

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф.ГАМАЛЕИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Вахтинский Владимир Михайлович

КОЛЬЦЕВОЙ МРНК-ВЕКТОР КАК ОСНОВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ
ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН И СРЕДСТВ ПАССИВНОЙ ИММУНИЗАЦИИ

3.2.7 Иммунология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н., И.Л. Тутыхина

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 ИММУНОПРОФИЛАКТИКА, КАК ОДИН ИЗ ВАЖНЕЙШИХ МЕТОДОВ СОХРАНЕНИЯ ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ	12
1.1.1 ТРАДИЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К ВАКЦИНАЦИИ	13
1.1.2 ТРАДИЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К ПАССИВНОЙ ИММУНИЗАЦИИ.....	17
1.2 ВЕКТОРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИММУНОПРОФИЛАКТИКЕ	19
1.2.1 ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ	19
1.2.2 НЕВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ.....	24
1.3 ТИПЫ РНК-ВЕКТОРОВ	29
1.3.1 ЛИНЕЙНЫЕ КЭП-ЗАВИСИМЫЕ МРНК-ВЕКТОРЫ	29
1.3.2 САМОРЕПЛИЦИРУЮЩИЕСЯ МРНК-ВЕКТОРЫ	34
1.3.3 КОЛЬЦЕВЫЕ МРНК-ВЕКТОРЫ	36
2 ГЛАВА МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	52
2.1 МАТЕРИАЛЫ.....	52
2.1.1 ОБОРУДОВАНИЕ	52
2.1.2 КЛЕТОЧНЫЕ И БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КУЛЬТУРЫ, ВИРУСЫ	54
2.1.3 ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ	55
2.1.4 ГОТОВЫЕ КОММЕРЧЕСКИЕ НАБОРЫ.....	56
2.1.5 ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ.....	56
2.1.6 РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ, ТОКСИНЫ, АНТИТЕЛА	57
2.1.7 ДРУГИЕ РЕАКТИВЫ	58
2.1.8 РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ.....	58
2.1.9 ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ	59
2.1.10 ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ	60
2.2 МЕТОДЫ.....	61
2.2.1 ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ	61
2.2.2 ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ.....	63
2.2.3 СБОРКА ДНК-МАТРИЦ ДЛЯ СИНТЕЗА РНК	64
2.2.4 ТРАНСФОРМАЦИЯ КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК.....	64
2.2.5 СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЭНГЕРУ	64
2.2.6 ВЫДЕЖДЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК	64
2.2.7 ЛИНЕАРИЗАЦИЯ ДНК-МАТРИЦЫ	65
2.2.8 <i>IN VITRO</i> ТРАНСКРИПЦИЯ	65
2.2.9 УПАКОВКА МРНК В ЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ.....	66
2.2.10 ТРАНСФЕКЦИЯ АДГЕЗИОННЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ НЕК293	67
2.2.11 ИЗМЕРЕНИЕ ЛЮЦИФЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ <i>IN VITRO</i>	67
2.2.12 ИЗМЕРЕНИЕ ПРИЖИЗНЕННОЙ ЛЮЦИФЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ <i>IN VIVO</i>	68

