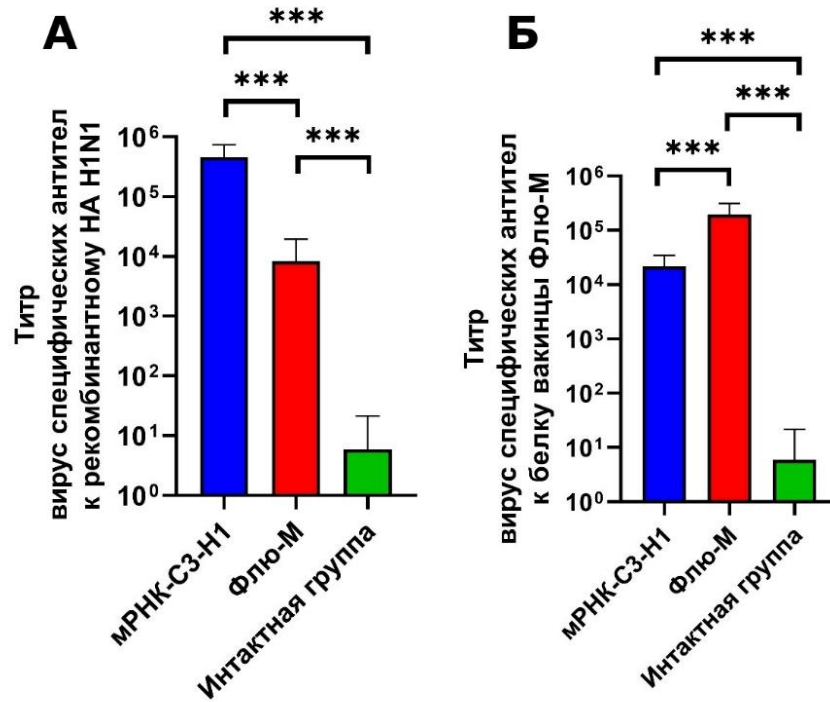


Рисунок 35. Титры специфических антител IgG в сыворотках иммунизированных мышей BALB/c. Три группы животных по 10 в каждой, 1 группа – мыши, иммунизированные мРНК-вакциной мРНК-С3-Н1, 2 группа – мыши, иммунизированные коммерческой вакциной ФЛЮ-М, 3 группа – интактные мыши. А. ИФА с использованием в качестве антигена белка НА вируса гриппа Н1N1. 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-С3-Н1 так и вакциной Флю-М, продемонстрировали способность нейтрализовать A/California/04/09 (H1N1) MA8 в культуре клеток MDCK *in vitro* в реакции вирус нейтрализации (рис.36) с использованием вируса A/California/4/2009 (H1N1pdm09), средний титр составил 1:160 и 1:320 соответственно.

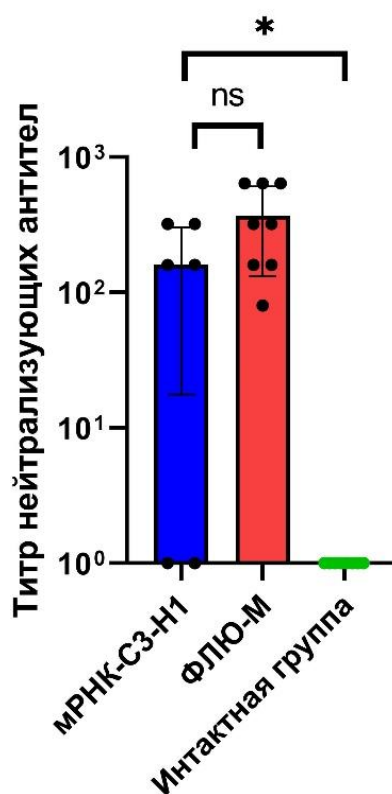


Рисунок 36. Вируснейтрализующая активность сывороток мышей, иммунизированных препаратами. Три группы животных по 10 в каждой, 1 группа – мыши, иммунизированные мРНК-вакциной мРНК-С3-Н1, 2 группа – мыши, иммунизированные коммерческой вакциной ФЛЮ-М, 3 группа – интактные мыши. Результаты выражены как медиана с диапазоном. Данные были проанализированы с использованием непараметрических тестов. Достоверность была рассчитана с использованием непараметрического анализа Манна-Уитни (*ns*, статистически недостоверно; * $p < 0,05$).

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.37). Среднее количество Т-лимфоцитов, секретирующих IFN γ , составляло 236 на 1млн клеток. Значения в опытных группах достоверно отличались от контроля.

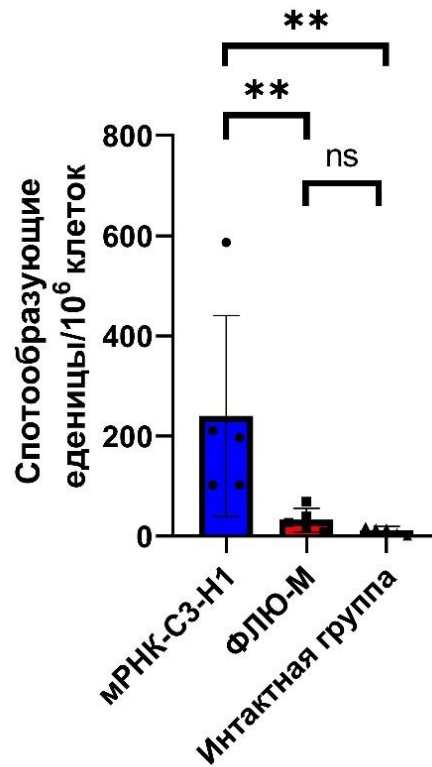


Рисунок 37. Оценка T-клеточного иммунного ответа методом ELISpot. Число клеток, продуцирующих IFN γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов (по данным ELISpot). Три группы животных по 5 в каждой, 1 группа – мыши, иммунизированные мРНК-вакциной мРНК-С3-Н1, 2 группа – мыши, иммунизированные коммерческой вакциной ФЛЮ-М, 3 группа – интактные мыши. 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; ** $p < 0,01$).

Способность мРНК-вакцины индуцировать защитный иммунитет изучалась на штамме адаптированного к мышам вируса гриппа A/California/4/2009 (H1N1pdm09) (рис.38). Защитное действие разработанной мРНК-вакцины было изучено при интраназальном заражении летальной дозой вируса (20 МЛД₅₀). Мышей заражали на 29 день после иммунизации. На рисунке приведены данные о выживаемости. Полученные результаты показали, что статистически значимый защитный эффект от летальной дозы вируса A/California/04/09 (H1N1pdm09) 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 %.

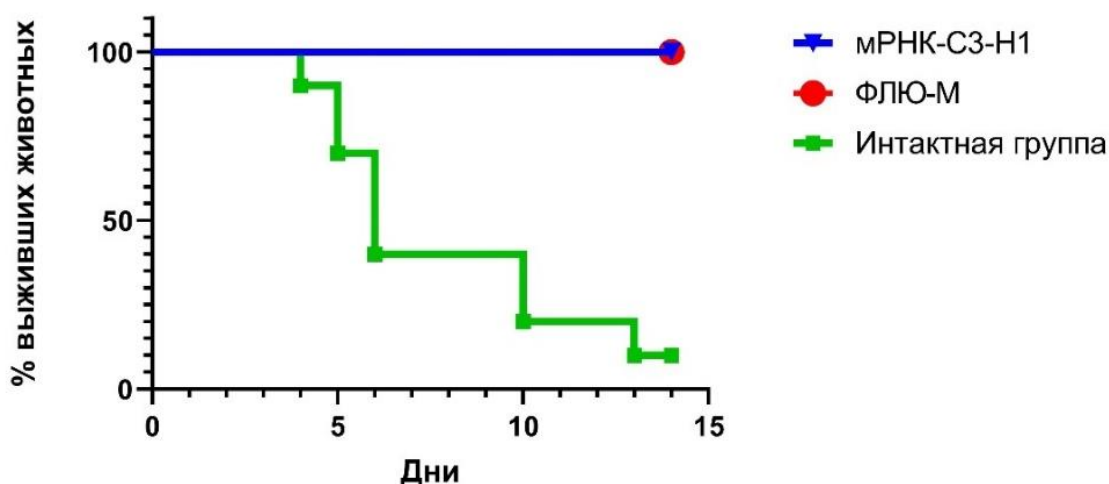


Рисунок 38. Выживаемость иммунизированных животных после летального заражения адаптированным к мышам вирусом гриппа A/California/4/09(H1N1)pdm09. Моделирование функции выживания проводили с помощью множительной оценки Каплана-Мейера, сравнение выживания с контрольной группой с помощью критерия Мантеля-Кокса.