2.2.13 ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА S-ГЛИКОПРОТЕИНА SARS-COV-2 <i>IN VITRO</i> МЕТОДОМ ИФА	68
2.2.14 ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИТЕЛА С4.2 <i>IN VITRO</i> МЕТОДОМ ИФА	69
2.2.15 ВВЕДЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ТОКСИНОВ ЛАБОРАТОРНЫМ ЖИВОТНЫМ	70
2.2.16 ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ИФА	70
2.2.17 ЗАРАЖЕНИЕ И МОНИТОРИНГ СОСТОЯНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ	71
2.2.18 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ SARS-COV-2 В ЛЕГКИХ ИММУНИЗИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ	72
2.2.19 ОЦЕНКА CD8 ⁺ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ МЕТОДОМ ELISPOT-АНАЛИЗА	73
2.2.20 СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ	75
3 ГЛАВА. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	76
3.1 ДИЗАЙН КОЛЬЦЕВЫХ МРНК-ВЕКТОРОВ	77
3.1.1 ПЛАЗМИДНЫЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ СИНТЕЗА КОЛЬЦЕВОЙ МРНК.....	82
3.1.2 ВЫБОР НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНОГО КОЛЬЦЕВОГО МРНК-ВЕКТОРА.....	83
3.1.3 СРАВНЕНИЕ КОЛЬЦЕВОГО И ЛИНЕЙНОГО МРНК-ВЕКТОРОВ <i>IN VITRO</i>	84
3.1.4 СРАВНЕНИЕ КОЛЬЦЕВОГО И ЛИНЕЙНОГО МРНК-ВЕКТОРОВ <i>IN VIVO</i>	86
3.1.5 СРАВНЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ЦЕЛЕВОГО АНТИГЕНА ПОСЛЕ ТРАНСФЕКЦИИ КОЛЬЦЕВЫМИ МРНК-ВЕКТОРАМИ.....	88
3.2 ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ И ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КОЛЬЦЕВОГО МРНК ВЕКТОРА, КОДИРУЮЩЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ S-ГЛИКОПРОТЕИНА ВИРУСА SARS-COV-2	89
3.3 ИЗУЧЕНИЕ КОЛЬЦЕВОГО МРНК-ВЕКТОРА КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА А.....	92
3.3.2 ВЫБОР АНТИГЕНА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ ГРИППА А И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ПРОДУКЦИИ В СОСТАВЕ МРНК ВЕКТОРОВ.....	93
3.3.2 СРАВНЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ ЦЕЛЕВОГО АНТИГЕНА, ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИНЕЙНОГО И КОЛЬЦЕВОГО МРНК-ВЕКТОРОВ.	96
3.3.3 ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КОЛЬЦЕВОГО МРНК ВЕКТОРА, КОДИРУЮЩЕГО КОНСЕРВАТИВНЫЕ АНТИГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА А.....	98
3.4 КОЛЬЦЕВЫЕ МРНК-ВЕКТОРЫ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АНТИТОКСИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ	99
3.4.1 ПАССИВНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ КОЛЬЦЕВЫМ МРНК-ВЕКТОРОМ, КОДИРУЮЩИМ ТЯЖЕЛОЦЕПОЧНОЕ АНТИТЕЛО, НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЕ БОТУЛОТОКСИН.....	100
3.4.2 ПАССИВНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ КОЛЬЦЕВЫМ МРНК-ВЕКТОРОМ, КОДИРУЮЩИМ НАНОАНТИТЕЛО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЕ ТОКСИН А <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	102
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115

ВЫВОДЫ.....	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	121

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее проработанности

В последние годы широкое распространение получили векторы на основе мРНК. Существует два типа мРНК векторов: линейные, кЭП-зависимые, и кольцевые, кЭП-независимые.

Вакцины на основе линейной мРНК показали свою высокую иммуногенность и протективную активность в период пандемии SARS-CoV-2 [198]. В то же время, сама по себе линейная мРНК быстро разрушается РНКазами. Для повышения стабильности линейных мРНК в их состав включают N1-метилпсевдоуридин. Однако последние данные говорят о наличии таких нежелательных эффектов, как смещение рамки считывания при включении его в состав линейных мРНК. Следствием этого является синтез целого пула аберрантных белков, включающих нормальную N-концевую часть целевого белка и неправильную C-концевую часть. Это приводит непредсказуемому возникновению иммунного ответа на эти белки. А при их перекрывании с нормальными белками может вызывать аутоиммунные реакции [203]. Также стоит отметить высокую стоимость синтетических аналогов кЭПА, что негативно сказывается на масштабировании данной технологии [200].

Кольцевые мРНК-векторы являются сравнительно новым классом, однако на их основе разрабатывается ряд кандидатных вакцин от гриппа, оспы обезьян, бешенства и лихорадки Зика [173, 305, 324, 336].

За счет своей структуры кольцевые мРНК-векторы не нуждаются в использовании N1-метилпсевдоуридина для повышения стабильности, что нивелирует описанные выше побочные эффекты. Существует целый ряд технологий получения кольцевых мРНК: химическая сшивка, ферментативное и рибозимное лигирование [308]. Последние две технологии обладают существенными преимуществами перед химической сшивкой, такими как высокая эффективность, отсутствие токсических компонентов и больший предельный

размер циклизуемой мРНК. Метод рибозимной циклизации оказывается более перспективным с точки зрения масштабируемости технологии, так как основан на спонтанной реакции, протекающей между молекулами мРНК без участия внешних ферментов [308, 315].

Кольцевые мРНК-векторы используют кэп-независимую трансляцию, что существенно снижает стоимость производства. Наиболее часто для трансляции целевого белка с кольцевой мРНК используются IRES-элементы (Internal Ribosome Entry Site – внутренний сайт посадки рибосомы). IRES-элемент представляет собой последовательность РНК служащую для привлечения рибосомы. Они были первоначально обнаружены у пикорнавирусов, однако позднее подобные элементы были найдены и у эукариотических организмов. Существует огромное количество природных IRES-элементов, однако большинство из них малоизучены [126, 224, 308, 312].

Еще одним преимуществом трансляции с помощью IRES-элементов является её функционирование в стрессовых условиях даже при подавлении классической кэп-зависимой трансляции [308, 323].

Наиболее широко в кольцевых мРНК- векторах используются вирусные IRES-элементы. Самыми распространенными являются IRES-элементы вируса Коксаки В3 (CVB3), вируса энцефаломиокардита (ECMV) и вируса паралича свёрчка (CrPV) [208, 224].

В настоящее время ведутся работы по модификации существующих векторов и поиску новых IRES. По последним данным IRES некоторых риновирусов превосходят вирус Коксаки по уровням продукции целевого белка [48].

Однако для правильного функционирования IRES-элементу необходимо поддерживать свою вторичную структуру. Для обеспечения правильной конформации IRES-элемента используются спейсерные последовательности, отделяющие его от интронов циклизации, имеющих собственную вторичную

структуру. В настоящее время нет единого подхода к выбору спейсерной последовательности [48, 315].

Цель:

Разработка нового кольцевого мРНК-вектора и изучение его в качестве основы для создания вакцин против респираторных вирусов и средств пассивной иммунизации.

Задачи:

1. Сконструировать панель кольцевых мРНК-векторов, содержащих различные IRES-элементы и спейсерные последовательности, и сравнить их по уровням продукции репортерного белка *in vitro*.
2. Сравнить кинетику продукции репортерного белка после введения линейного и кольцевого мРНК-векторов *in vitro* и *in vivo*.
3. Изучить иммуногенность и протективную активность S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2, кодируемого кольцевым мРНК вектором, на модели трансгенных мышей K18-hACE-2.
4. Оценить индукцию клеточного иммунного ответа против вирусных антигенов новым кольцевым мРНК вектором в сравнении с линейным.
5. Изучить протективную активность консервативных антигенов вируса гриппа А, кодируемых кольцевым мРНК-вектором на модели летальной инфекции.
6. Оценить возможность использования кольцевого мРНК вектора для специфической иммунотерапии на летальных моделях отравления бактериальными токсинами.

Научная новизна выполненной работы

Впервые был сконструирован и охарактеризован по уровням продукции люциферазы кольцевой мРНК вектор, содержащих IRES риновируса В6. Впервые изучена иммуногенность и протективная активность при введении нового кольцевого мРНК вектора, кодирующего S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2 на

модели трансгенных мышей ACE-2. Впервые оценена индукция клеточного иммунного ответа при введении кольцевых мРНК векторов, кодирующих консервативные антигены вируса гриппа А. Впервые оценена возможность использования кольцевого мРНК вектора для специфической антитоксической иммунотерапии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в расширении знаний в области применения различных IRES-элементов и спейсерных последовательностей при разработке кольцевых мРНК-векторов.

Практическая значимость работы заключается в создании нового вектора, показавшего себя эффективной основой для создания вакцин и средств специфической антитоксической иммунотерапии.

Внедрение полученных результатов в практику

Научная работа представляет собой законченный вид исследования, имеющий выраженную прикладную направленность. В рамках диссертационной работы были оптимизированы условия получения мРНК в ходе реакции *in vitro* транскрипции

Данный метод внедрен на уровне ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, что подтверждается соответствующим актом о внедрении результатов в практику.

Методология и методы исследования

Методологической основой исследования послужили современные подходы, теоретические и экспериментальные исследования по получению кольцевых и линейных мРНК-векторов. В работе использовались передовые молекулярно-биологические, иммунологические, биоинформатические, вирусологические

методы, а также методы работы с лабораторными животными и методы статистической обработки результатов.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается размером выборки и результатами статистической обработки результатов. Для обработки результатов использовались статистические методы, соответствующие поставленным задачам. При проверке гипотез минимальный уровень значимости составлял 5% ($p < 0,05$). Сравнение двух исследуемых групп между собой проводилось с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия между выживаемостью животных в экспериментальных группах оценивали с использованием логрангового метода Манта-Хейзен. Анализ и обсуждение полученных результатов проводились с учетом актуальных данных по данной тематике.

Положения, выносимые на защиту

1. Линейный и кольцевой мРНК-векторы обеспечивают различную кинетику люциферазной активности *in vitro* на клетках HEK293 и *in vivo* на мышах линии Balb/c, при этом ко вторым суткам уровни продукции репортерного белка выравниваются.
2. Кольцевой мРНК-вектор индуцирует сильный гуморальный и клеточный иммунные ответы и обеспечивает защиту лабораторных животных от гриппа типа А и коронавирусной инфекции Covid-19.
3. Кольцевой мРНК вектор может быть использован в качестве вектора для пассивной иммунизации против бактериальных токсинов.

Личный вклад автора

Автором были лично получены ДНК-матрицы для синтеза кольцевой мРНК, кодирующие последовательности люциферазы, S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2, консервативных антигенов вируса гриппа М2 и NP, тяжелоцепочечных

антител B11-Fc и C4.2-Fc. Также автором были получены ДНК-матрицы для синтеза линейной мРНК, кодирующей консервативные антигены вируса гриппа M2 и NP, тяжелоцепочечное антитело C4.2-Fc.