Таким образом, на данном этапе работы нами была сконструирована ДНК матрица для синтеза экспериментальной мРНК-вакцины мРНК-С3-Н1, кодирующей полноразмерный гемагглютинин вируса гриппа Н1N1, несущей регуляторные 5'НТО ChM в 3'НТО β-глобина человека. После синтеза мРНК, её работоспособность была проверена на культуре клеток НЕК293. 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 Н1N1 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 Т-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(H1N1pdm09).

3.4. 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-связывающего домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2, так как именно он является основной мишенью вируснейтрализующих антител, препятствующих проникновению вируса в клетку.

3.4.1. 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 плазмида pVAX-RBD, кодирующая RBD белка S SARS-CoV-2 штамм Wuhan-Hu-1, ранее полученная в отделе биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ Вектор [207].

Перед получением конструкции pVAX-C1-RBD было проведено моделирование вторичной структуры 5'НТО + 20 нуклеотидов после AUG с использованием веб-сервиса ViennaRNA Web Services и инструмента RNAfold Server. Результаты моделирования в целом схожими с конструкцией C1-GFP (рис.39), но видно изменение шпильки в начале гена RBD, что вызвано разностью их нуклеотидного состава.

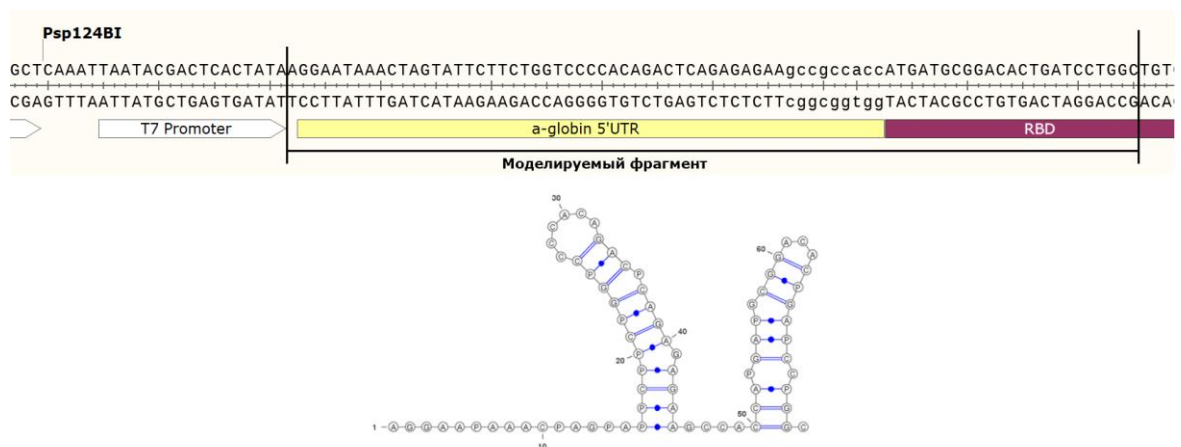


Рисунок 39. Моделирование вторичной структуры 5'-НТО элементов α -глобина совместно с 20 нуклеотидами гена RBD

Клонирование проводили по схеме, описанной в разделе 2.2.2. 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 (рис.40).

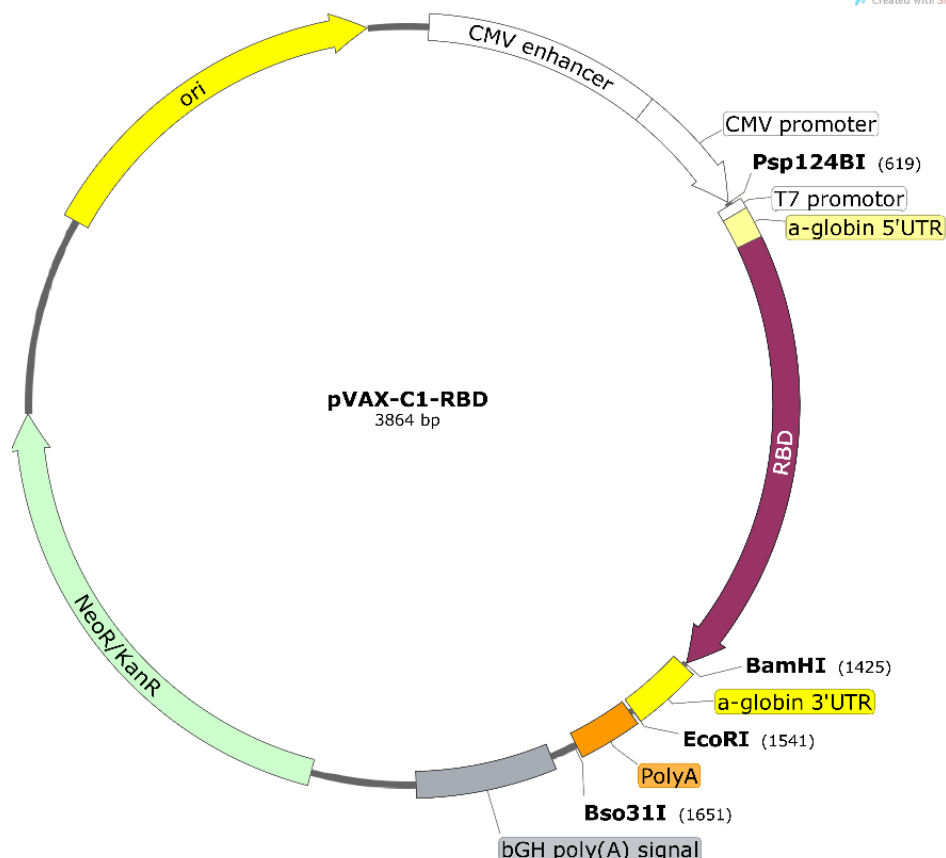


Рисунок 40. Карта плазмиды pVAX-C1-RBD.

3.4.2. Синтез мРНК-C1-RBD

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

3.4.3. Анализ экспрессии мРНК-C1-RBD в трансфицированных клетках HEK-293

Для анализа работоспособности мРНК проводили трансфекцию культуры клеток HEK293 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.41).

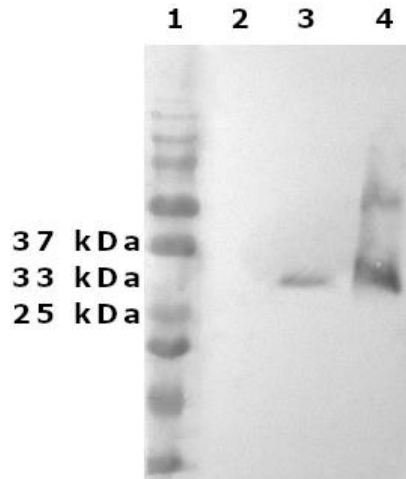


Рисунок 41. Результаты вестерн-блота культуральной среды клеток HEK293, трансфицированных мРНК-C1-RBD. 1 - Маркер Precision Plus Protein Dual Color Standards, 2 – культуральная среда нетрансфицированных клеток HEK293 (отрицательный контроль), 3 – культуральная среда клеток, трансфицированных мРНК-C1-RBD, 4 – рекомбинантный белок RBD (положительный контроль).

3.4.4. Оценка иммунного ответа

Для иммунизации лабораторных животных использовали метод безыгольной струйной инъекции. Мышам вводили мРНК в дозе 30 мкг, двукратно с интервалом 14 дней. Схема эксперимента показана на рисунке 42.