Автором проводились трансфекции клеточных линий мРНК-препаратами для изучения продукции целевых белков, а также введение изучаемых препаратов лабораторным животным. Также автор проводил отбор крови у лабораторных животных для дальнейшего исследования.

Секвенирование полученных конструкций проводилось в лаборатории анализа геномов.

Упаковка мРНК в липидные наночастицы проводилась совместно с лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов.

Заражение лабораторных животных вирусом SARS-CoV-2, оценка вирусной нагрузки и титров нейтрализующих антител проводилось сотрудниками лаборатории Государственной коллекции вирусов.

Изучение *in vivo* люциферазной активности и изучение протективной активности мРНК-векторов, несущих ген тяжелоцепочечного антитела C4.2-Fc, против токсина A *Clostridium difficile* проводилось совместно с лабораторией клеточной микробиологии.

Изучение протективной активности мРНК-векторов, несущих ген тяжелоцепочечного антитела B11-Fc, против летальной дозы ботулотоксина проводилось совместно с лабораторией иммунобиотехнологии.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 3 научные статьи в изданиях, рекомендованных ВАК и/или индексируемых в системах Web of Science, Scopus, 5 работ в сборниках международных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 162 страницах машинописного текста, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов,

заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений и список используемой литературы (338 источников, в том числе 2 отечественных и 336 иностранных публикаций). Работа содержит 7 таблиц и 20 рисунков.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации и результаты проведённого исследования соответствуют пунктам 3, 6 и 7 паспорта научной специальности 3.2.7. Иммунология.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ИММУНОПРОФИЛАКТИКА, КАК ОДИН ИЗ ВАЖНЕЙШИХ МЕТОДОВ СОХРАНЕНИЯ ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ

Человечество на протяжении всей своей истории сталкивалось с различными инфекционными заболеваниями. Согласно археологическим находкам вспышки оспы происходили еще в Древнем Египте около 1500 лет до нашей эры [66].

Первая задокументированная эпидемия относится ко II веку нашей эры, она известна также как «чума Антонина», хотя дальнейшие исследования показали, что эпидемия была вызвана вирусом оспы [66].

Одной из самых смертоносных эпидемий считается эпидемия чумы в средневековой Европе, унесшая жизни половины населения. Это эпидемия получила от современников название «Черная смерть». На протяжении средних веков эпидемии чумы происходили регулярно [66].

Среди эпидемий нового времени важно отметить пандемию испанского гриппа, бушевавшую в 1918-1920 годах. По некоторым оценкам количество летальных случаев достигает 100 миллионов [66].

В 2020 года началась пандемия, вызванная COVID-19. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), количество прямых летальных случаев, к настоящему моменту превышает 7,1 миллионов человек. При этом важно учитывать значительное количество незарегистрированных случаев заражения [319]. В это же время количество избыточной смертности, связанной с пандемией за период 2020-2023 год превысило 29,7 миллионов случаев [94].

Иммунопрофилактика является одним из основных методов борьбы с инфекционными заболеваниями. Подходы иммунопрофилактики можно разделить на индукцию собственного иммунного ответа в организме (вакцинацию) и введение готовых иммуноглобулинов (пассивную иммунизацию).

1.1.1 ТРАДИЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К ВАКЦИНАЦИИ

Вакцинация является наиболее широко распространенным подходом к предотвращению инфекционных заболеваний. В частности, согласно данным, собранным Shattock и др, за период с 1974 до 2024 года массовая вакцинация предотвратила более 151 миллиона летальных случаев без учета вирусов гриппа, вируса папилломы человека и COVID-19. При этом общее количество сохраненных лет жизни превысило 10 миллиардов [339]. В то же время по данным, приведенным журналом педиатрии и детского здоровья за период 2021 -2022 года вакцинация от COVID-19 предотвратила от 14,4 до 19,8 миллионов смертей [175].

В зависимости от механизма получения существует несколько типов вакцин:

- живые аттенуированные вакцины;
- инактивированные вакцины;
- субъединичные вакцины;
- рекомбинантные вакцины;
- векторные вакцины.

Перейдем к детальному рассмотрению отдельных типов вакцин.

Аттенуированные вакцины

История аттенуированных вакцина началась с работы Луи Пастера, который на примере холеры кур показал, что заражение аттенуированным патогеном способно обеспечивать защиту от летальной инфекции высоковирулентным штаммом [221].

В 1921 году путем многократных пассажей была создана аттенуированная вакцина против туберкулеза [37]. В 1937 году Theiler, М и др. разработал аттенуированную вакцину против желтой лихорадки [290]. В 1957 году Sabin и др. была разработана вакцина от полиомиелита [257]. В 1960 году был получен ослабленный вакцинный штамм вируса кори [77]. В 1966 году была разработана вакцина от паротита, а в 1969 от краснухи [36, 231]. В 2015 году были проведены клинические испытания аттенуированной вакцины против вируса Денге [104].