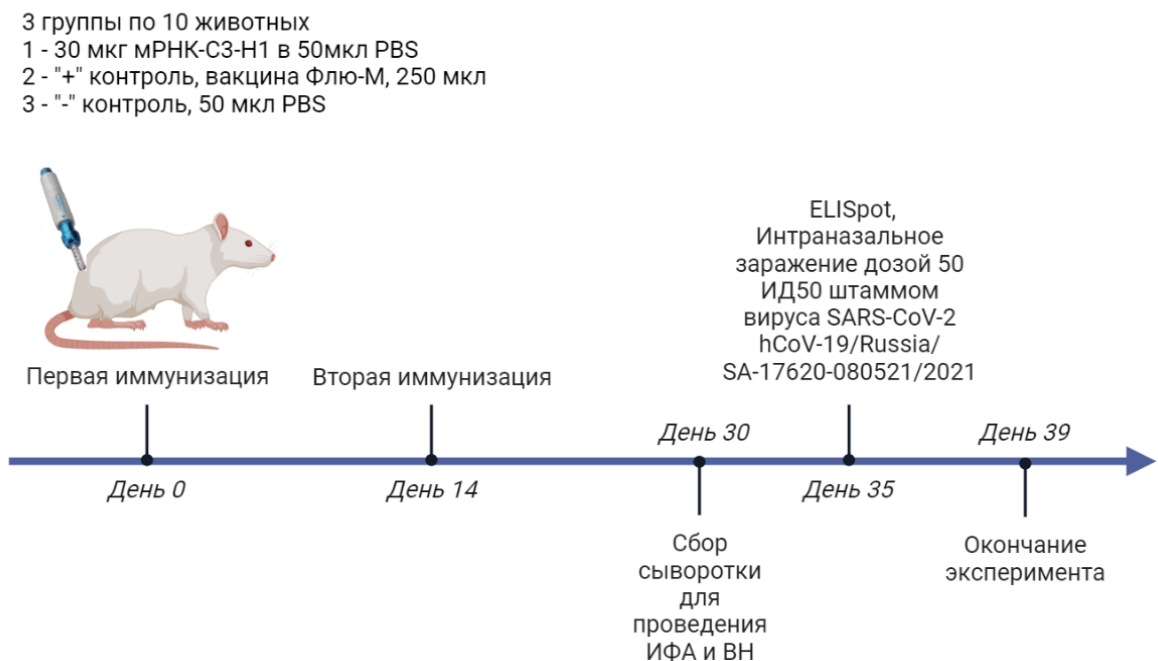


Рисунок 42. Схема эксперимента исследования мРНК вакцины мРНК-С3-Н1

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.43).

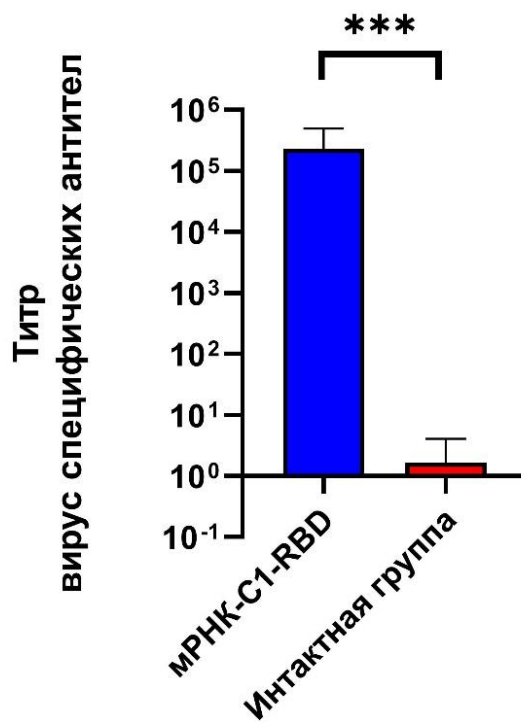


Рисунок 43. Титры специфических антител в сыворотках иммунизированных мышей BALB/c. Две группы животных по 10 в каждой, 1 группа – мыши иммунизированные мРНК-вакциной мРНК-С1-RBD, 2 группа – интактные мыши. В ИФА определяли титры специфических антител IgG к рекомбинантному белку RBD. Результаты выражены 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. Оценку вируснейтрализации проводили в тесте как с живым вирусом, штамм вируса SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 (рис.44А), так и с псевдотипированными лентивирусными частицами, несущих на своей поверхности S гликопротеин SARS-CoV-2 (рис.44Б). Результаты показали, что средний титр нейтрализующих антител в первом случае составил 1:540, а во втором 1:160.

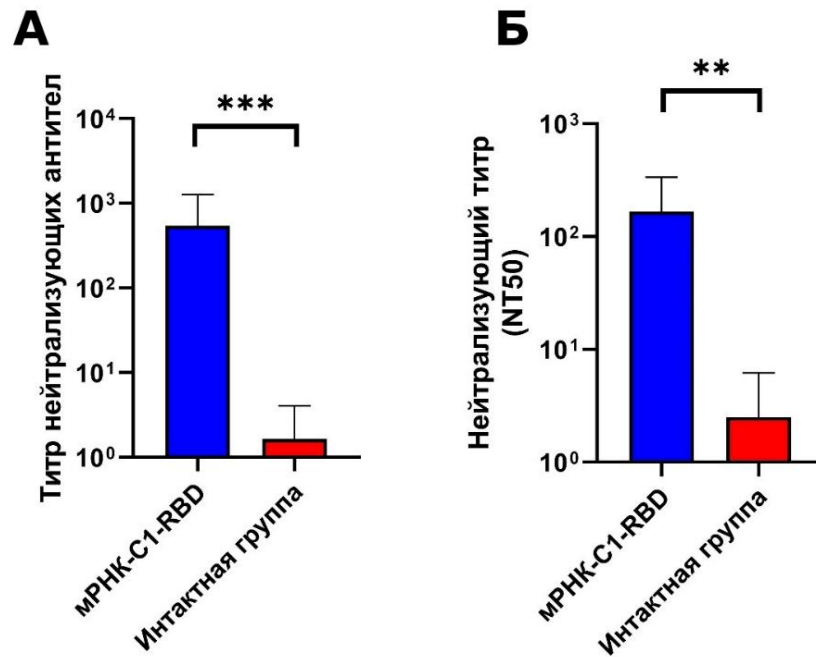


Рисунок 44. Вируснейтрализующая активность сывороток мышей. Две группы животных по 10 в каждой, 1 группа – мыши, иммунизированные мРНК-вакциной мРНК-С1-RBD, 2 группа – интактные мыши. А. Результаты вируснейтрализации с использованием штамма SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 (100 TCID₅₀). Б. Результаты 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.45). 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.

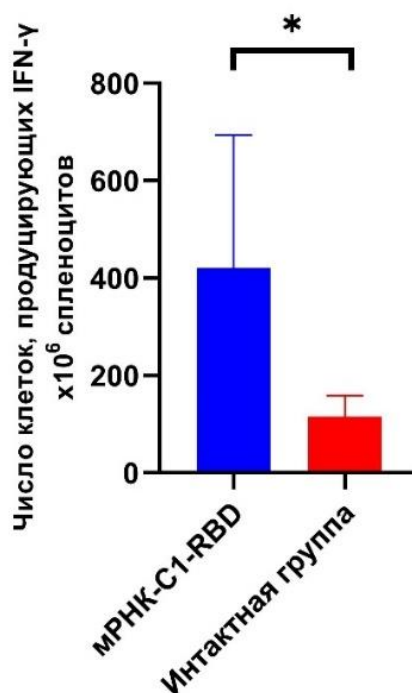


Рисунок 45. Оценка T-клеточного иммунного ответа методом ELISpot. Число клеток, продуцирующих IFN γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов (по данным ELISpot). Две группы животных по 5 в каждой, 1 группа – мыши, иммунизированные мРНК-вакциной мРНК-C1-RBD, 2 группа – интактные мыши. Каждый 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 46. Экспериментальная группа показала достоверное снижение вирусной нагрузки в легочной ткани животных, иммунизированных 30 мкг мРНК-C1-RBD, в сравнении с отрицательной группой.