Аттенуированные вакцины имитируют полный цикл заражения, и вызывают сильный иммунный ответ, однако они являются реактогенными, а также способны вызывать заболевания у людей с ослабленным иммунитетом. Наконец существует риск реверсии вакцинных штаммов в патогенные [185, 222].

Для повышения безопасности первым шагом стало создание инактивированных вакцин.

Инактивированные вакцины

Инактивированные вакцины представляют собой культуру патогена, которая была подвергнута химической или термической обработке для инактивации вирулентных свойств.

Первой инактивированной вакциной стала вакцина против холеры свиней, разработанная в 1886 году Salmon, и др [263]. В 1896 году была разработана вакцина против брюшного тифа, содержащая инактивированные нагреванием микроорганизмы, а в 1897 году вакцина против чумы [105, 228]. На протяжении 20 века был создан ряд инактивированных вакцин от таких заболеваний, как коклюш, грипп, полиомиелит, бешенство и гепатит А [24, 87, 136, 262, 314].

В ходе пандемии COVID-19 был также одобрен ряд инактивированных вакцин: CoronaVac (компания Sinovac, Китай), BBIBP-CorV (компания Sinopharm, Китай) и Covaxin [8, 272].

Однако стоит отметить, что из-за инактивации целевого патогена существенно снижается иммуногенность таких вакцин, что требует введения адъювантов и может увеличивать реактогенность [116, 222].

Дальнейшим развитием инактивированных вакцин стали субъединичные.

Субъединичные вакцины

В основе субъединичных вакцин лежит один или несколько очищенных антигенов [222].

Первой субъединичной вакциной стал инактивированный и очищенный дифтерийный анатоксин, полученный в 1923 году Ramon, и др [244]. В 1945 году была получена полисахаридная вакцина против пневмококка [186]. В дальнейшем в данной вакцине был расширен спектр антигенов. Так в 2000 году была получена вакцина Превенар-7, в 2009 – Превенар-13, а в 2021 – Превенар-20, обеспечивающие защиту от 7, 13 и 20 штаммов *Streptococcus pneumoniae*, соответственно [32, 75, 141].

Во второй половине 20 века были также получены субъединичные вакцины против инфекций, вызванных менингококком, гемофильной палочкой и вирусом гепатита В [17, 79, 287].

Среди преимуществ субъединичных вакцин по сравнению с инактивированными и аттенуированными стоит отметить их высокую безопасность. Также субъединичные вакцины оказываются менее реактогенными в сравнении с инактивированными. К недостаткам данного типа вакцин стоит отнести сравнительно низкий иммунный ответ, что требует увеличения доз, использования адъювантов и многократного введения препарата [116, 222].

По мере развития генетических технологий широкое распространение получили рекомбинантные вакцины.

Рекомбинантные вакцины

Рекомбинантные вакцины также содержат отдельные антигены, однако в отличие от сплит-вакцин, целевые антигены получают в модифицированных клетках продуцентах, а не путем разрушения патогенов [222].

История рекомбинантных вакцин началась в 1984 году, когда McAleer и др. показали, что рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита Б, полученный в дрожжах обеспечивает защиту от заражения этим вирусом [192].

В 2006 году была одобрена вакцина против вируса папилломы человека – Гардасил. Стоит отметить, что при получении рекомбинантного белка L1 происходит его самосборка в виде вирусоподобных частиц, что имитирует для иммунитета природный вирус, но не вызывает заражения [304]. В 2015 году была одобрена вакцины против вируса ветряной оспы – Shingrix, в основе которой лежал рекомбинантный Е-белок оболочки вируса, полученный в культуре клеток СНО [154]. А в 2023 году был одобрен препарат Arexvy – вакцина против респираторно-синцитиального вируса, главным компонентом которой является рекомбинантный гликопротеин F вируса RSV [219].

Отдельно стоит отметить систему экспрессии в клетках насекомых с использованием бакуловирусов. История этой системы началась в 1983 году, когда Smith и др сконструировал первый рекомбинантный бакуловирус, экспрессирующий бета-интерферон [275]. В 1987 году на её основе разрабатывалась вакцина от вируса иммунодефицита человека [254]. В 2007 году на основе бакуловирусной системы экспрессии была одобрена вакцина [213]. А в 2013 – вакцина против гриппа Flublok Quadrivalent, и в 2021 – вакцина против вируса SARS-CoV-2 Nuvaxovid [71, 72, 328].

Преимуществами данного типа вакцин является их высокий уровень безопасности и низкая реактогенность, также стоит отметить относительную универсальность технологии производства. Среди недостатков можно выделить низкую иммуногенность, что делает необходимым использование адъювантов и многократных схем введения. Также стоит отметить низкий Т-клеточный ответ, индуцируемый этим видом вакцин [222].