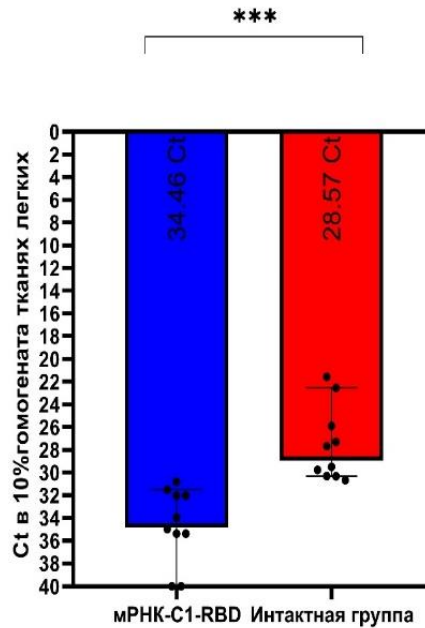


Рисунок 46. Вирусная нагрузка в тканях легких мышей BALB/c на 4-е сутки после заражения Гамма-вариантом SARS-CoV-2. Две группы животных по 10 в каждой, 1 группа – мыши, иммунизированные мРНК-вакциной мРНК-C1-RBD, 2 группа – интактные мыши. Индивидуальные значения Ct в ОТ-ПЦР реального времени представлены 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 (***) $p < 0,001$.

В данной работе мы не проводили прямого сравнения разрабатываемой экспериментальной мРНК-вакцины против COVID-19 с используемыми мРНК-вакцинами из-за невозможности закупить вакцины Moderna и Pfizer. Мы провели сравнение результатов оценки эффективности вакцин на лабораторных животных по данным из литературы, включая другие используемые вакцины (таблица 5).

Таблица 5. Сравнение иммуногенности экспериментальной мРНК-вакцины мРНК-C1-RBD с актуальными вакцинами на модели мышей.

Вакцина	Гуморальный ответ, средний титр	Вируснейтрализация, средний титр	Т-клеточный ответ
мРНК-C1-RBD	1:230000	~1:540	+
мРНК-вакцина BNT162b2 (Pfizer) [3]	1:430000	~1:296	+
мРНК-вакцина mRNA-1273 (Moderna) [208]	~1:700000	~1:4000	+

ЭпиВакКорона (хомяки) [209]	~1:12000 (Специальная тест система)	~1:40	Нет данных
Спутник V [210]	1:46000	~1:120	+

Согласно результатам сравнения, в целом экспериментальная мРНК-вакцина мРНК-С1-RBD формирует иммунный ответ против SARS-CoV-2 на уровне используемых коммерческих вакцин. Что касается других мРНК-вакцин компаний Moderna и Pfizer, наши результаты, вероятнее всего, отличаются из-за разности способа доставки мРНК. В лицензированных вакцинах используются химический способ доставки - ЛНЧ, в то время как в данной работе мы использовали физический метод доставки - струйную безыгольную инъекцию.

Таким образом, на данном этапе работы нами была сконструирована ДНК матрица для синтеза экспериментальной мРНК-вакцины мРНК-С1-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-С1-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 легкого 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 исследованию 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-Сар 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-С3-Н1, кодирующая белок гемагглютинаина вируса гриппа A(H1N1)pdm09, другая - вакцина против COVID-19, мРНК-С1-RBD, кодирующая рецептор связывающих 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 экспонированием и полиаденилированием с добавлением AG-Cap аналога в реакционную смесь и с использованием ДНК-матрицы, кодирующей поли(А)хвост а соответственно.

2) Сконструированы три универсальные ДНК-конструкции: рVAX-C1, содержащая НТО α -глобина человека; рVAX-C2, содержащая НТО альфа цепи цитохрома b-245, 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 связывающей 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang C. et al. Advances in mRNA vaccines for infectious diseases // *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 2019. Vol. 10, № MAR.
2. Pardi N. et al. mRNA vaccines-a new era in vaccinology // *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 17, № 4. P. 261–279.
3. Vogel A.B. et al. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2 // *Nature*. Nature Research, 2021. Vol. 592, № 7853. P. 283–289.
4. Walsh E.E. et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates // *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 2020. Vol. 383, № 25. P. 2439–2450.
5. Teo S.P. Review of COVID-19 mRNA Vaccines: BNT162b2 and mRNA-1273 // *Journal of Pharmacy Practice*. SAGE Publications Inc., 2022. Vol. 35, № 6. P. 947–951.
6. Chen Y. et al. Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses // *Journal of Zhejiang University: Science B*. Zhejiang University Press, 2021. Vol. 22, № 8. P. 609–632.
7. Karikó K. et al. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA // *Nucleic Acids Res*. 2011. Vol. 39, № 21.
8. Adibzadeh S. et al. Enhancing Stability of Destabilized Green Fluorescent Protein Using Chimeric mRNA Containing Human Beta-Globin 5' and 3' Untranslated Regions. 2017. Vol. 11, № 1.
9. Cao J. et al. High-throughput 5' UTR engineering for enhanced protein production in non-viral gene therapies // *Nat Commun*. Nature Research, 2021. Vol. 12, № 1.
10. Coronavirus Pandemic (COVID-19) – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ourworldindata.org/coronavirus>, (дата обращения: 01.10.2023).
11. Carabelli A.M. et al. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness // *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research, 2023. Vol. 21, № 3. P. 162–177.
12. WHO, Influenza (Seasonal) - [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (дата обращения: 01.10.2023).
13. Scorza F.B., Pardi N. New kids on the block: RNA-based influenza virus vaccines // *Vaccines*. MDPI AG, 2018. Vol. 6, № 2.
14. Krammer F. et al. Influenza // *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 4, № 1. P. 1–21.
15. ICTV. ICTV Taxonomy. – International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy> (дата обращения: 01.10.2023).

16. Klimov A.I. et al. WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011 // *Vaccine*. Elsevier Ltd, 2012. Vol. 30, № 45. P. 6461–6471.
17. Dawson W.K., Lazniowski M., Plewczynski D. RNA structure interactions and ribonucleoprotein processes of the influenza A virus // *Brief Funct Genomics*. Oxford University Press, 2018. Vol. 17, № 6. P. 402–414.
18. Seladi-Schulman J., Steel J., Lowen A.C. Spherical Influenza Viruses Have a Fitness Advantage in Embryonated Eggs, while Filament-Producing Strains Are Selected In Vivo // *J Virol*. American Society for Microbiology, 2013. Vol. 87, № 24. P. 13343–13353.
19. Gaymard A. et al. Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses // *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V., 2016. Vol. 22, № 12. P. 975–983.
20. Zebedee S.L., Lamb R.A. Influenza A Virus M2 Protein: Monoclonal Antibody Restriction of Virus Growth and Detection of M2 in Virions // *JOURNAL OF VIROLOGY*. 1988. Vol. 62, № 8. 2762–2772 p.
21. Mtambo S.E. et al. Influenza viruses: Harnessing the crucial role of the M2 ion-channel and neuraminidase toward inhibitor design // *Molecules*. MDPI AG, 2021. Vol. 26, № 4.
22. Koutsakos M. et al. Knowns and unknowns of influenza B viruses // *Future Microbiology*. Future Medicine Ltd., 2016. Vol. 11, № 1. P. 119–135.
23. Wolff T., Veit M. Influenza B, C and D Viruses (Orthomyxoviridae) // *Encyclopedia of Virology: Volume 1-5, Fourth Edition*. Elsevier, 2020. Vol. 1–5. P. 561–574.
24. Gamblin S.J., Skehel J.J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins // *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 2010. Vol. 285, № 37. P. 28403–28409.
25. de Vries R.D., Herfst S., Richard M. Avian influenza A virus pandemic preparedness and vaccine development // *Vaccines*. MDPI AG, 2018. Vol. 6, № 3.
26. Lu R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding // *The Lancet*. Lancet Publishing Group, 2020. Vol. 395, № 10224. P. 565–574.
27. Naqvi A.A.T. et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 2020. Vol. 1866, № 10.
28. Yuan Y. et al. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains // *Nat Commun*. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 8.

29. Zakeri A. et al. Ischemic stroke in COVID-19-positive patients: An overview of SARS-CoV-2 and thrombotic mechanisms for the neurointerventionalist // *J Neurointerv Surg*. BMJ Publishing Group, 2021. Vol. 13, № 3. P. 202–206.
30. Vlasova A.N. et al. Novel Canine Coronavirus Isolated from a Hospitalized Pneumonia Patient, East Malaysia. 2021.
31. Feng D. et al. The SARS epidemic in mainland China: Bringing together all epidemiological data // *Tropical Medicine and International Health*. 2009. Vol. 14, № SUPPL. 1. P. 4–13.
32. Peiris J.S.M. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome // *Lancet*. Elsevier Limited, 2003. Vol. 361, № 9366. P. 1319–1325.
33. Zhao G.P. SARS molecular epidemiology: A Chinese fairy tale of controlling an emerging zoonotic disease in the genomics era // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, 2007. Vol. 362, № 1482. P. 1063–1081.
34. Ge X.Y. et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor // *Nature*. 2013. Vol. 503, № 7477. P. 535–538.
35. Petersen E. et al. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics // *The Lancet Infectious Diseases*. Lancet Publishing Group, 2020. Vol. 20, № 9. P. e238–e244.
36. Kim K.H. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) outbreak in South Korea, 2015: epidemiology, characteristics and public health implications // *Journal of Hospital Infection*. W.B. Saunders Ltd, 2017. Vol. 95, № 2. P. 207–213.
37. Wang Q. et al. Bat origins of MERS-CoV supported by bat Coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26 // *Cell Host Microbe*. Cell Press, 2014. Vol. 16, № 3. P. 328–337.
38. Nyberg T. et al. Comparative analysis of the risks of hospitalisation and death associated with SARS-CoV-2 omicron (B.1.1.529) and delta (B.1.617.2) variants in England: a cohort study // *The Lancet*. Elsevier B.V., 2022. Vol. 399, № 10332. P. 1303–1312.
39. Meo S.A.; M.A.S.; K.D.C. Omicron new variant BA.2.86 (Pirola): Epidemiological, biological, and clinical characteristics – global data based analysis. 2023.
40. Parums D. V. Editorial: A Rapid Global Increase in COVID-19 is Due to the Emergence of the EG.5 (Eris) Subvariant of Omicron SARS-CoV-2 // *Medical Science Monitor*. International Scientific Information, Inc., 2023. Vol. 29.
41. Smith W. CULTIVATION OF THE VIRUS OF INFLUENZA. 1935.
42. Stokes J. et al. RESULTS OF IMMUNIZATION BY MEANS OF ACTIVE VIRUS OF HUMAN INFLUENZA'. 1936.
43. Plotkin S.A. History of Vaccine Development. 2011.

44. Salk, J.E. et al. IMMUNIZATION AGAINST INFLUENZA WITH OBSERVATIONS DURING AN EPIDEMIC OF INFLUENZA A ONE YEAR AFTER VACCINATION 1-2 В Y. 1945.
45. Ильичёва Т.Н.; Н.С.В.; Г.В.Н.; Вирусы гриппа. Методы. . ИПЦ НГУ, 2019.
46. Jin H., Subbarao K. Live Attenuated Influenza Vaccine. 2014. P. 181–204.
47. Keshavarz M. et al. Influenza vaccine: Where are we and where do we go? // Reviews in Medical Virology. John Wiley and Sons Ltd, 2019. Vol. 29, № 1.
48. Du L., Zhou Y., Jiang S. Research and development of universal influenza vaccines // Microbes and Infection. 2010. Vol. 12, № 4. P. 280–286.
49. Widjaja L. et al. Molecular changes associated with adaptation of human influenza A virus in embryonated chicken eggs // Virology. 2006. Vol. 350, № 1. P. 137–145.
50. Manini I. et al. Egg-independent influenza vaccines and vaccine candidates // Vaccines. MDPI AG, 2017. Vol. 5, № 3.
51. Skowronski D.M. et al. Low 2012-13 influenza vaccine effectiveness associated with mutation in the egg-adapted H3N2 vaccine strain not antigenic drift in circulating viruses // PLoS One. Public Library of Science, 2014. Vol. 9, № 3.
52. Tree J.A. et al. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains // Vaccine. 2001. Vol. 19. 3444–3450 p.
53. Low J.G.H. et al. Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine: Results from a double-blinded, randomized Phase I clinical trial in healthy Asian volunteers // Vaccine. Elsevier Ltd, 2014. Vol. 32, № 39. P. 5041–5048.
54. de Vries R.D., Rimmelzwaan G.F. Viral vector-based influenza vaccines // Human Vaccines and Immunotherapeutics. Taylor and Francis Inc., 2016. Vol. 12, № 11. P. 2881–2901.
55. Soboleski M.R. et al. Cold-Adapted influenza and recombinant adenovirus vaccines induce Cross-Protective immunity against PH1N1 challenge in mice // PLoS One. 2011. Vol. 6, № 7.
56. Kozlovskaya L.I. et al. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies // Emerg Microbes Infect. Taylor and Francis Ltd., 2021. Vol. 10, № 1. P. 1790–1806.
57. Wang H. et al. Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2 // Cell. Cell Press, 2020. Vol. 182, № 3. P. 713-721.e9.
58. Gao Q. et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2 // Science (1979). American Association for the Advancement of Science, 2020. Vol. 369, № 6499. P. 77–81.
59. Ella R. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: a double-blind, randomised, phase 1 trial // Lancet Infect Dis. Lancet Publishing Group, 2021. Vol. 21, № 5. P. 637–646.

60. Guebre-Xabier M. et al. NVX-CoV2373 vaccine protects cynomolgus macaque upper and lower airways against SARS-CoV-2 challenge // *Vaccine*. Elsevier Ltd, 2020. Vol. 38, № 50. P. 7892–7896.
61. Ryzhikov A.B. et al. A single blind, placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the “EpiVacCorona” vaccine for the prevention of COVID-19, in volunteers aged 18–60 years (Phase I–II) // *Russian Journal of Infection and Immunity*. Saint Petersburg Pasteur Institute, 2021. Vol. 11, № 1. P. 283–296.
62. Logunov D.Y. et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia // *The Lancet*. Lancet Publishing Group, 2020. Vol. 396, № 10255. P. 887–897.
63. Lambe T. et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques Neeltje van Doremalen. 2020.
64. Mercado N.B. et al. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques // *Nature*. Nature Research, 2020. Vol. 586, № 7830. P. 583–588.
65. Dey A. et al. Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models // *Vaccine*. Elsevier Ltd, 2021. Vol. 39, № 30. P. 4108–4116.
66. Gobbi F. et al. Antibody response to the bnt162b2 mrna covid-19 vaccine in subjects with prior sars-cov-2 infection // *Viruses*. MDPI AG, 2021. Vol. 13, № 3.
67. Xia X. Detailed dissection and critical evaluation of the pfizer/biontech and moderna mrna vaccines // *Vaccines (Basel)*. MDPI, 2021. Vol. 9, № 7.
68. Bruxvoort K.J. et al. Real-world effectiveness of the mRNA-1273 vaccine against COVID-19: Interim results from a prospective observational cohort study // *The Lancet Regional Health - Americas*. 2022. Vol. 6. P. 100134.
69. Jamshidi E. et al. Longevity of immunity following COVID-19 vaccination: a comprehensive review of the currently approved vaccines // *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Taylor and Francis Ltd., 2022. Vol. 18, № 5.
70. Fiolet T. et al. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review // *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V., 2022. Vol. 28, № 2. P. 202–221.
71. Malone R.W., Felgner P.L., Verma I.M. Cationic liposome-mediated RNA transfection [cationic lipid vesicles/N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-NNN-trimethylammonium chloride (DOTMA)] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. Vol. 86. 6077–6081 p.
72. Wolff J.A. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo // *Science*. 1990. Vol. 247, № 4949 Pt 1. P. 1465—1468.