Дальнейшим развитием генно-инженерных вакцин стали векторные технологии, которые будут рассмотрены подробнее в разделе 1.3.

1.1.2 ТРАДИЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К ПАССИВНОЙ ИММУНИЗАЦИИ

Использование иммунных сывороток

История пассивной иммунизации началась в 1890 году с опытов Behring, и др. Было показано, что введение интактным морским свинкам сывороток, полученных от переболевших дифтерией сородичей, обеспечивает защиту от заражения [28]. А в 1893 году было показано успешное применение этого подхода для человека [29]. В 1894 году Roux, и др, предложил использовать в лошадей в качестве продуцентов иммунных сывороток, а также разработал схемы иммунизации для получения гипериммунных сывороток [252]. В 1937 году было показано, что для некоторых заболеваний сыворотки кроликов оказывают более сильный терапевтический эффект в сравнении с лошадиными сыворотками [119].

Одним из главных недостатков данной технологии является развитие иммунного ответа против сывороточных белков животного, а также высокая реактогенность. Еще одним недостатком данной технологии является риск передачи заболеваний от животных при использовании сывороток зараженных животных [80].

Следующей ступенью развития технологий пассивной иммунизации стало использование сывороточных иммуноглобулинов.

Использование сывороточных иммуноглобулинов

В 1940-ых годах Cohn открыл фракционирование плазмы крови, при этом одна из фракций была обогащена иммуноглобулинами. Это открытие привело к появлению целого направления препаратов сывороточных иммуноглобулинов [54].

На основе этой технологии в 1957 году был получен противостолбнячный сывороточный концентрат [277]. А в 1971 году был одобрен к применению концентрат антирабических иммуноглобулинов [179]. В сравнении с введением сывороток животных эти препараты вызывали значительно меньшую реактогенность, а для достижения терапевтического эффекта требовалось введение меньшего объема препаратов. Однако использование очищенных

иммуноглобулинов сталкивается с рядом проблем: использование иммуноглобулинов животного происхождения вызывает побочные иммунные реакции из-за гетерологичного происхождения, а использование донорской крови для выделения иммуноглобулинов человека является дорогой и плохо масштабируемой технологией [82, 151, 325].

Альтернативным подходом является использование моноклональных антител.

Моноклональные антитела

В 1975 году Köhler и др. разработали гибридную технологию, которая позволила получать моноклональные клеточные линии, секретирующие строго одно антитело [144]. В 1987 году был одобрен первый препарат моноклональных антител против CD3 для предотвращения острого отторжения почечного трансплантата [97]. В 1988 году было получено первое гуманизированное антитело, которое не вызывало такого сильного иммунного ответа, как нативное антитело крысы [248]. В конце 1980-ых была разработана технология фагового дисплея, позволившая проводить отбор антител клонов *in vitro* [27, 193, 276]. В 2002 году был одобрен препарат Адалимуаб — человеческое моноклональное антитело, полученное методом фагового дисплея [313].

Параллельно с развитием технологий фагового дисплея в 1993 году были открыты тяжелоцепочечные антитела у верблюда. Их особенностью является то, что они состоят из димеров тяжелой цепи, что существенно упрощает отбор с помощью фагового дисплея [109]. Затем в 1994 году Muyltermans др. был получен первый фаговый дисплей наноантител на основе антител верблюдовых [204]. В 2018 году было одобрен препарат Каплацизумаб, в основе которого лежит гуманизированное наноантитело против фактора фон Виллебранда [268].

Технология рекомбинантных моноклональных антител позволила снизить реактогенность вводимых препаратов и нивелировала угрозу передачи заболеваний из донорской крови. Однако производство рекомбинантных антител

является дорогостоящим, а для достижения терапевтического эффекта часто требуется многократное введение препаратов, обладающих отличным от человека гликозилированием, что может вызвать иммунный ответ [125, 274, 292].

В последние два десятилетия широкое распространение получили препараты на основе векторных технологий.

1.2 ВЕКТОРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИММУНОПРОФИЛАКТИКЕ

Вектор представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит определенную генетическую информацию и может переносить её между клетками. Векторы можно разделить на вирусные и невирусные.

1.2.1 ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ

Применение вирусов в качестве векторов для доставки чужеродного генетического материала в клетки предполагает использование природных механизмов вируса. Это с одной стороны, позволяет решить проблему таргетности доставки за счёт тропизма вирусов, с другой стороны, требует сложных технологических процедур и несёт определенные риски.

Применение вирусов для доставки генетического материала началось с использования ретровирусов. Вслед за первыми ретровирусами, обнаруженными Baltimore и др., были идентифицированы другие ретровирусы, такие как вирус миелоцитоматоза MC29, вирус эритробластоэза AEV, вирус саркомы мышей Харви и Кирстен. Однако для разработки вакцин эти вирусы не применялись [26].