73. Karikó K. et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability // *Molecular Therapy*. 2008. Vol. 16, № 11. P. 1833–1840.
74. Kumar A., Meldgaard T.S., Bertholet S. Novel platforms for the development of a universal influenza vaccine // *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 2018. Vol. 9, № MAR.
75. Feldman R.A. et al. mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials // *Vaccine*. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 37, № 25. P. 3326–3334.
76. Damase T.R. et al. The Limitless Future of RNA Therapeutics // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A., 2021. Vol. 9.
77. Jia L., Qian S.B. Therapeutic mRNA Engineering from Head to Tail // *Acc Chem Res*. American Chemical Society, 2021. Vol. 54, № 23. P. 4272–4282.
78. Züst R. et al. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5 // *Nat Immunol*. 2011. Vol. 12, № 2. P. 137–143.
79. Devarkar S.C. et al. Structural basis for m7G recognition and 2'-O-methyl discrimination in capped RNAs by the innate immune receptor RIG-I // *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences, 2016. Vol. 113, № 3. P. 596–601.
80. Galloway A., Cowling V.H. mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate // *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V., 2019. Vol. 1862, № 3. P. 270–279.
81. Stepinski J. et al. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel “anti-reverse” cap analogs 7-methyl(39-O-methyl)GpppG and 7-methyl(39-deoxy)GpppG. 2001.
82. Mockey M. et al. mRNA transfection of dendritic cells: Synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level // *Biochem Biophys Res Commun*. Academic Press, 2006. Vol. 340, № 4. P. 1062–1068.
83. Vaidyanathan S. et al. Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification // *Mol Ther Nucleic Acids*. Cell Press, 2018. Vol. 12. P. 530–542.
84. Leppek K., Das R., Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 19, № 3. P. 158–174.
85. Jia L. et al. Decoding mRNA translatability and stability from the 5' UTR // *Nat Struct Mol Biol*. Nature Research, 2020. Vol. 27, № 9. P. 814–821.

86. Lee A.S.Y., Kranzusch P.J., Cate J.H.D. EIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression // *Nature*. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 522, № 7554. P. 111–114.
87. Yang Y., Wang Z. IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome // *Journal of Molecular Cell Biology*. Oxford University Press, 2019. Vol. 11, № 10. P. 911–919.
88. Hinnebusch A.G., Ivanov I.P., Sonenberg N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs // *Science*. American Association for the Advancement of Science, 2016. Vol. 352, № 6292. P. 1413–1416.
89. Karikó K., Kuo A., Barnathan E.S. Overexpression of urokinase receptor in mammalian cells following administration of the in vitro transcribed encoding mRNA // *Gene Therapy*. 1999. Vol. 6. 1092–1100 p.
90. Trainor B, Shcherbik N. Short and Sweet: Viral 5`-UTR as a Canonical and Non-Canonical Translation Initiation Switch // *J Cell Immunol*. Scientific Archives LLC, 2021. Vol. 3, № 5.
91. Fujimoto Y. et al. Short 5' Untranslated Region Enables Optimal Translation of Plant Virus Tricistronic RNA via Leaky Scanning // *J Virol*. American Society for Microbiology, 2022. Vol. 96, № 7.
92. Li L., Wang C.C. Capped mRNA with a Single Nucleotide Leader Is Optimally Translated in a Primitive Eukaryote, *Giardia lamblia* // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, № 15. P. 14656–14664.
93. Mordstein C. et al. Codon Usage and Splicing Jointly Influence mRNA Localization // *Cell Syst*. Cell Press, 2020. Vol. 10, № 4. P. 351-362.e8.
94. Hia F. et al. Codon bias confers stability to human mRNA s // *EMBO Rep*. EMBO, 2019. Vol. 20, № 11.
95. A Van Gulck E.R. et al. Efficient stimulation of HIV-1-specific T cells using dendritic cells electroporated with mRNA encoding autologous HIV-1 Gag and Env proteins. 2006. Vol. 107. P. 1818–1827.
96. Thess A. et al. Sequence-engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals // *Molecular Therapy*. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 23, № 9. P. 1456–1464.
97. Mauger D.M. et al. mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life // *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences, 2019. Vol. 116, № 48. P. 24075–24083.

98. Bonehill A. et al. Messenger RNA-Electroporated Dendritic Cells Presenting MAGE-A3 Simultaneously in HLA Class I and Class II Molecules // *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 2004. Vol. 172, № 11. P. 6649–6657.
99. Karikó K. et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA // *Immunity*. 2005. Vol. 23, № 2. P. 165–175.
100. Boo S.H., Kim Y.K. The emerging role of RNA modifications in the regulation of mRNA stability // *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature, 2020. Vol. 52, № 3. P. 400–408.
101. Durbin A.F. et al. RNAs containing modified nucleotides fail to trigger RIG-I conformational changes for innate immune signaling // *mBio*. American Society for Microbiology, 2016. Vol. 7, № 5.
102. DAVIS F.F., ALLEN F.W. Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide // *J Biol Chem*. 1957. Vol. 227, № 2. P. 907–915.
103. Ge J., Yu Y.T. RNA pseudouridylation: New insights into an old modification // *Trends in Biochemical Sciences*. 2013. Vol. 38, № 4. P. 210–218.
104. Ma X., Zhao X., Yu Y.T. Pseudouridylation (Ψ) of U2 snRNA in *S.cerevisiae* is catalyzed by an RNA-independent mechanism // *EMBO Journal*. 2003. Vol. 22, № 8. P. 1889–1897.
105. Penzo M. et al. RNA pseudouridylation in physiology and medicine: For better and for worse // *Genes*. MDPI AG, 2017. Vol. 8, № 11.
106. Davis D.R. Stabilization of RNA stacking by pseudouridine // *Nucleic Acids Research*. 1995. Vol. 23, № 24. 5020–5026 p.
107. Schwartz S. et al. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA // *Cell*. Cell Press, 2014. Vol. 159, № 1. P. 148–162.
108. Wurm J.P. et al. Identification of the enzyme responsible for N1-methylation of pseudouridine 54 in archaeal tRNAs // *RNA*. 2012. Vol. 18, № 3. P. 412–420.
109. Chen T.H. et al. N 1-methyl-pseudouridine is incorporated with higher fidelity than pseudouridine in synthetic RNAs // *Sci Rep. Nature Research*, 2022. Vol. 12, № 1.
110. Mu X. et al. An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA // *Nucleic Acids Res*. Oxford University Press, 2018. Vol. 46, № 10. P. 5239–5249.
111. Nelson J. et al. HEALTHANDMEDICINE Impact of mRNA chemistry and manufacturing process on innate immune activation. 2020.
112. Diebold S.S. et al. Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides // *Eur J Immunol*. 2006. Vol. 36, № 12. P. 3256–3267.

113. Desrosiers R., Friderici K., Rottman F. Identification of Methylated Nucleosides in Messenger RNA from Novikoff Hepatoma Cells (RNA methylation/RNA processing/methylnucleoside composition). 1974. Vol. 71, № 10. 3971–3975 p.
114. Liu N., Pan T. N6-methyladenosine-encoded epitranscriptomics // Nature Structural and Molecular Biology. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 23, № 2. P. 98–102.
115. Jiang X. et al. The role of m6A modification in the biological functions and diseases // Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature, 2021. Vol. 6, № 1.
116. Motorin Y., Helm M. tRNA stabilization by modified nucleotides // Biochemistry. 2010. Vol. 49, № 24. P. 4934–4944.
117. Chen Y.S. et al. Dynamic transcriptomic m5C and its regulatory role in RNA processing // Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. John Wiley and Sons Inc, 2021. Vol. 12, № 4.
118. Tuorto F. et al. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis // Nat Struct Mol Biol. 2012. Vol. 19, № 9. P. 900–905.
119. Amort T. et al. Distinct 5-methylcytosine profiles in poly(A) RNA from mouse embryonic stem cells and brain // Genome Biol. BioMed Central Ltd., 2017. Vol. 18, № 1.
120. Wei Z. et al. Topological characterization of human and mouse m5C epitranscriptome revealed by bisulfite sequencing // Int J Genomics. Hindawi Limited, 2018. Vol. 2018.
121. Song H. et al. Biological roles of RNA m5C modification and its implications in Cancer immunotherapy // Biomarker Research. BioMed Central Ltd, 2022. Vol. 10, № 1.
122. Zhang H., Lee J.Y., Tian B. Biased alternative polyadenylation in human tissues. // Genome Biol. 2005. Vol. 6, № 12.
123. Ji Z., Tian B. Reprogramming of 3' Untranslated Regions of mRNAs by Alternative Polyadenylation in Generation of Pluripotent Stem Cells from Different Cell Types // PLoS One. 2009. Vol. 4, № 12.
124. Otsuka H. et al. Emerging evidence of translational control by AU-rich element-binding proteins // Frontiers in Genetics. Frontiers Media S.A., 2019. Vol. 10, № MAY.
125. Benteyn D. et al. Design of an optimized Wilms' tumor 1 (WT1) mRNA construct for enhanced WT1 expression and improved immunogenicity in vitro and in vivo // Mol Ther Nucleic Acids. Nature Publishing Group, 2013. Vol. 2, № NOV. P. e134.
126. Zhao W. et al. Massively parallel functional annotation of 3' untranslated regions // Nat Biotechnol. Nature Publishing Group, 2014. Vol. 32, № 4. P. 387–391.
127. Orlandini von Niessen A.G. et al. Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening // Molecular Therapy. Cell Press, 2019. Vol. 27, № 4. P. 824–836.