Для создания вакцин наиболее распространенными векторами являются векторы на основе аденовирусов, вируса осповакцины, вируса везикулярного стоматита и некоторые другие. В то время как для пассивной генетической иммунизации применяются преимущественно аденоассоциированные вирусы и аденовирусы.

Аденовирусные векторы

Аденовирусы – это безоболочечные вирусы, чей геном представлен двуцепочечной молекулой ДНК. Размер их генома варьируется от 26 до 45 тыс. пар нуклеотидов. Они были открыты в 1953 году Rowe и др [253].

В 1980-ые появились первые репликативно-дефектные аденовирусные векторы, в которых гены E1 области были заменены на целевые гены, а для культивирования таких вирусов используется специальная комплементарная клеточная линия HEK-293 [30, 95, 99, 302].

Первое успешное применение аденовирусов в качестве вакцинной платформы было проведено в 1990 Prevec L и др. Было показано, что введение аденовирусного вектора 5 серотипа, кодирующего ген гликопротеина G вируса бешенства индуцирует сильный гуморальный ответ и обеспечивает защиту мышей от летальной инфекции [234].

В 1998 году начались клинические испытания вакцины против вируса иммунодефицита человека на основе трех аденовирусных векторов. Однако результаты проведенных исследований показали отсутствие защиты, и испытания были закрыты [235].

Первой зарегистрированной в России вакциной на основе аденовирусного вектора стала вакцина от вируса Эбола [67]. А первым зарегистрированным в мире препаратом стал ZEBOV – тоже вакцина от вируса Эбола, разработанная компанией Johnson & Johnson [16].

Широкое распространение вакцины на основе аденовирусных векторов получили в ходе пандемии COVID-19 [34, 85, 177, 258].

Также стоит отметить использование аденовирусных векторов для пассивной иммунизации. В частности, Tutykhina и др была показана протективная активность

нейтрализующих антител против вируса гриппа в составе аденовирусного вектора [298].

Аденовирусные векторы, кодирующие антитела, показали свою эффективность и в лечении инфекций, вызванных *Mycoplasma hominis* [35].

В качестве вакцинной платформы аденовирусные векторы обладают рядом преимуществ: безопасность, широкий тропизм, индукция сильного гуморального и клеточного иммунного ответа, транзистентность экспрессии трансгена, сравнительно высокая пакующая емкость. Однако они обладают и рядом недостатков: высокая реактогенность, индукция противовекторного иммунного ответа, а также наличие предсуществующего ответа к ряду аденовирусных векторов. В то же время рассматривая аденовирусы в качестве платформы для пассивной иммунизации высокая иммуногенность является недостатком [18, 34, 149, 197, 271, 327].

Векторы на основе вируса осповакцины

Ещё одним векторов для разработки вакцин является вирус осповакцины, который является представителем семейства *Poxviridae*, и относится к оболочечным вирусам. Геном вируса осповакцины представлен двуцепочечной молекулой ДНК размером 190 тыс. пар нуклеотидов и содержит около 200 генов [202].

Важной особенностью вируса осповакцины является то, что весь репликативный цикл происходит в цитоплазме зараженной клетки, что нивелирует риск случайной интеграции вирус в геном клетки-хозяина.

Первые векторы на основе вируса осповакцины были сделаны в 1982 году [184, 217]. А в 1997 году была одобрена первая ветеринарная вакцина на основе вируса осповакцины [220, 303]. В 2020 году в Европейском союзе одобрена вакцина от лихорадки Эбола на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара [156].

К преимуществам векторов на основе вируса осповакцины можно отнести большую упаковочную емкость, достигающую 25 тыс. пар нуклеотидов, отсутствие риска интеграции вируса в геном и безопасность самого вектора. Наконец векторы на основе осповакцины индуцируют сильнейший иммунный ответ [309]. Основным недостатком данного вектора является широкая распространенность предсуществующего иммунного ответа в популяции из-за широкомасштабной вакцинации от оспы в XX веке. Также стоит отметить сложности внесения модификаций, возникающие из-за большого размера генома [309].

В настоящее время данные об использовании этого типа векторов для пассивной иммунизации в литературе отсутствуют.

Векторы на основе вируса везикулярного стоматита

Вирус везикулярного стоматита (VSV) — оболочечный вирус с одноцепочечным РНК-геном негативной полярности. Природным хозяином VSV является крупный рогатый скот, у которого он вызывает неопасное заболевание, напоминающее ящур, но не представляющее угрозы для человека. Геном VSV имеет размер около 11 т.п.н. и содержит пять генов.