128. Jalkanen A.L., Coleman S.J., Wilusz J. Determinants and implications of mRNA poly(A) tail size - Does this protein make my tail look big? // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 2014. Vol. 34. P. 24–32.
129. Elango N. et al. Optimized transfection of mRNA transcribed from a d(A/T)100 tail-containing vector // *Biochem Biophys Res Commun*. Academic Press Inc., 2005. Vol. 330, № 3. P. 958–966.
130. Lima S.A. et al. Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes // *Nat Struct Mol Biol*. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 24, № 12. P. 1057–1063.
131. Lim J. et al. Mixed tailing by TENT4A and TENT4B shields mRNA from rapid deadenylation // *Science (1979)*. American Association for the Advancement of Science, 2018. Vol. 361, № 6403. P. 701–704.
132. Grier A.E. et al. pEVL: A Linear Plasmid for Generating mRNA IVT Templates With Extended Encoded Poly(A) Sequences // *Mol Ther Nucleic Acids*. Elsevier Inc, 2016. Vol. 5. P. e306.
133. Shirokikh N.E., Preiss T. Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions // *Wiley Interdiscip Rev RNA*. Blackwell Publishing Ltd, 2018. Vol. 9, № 4.
134. Dever T.E., Dinman J.D., Green R. Translation elongation and recoding in eukaryotes // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2018. Vol. 10, № 8.
135. Hellen C.U.T. Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2018. Vol. 10, № 10.
136. Ilyichev A, Orlova L, Sharabrin S. et al. mRNA technology as one of the promising platforms for the SARS-CoV-2 vaccine development // *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii (2020)* 24(7) 802-807.
137. Zhang Z. et al. Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA // *Immunity*. Cell Press, 2016. Vol. 45, № 4. P. 737–748.
138. Tanji H. et al. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA // *Nat Struct Mol Biol*. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 22, № 2. P. 109–116.
139. Hornung V. et al. RNA Recognition via TLR7 and TLR8. 2008. 71–86 p.
140. Designed Research; A S.H.P. Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. 2011. Vol. 108, № 52.
141. Hornung V. et al. 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. 2006. 994–997 p.
142. Kato H. et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5 // *Journal of Experimental Medicine*. 2008. Vol. 205, № 7. P. 1601–1610.

143. Pippig D.A. et al. The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37, № 6. P. 2014–2025.
144. Sabbah A. et al. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2 // *Nat Immunol.* 2009. Vol. 10, № 10. P. 1073–1080.
145. Hur S. Double-Stranded RNA Sensors and Modulators in Innate Immunity // *Annual Review of Immunology.* Annual Reviews Inc., 2019. Vol. 37. P. 349–375.
146. Pulit-Penalosa J.A., Scherbik S. V., Brinton M.A. Activation of Oas1a gene expression by type I IFN requires both STAT1 and STAT2 while only STAT2 is required for Oas1b activation // *Virology.* 2012. Vol. 425, № 2. P. 71–81.
147. Kumar P. et al. Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2014. Vol. 42, № 5. P. 3228–3245.
148. Yoneyama M. et al. Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity 1 The cellular protein retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) senses intracellular viral infection and triggers a signal for innate antiviral respon // *The Journal of Immunology.* 2005. Vol. 175. 2851–2858 p.
149. Mitoma H. et al. The DHX33 RNA Helicase Senses Cytosolic RNA and Activates the NLRP3 Inflammasome // *Immunity.* 2013. Vol. 39, № 1. P. 123–135.
150. Abbas Y.M. et al. Structure of human IFIT1 with capped RNA reveals adaptable mRNA binding and mechanisms for sensing N1 and N2 ribose 2'-O methylations // *Proc Natl Acad Sci U S A.* National Academy of Sciences, 2017. Vol. 114, № 11. P. E2106–E2115.
151. Kreamsner P.G. et al. Efficacy and safety of the CVnCoV SARS-CoV-2 mRNA vaccine candidate in ten countries in Europe and Latin America (HERALD): a randomised, observer-blinded, placebo-controlled, phase 2b/3 trial // *Lancet Infect Dis.* Elsevier Ltd, 2022. Vol. 22, № 3. P. 329–340.
152. Baden L.R. et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine // *New England Journal of Medicine.* Massachusetts Medical Society, 2021. Vol. 384, № 5. P. 403–416.
153. Baiersdörfer M. et al. A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA // *Mol Ther Nucleic Acids.* Cell Press, 2019. Vol. 15. P. 26–35.
154. Foster J.B. et al. Purification of mRNA Encoding Chimeric Antigen Receptor Is Critical for Generation of a Robust T-Cell Response // *Hum Gene Ther.* Mary Ann Liebert Inc., 2019. Vol. 30, № 2. P. 168–178.
155. Mu X. et al. An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2018. Vol. 46, № 10. P. 5239–5249.
156. Wu M.Z. et al. Synthesis of low immunogenicity RNA with high-temperature in vitro transcription. 2020.

157. Diken M. et al. Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation // *Gene Ther.* 2011. Vol. 18, № 7. P. 702–708.
158. Selmi A. et al. Uptake of synthetic naked RNA by skin-resident dendritic cells via macropinocytosis allows antigen expression and induction of T-cell responses in mice // *Cancer Immunology, Immunotherapy.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2016. Vol. 65, № 9. P. 1075–1083.
159. Stewart M.P., Langer R., Jensen K.F. Intracellular delivery by membrane disruption: Mechanisms, strategies, and concepts // *Chemical Reviews.* American Chemical Society, 2018. Vol. 118, № 16. P. 7409–7531.
160. Kreiter S. et al. Intranodal vaccination with naked antigen-encoding RNA elicits potent prophylactic and therapeutic antitumoral immunity // *Cancer Res.* 2010. Vol. 70, № 22. P. 9031–9040.
161. Nitika, Wei J., Hui A.M. The Delivery of mRNA Vaccines for Therapeutics // *Life.* MDPI, 2022. Vol. 12, № 8.
162. Ramachandran S., Satapathy S.R., Dutta T. Delivery Strategies for mRNA Vaccines // *Pharmaceutical Medicine.* Adis, 2022. Vol. 36, № 1. P. 11–20.
163. Buschmann M.D. et al. Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines. 2021.
164. Апарцин Е.К., Кнауэр Н.Ю. Методы доставки генетического материала в клетки и возможности их применения в генной терапии. *Гены и Клетки*, 2016.-N 2.-С.32-41.
165. Campillo-Davo D. et al. The ins and outs of messenger rna electroporation for physical gene delivery in immune cell-based therapy // *Pharmaceutics.* MDPI AG, 2021. Vol. 13, № 3.
166. Hou X. et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery // *Nature Reviews Materials.* Nature Research, 2021. Vol. 6, № 12. P. 1078–1094.
167. Kim M. et al. HEALTHANDMEDICINE Engineered ionizable lipid nanoparticles for targeted delivery of RNA therapeutics into different types of cells in the liver // *Sci. Adv.* 2021. Vol. 7.
168. Hassett K.J. et al. Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines // *Mol Ther Nucleic Acids.* Cell Press, 2019. Vol. 15. P. 1–11.
169. Novel Lipids and Lipid Nanoparticle Formulations for Delivery of Nucleic Acids – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://patents.google.com/patent/WO2017075531A1/en> (дата обращения: 01.10.2023).
170. Cheng X., Lee R.J. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery // *Adv Drug Deliv Rev.* Elsevier, 2016. Vol. 99. P. 129–137.
171. Arteta M.Y. et al. Successful reprogramming of cellular protein production through mRNA delivered by functionalized lipid nanoparticles // *Proc Natl Acad Sci U S A.* National Academy of Sciences, 2018. Vol. 115, № 15. P. E3351–E3360.

172. Tsilingiris D. et al. Potential implications of lipid nanoparticles in the pathogenesis of myocarditis associated with the use of mRNA vaccines against SARS-CoV-2 // *Metabol Open*. Elsevier BV, 2022. Vol. 13. P. 100159.
173. Wilczewska A.Z. et al. Nanoparticles as drug delivery systems // *Pharmacological Reports*. No longer published by Elsevier, 2012. Vol. 64, № 5. P. 1020–1037.
174. Eygeris Y. et al. Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery // *Acc Chem Res*. American Chemical Society, 2022. Vol. 55, № 1. P. 2–12.
175. Clinical trial A Phase III Clinical Study of a SARS-CoV-2 Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Vaccine Candidate Against COVID-19 in Population Aged 18 Years and Above - [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04847102> (дата обращения 01.10.2023).
176. Low J.G. et al. A phase I/II randomized, double-blinded, placebo-controlled trial of a self-amplifying Covid-19 mRNA vaccine // *NPJ Vaccines*. Nature Research, 2022. Vol. 7, № 1.
177. Xu K. et al. A novel mRNA vaccine, SYS6006, against SARS-CoV-2 // *Front Immunol*. Frontiers Media S.A., 2023. Vol. 13.
178. Han Y. et al. mRNA vaccines expressing homo-prototype/Omicron and hetero-chimeric RBD-dimers against SARS-CoV-2 // *Cell Research*. Springer Nature, 2022. Vol. 32, № 11. P. 1022–1025.
179. Wang Z. et al. Reducing cell intrinsic immunity to mRNA vaccine alters adaptive immune responses in mice // *Mol Ther Nucleic Acids*. Cell Press, 2023. Vol. 34.
180. Clinical trial A Study of mRNA-based Influenza and SARS-CoV-2 (COVID-19) Multi-component Vaccines in Healthy Adults – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05827926> (дата обращения: 01.10.2023).
181. Clinical trial A Study of mRNA-1010 Seasonal Influenza Vaccine in Healthy Adults – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04956575> (дата обращения: 01.10.2023).
182. Clinical trial A Study of mRNA-1020 and mRNA-1030 Seasonal Influenza Vaccines in Healthy Adults – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05333289> (дата обращения: 01.10.2023).
183. Clinical trial A Study to Evaluate the Safety, Tolerability, and Immunogenicity of a Modified RNA Vaccine Against Influenza - [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05052697> (дата обращения: 01.10.2023).
184. Freyn A.W. et al. Antigen modifications improve nucleoside-modified mRNA-based influenza virus vaccines in mice // *Mol Ther Methods Clin Dev*. Cell Press, 2021. Vol. 22. P. 84–95.

185. Meade P. et al. Antigenic Landscape Analysis of Individuals Vaccinated with a Universal Influenza Virus Vaccine Candidate Reveals Induction of Cross-Subtype Immunity // *J Virol*. American Society for Microbiology, 2023. Vol. 97, № 1.
186. Joe P.T. et al. Intranodal administration of mRNA encoding nucleoprotein provides cross-strain immunity against influenza in mice // *J Transl Med*. BioMed Central Ltd., 2019. Vol. 17, № 1.
187. Zhuang X. et al. MRNA vaccines encoding the HA protein of influenza A H1N1 virus delivered by cationic lipid nanoparticles induce protective immune responses in mice // *Vaccines* (Basel). MDPI AG, 2020. Vol. 8, № 1.
188. Kackos C.M. et al. Seasonal quadrivalent mRNA vaccine prevents and mitigates influenza infection // *NPJ Vaccines*. Nature Research, 2023. Vol. 8, № 1.
189. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). 1977. Vol. 74, № 12. 5463–5467 p.
190. Laemli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
191. Merkuleva I.A. et al. Comparative Immunogenicity of the Recombinant Receptor-Binding Domain of Protein S SARS-CoV-2 Obtained in Prokaryotic and Mammalian Expression Systems // *Vaccines* (Basel). MDPI, 2022. Vol. 10, № 1.
192. Gross F.L. et al. Measuring influenza neutralizing antibody responses to A(H3N2) viruses in human sera by microneutralization assays using MDCK-SIAT1 cells // *Journal of Visualized Experiments*. Journal of Visualized Experiments, 2017. Vol. 2017, № 129.
193. Рудометова Н.Б. и др.; Получение и характеристика псевдовирюсов SARS-CoV-2 // *Медицинский академический журнал*. 2022. Vol. 22, № 2. P. 249–253.
194. Yu J., Russell J.E. Structural and Functional Analysis of an mRNP Complex That Mediates the High Stability of Human β -Globin mRNA // *Mol Cell Biol*. Informa UK Limited, 2001. Vol. 21, № 17. P. 5879–5888.
195. Ferizi M. et al. Human cellular CYBA UTR sequences increase mRNA translation without affecting the half-life of recombinant RNA transcripts // *Sci Rep*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6.
196. Zuker M., Stiegler P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information // *Nucleic Acids Research*. 1981. Vol. 9.
197. Dvir S. et al. Deciphering the rules by which 5'-UTR sequences affect protein expression in yeast // *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences, 2013. Vol. 110, № 30.
198. Pelletier J., Sonenberg N. Insertion Mutagenesis to Increase Secondary Structure within the 5' Noncoding Region of a Eukaryotic mRNA Reduces Translational Efficiency // *Cell*. 1985. Vol. 40. 515–526 p.

199. Dousis A. et al. An engineered T7 RNA polymerase that produces mRNA free of immunostimulatory byproducts // *Nat Biotechnol. Nature Research*, 2023. Vol. 41, № 4. P. 560–568.
200. Gholamalipour Y., Karunanayake Mudiyansele A., Martin C.T. NAR breakthrough article 3 end additions by T7 RNA polymerase are RNA self-templated, distributive and diverse in character—RNA-Seq analyses // *Nucleic Acids Res. Oxford University Press*, 2018. Vol. 46, № 18. P. 9253–9263.
201. Portal M.M. et al. Human cells contain natural double-stranded RNAs with potential regulatory functions // *Nat Struct Mol Biol. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 22, № 1. P. 89–97.
202. Assessment report Common name: COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified) Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000 [Электронный ресурс]. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (дата обращения 01.11.2023).
203. Weissman D. et al. HPLC purification of in vitro transcribed long RNA // *Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.*, 2013. Vol. 969. P. 43–54.
204. Assessment report Common name: COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified) Procedure No. EMEA/H/C/005735/0000 [Электронный ресурс]. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (дата обращения 01.11.2023).
205. Dey A. et al. Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models // *Vaccine. Elsevier Ltd*, 2021. Vol. 39, № 30. P. 4108–4116.
206. Kwilas S. et al. Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net A Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) DNA Vaccine Delivered Using a Spring-powered Jet Injector Elicits a Potent Neutralizing Antibody Response in Rabbits and Nonhuman Primates // *Current Gene Therapy*. 2014. Vol. 14. 200–210 p.
207. Боргоякова М.Б. и др. Иммуногенные свойства ДНК-конструкции, кодирующей рецепторсвязывающий домен белка шипа SARS-CoV-2 // *Молекулярная биология*. – 2021. – Т. 55, № 6. – С. 987-998. – DOI 10.31857/S0026898421060045.
208. DiPiazza A.T. et al. COVID-19 vaccine mRNA-1273 elicits a protective immune profile in mice that is not associated with vaccine-enhanced disease upon SARS-CoV-2 challenge // *Immunity. Cell Press*, 2021. Vol. 54, № 8. P. 1869-1882.e6.
209. Ryzhikov A.B. et al. Immunogenicity and protectivity of the peptide vaccine against SARS-CoV-2 // *Vestn Ross Akad Med Nauk. Meditsina Publishers*, 2021. Vol. 76, № 1. P. 5–17.
210. Tukhvatulin A.I. et al. Immunogenicity and protectivity of intranasally delivered vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine Sputnik V in mice and non-human primates // *Emerg Microbes Infect. Taylor and Francis Ltd.*, 2022. Vol. 11, № 1. P. 2229–2247.