Разработка векторов на основе этого вируса началась в 1995 году с работ Lawson и др. и Whelan и др., которые клонировали кДНК вируса везикулярного стоматита в плазмидную конструкцию и успешно показали дальнейшую репликацию этого вируса [157, 317]. В 1997 г. Schnell и др. создал первый репликативно компетентный рекомбинантный VSV, содержащий ген зеленого флюоресцентного белка GFP [266]. В 2001 году была показана успешная замена G-гликопротеина VSV на гликопротеин вируса Эбола, что положило начало созданию вакцин на основе VSV [318].

Дальнейшее развитие идеи химерных вирусных частиц привело к созданию целого ряда тест-систем, где вместо патогенных вирусов используются рекомбинантные частицы на основе VSV [39].

Векторы на основе VSV обладают целым рядом преимуществ: низкая серопревалентность в популяции, отсутствие риска интеграции в геном, высокая иммуногенность, возможность псевдотипирования, сравнительно высокая пакующая емкость (до 5 тыс. пар нуклеотидов) и наличие эффективной технологии производства [309].

Однако этот тип векторов обладает и рядом недостатков, в частности стоит отметить высокую реактогенность репликативно компетентного вируса, также для его хранения требуется холодовая цепь с температурой -70°C , что ограничивает широкое применение, и наконец при репликации существует риск случайных мутаций в трансгене [309].

В настоящее время единственным одобренным препаратом на основе вируса везикулярного стоматита является вакцина rVSV-ZEBOV против вируса Эболы [60, 67].

В ходе пандемии COVID-19 был разработан ряд кандидатных вакцин на основе VSV, которые проходят клинические испытания [200, 251, 321].

В настоящее время данная платформа также не нашла своего применения в области пассивной иммунизации.

Векторы на основе аденоассоциированных вирусов

Аденоассоциированные вирусы (ААВ), были открыты в 1965 году как примеси аденовирусных препаратов [19]. ААВ – небольшие безоболочечные вирусы, их геном представлен одноцепочечной молекулой ДНК размером около 4,7 тыс. пар нуклеотидов, фланкированной концевыми инвертированными повторами. Геном содержит два гена *rep* и *cap* [306].

История векторов на основе ААВ начинается с работы Samulski и др, получивших плазмиду, содержащую полный геном, из которого при трансфекции

образовывались вирусные частицы [264]. В 1984 году был получен первый рекомбинантный ААВ-вектор, кодирующий ген устойчивости к неомицину [115].

Среди преимуществ данного типа векторов стоит отметить их неинфекционность, долговременную экспрессию трансгена, широкий спектр тропизмов и низкую иммуногенность, что делает их перспективным инструментом для генной терапии. Среди недостатков стоит отметить риск инсерционного онкогенеза [41, 61, 236]. В то же время эта низкая иммуногенность и колоссальная стоимость производства ограничивает их применение в качестве платформы для создания вакцин [236, 306].

В то же время есть ряд работ, где ААВ, кодирующие антитела, используются для пассивной иммунизации. В частности, была показана защита мышей от летальной инфекции эболавирусом, а также от интоксикации токсинами *C. Difficile* и ботулотоксином [64, 103, 166 255].

В качестве альтернативы вирусным векторам существуют невирусные векторы.

1.2.2 НЕВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ

По используемым нуклеиновым кислотам невирусные векторы разделяются на ДНК-векторы и РНК-векторы. История невирусной доставки генетического материала началась в 1990 году с работы Wolf и др, в которой было показано, что введение неупакованной РНК и ДНК в мышечную ткань мыши вызывает экспрессию целевых генов. При этом этот эффект был значительно более слабо выражен для других тканей [320]. В 1993 г. Robinson и др. показали протективный эффект против вируса гриппа при внутримышечной иммунизации ДНК-вектором, кодирующим ген гемагглютинаина [92]. Эти эксперименты показали применимость прямого введения нуклеиновой кислоты, как альтернативу вирусной доставке, однако выявили низкую эффективность этого метода и его ограниченность клетками мышечной ткани.

Наиболее распространенным методом доставки нуклеиновых кислот в клетки *in vivo* является использование липидных наночастиц, однако это сопряжено с рядом особенностей.

Влияние липидных наночастиц на активацию иммунного ответа

Наиболее распространенная формуляция липидных наночастиц включает в себя четыре липидных компонента: ионизируемый липид, холестерин, фосфолипид и липид, связанный с полиэтиленгликолем (ПЭГ-липид). Именно благодаря ионизируемым липидам удалось достичь эффективной доставки целевой РНК: при нейтральном pH крови они не связываются с сывороточными белками, их активация происходит в эндосоме при снижении pH, что приводит к деградации липидной наночастицы и высвобождению РНК [55, 176].

Интересно, что недавние исследования показали адъювантные свойства липидных компонентов, которые при введении совместно с субъединичными вакцинами усиливали иммунный ответ [9, 176].

Схема активации врожденного иммунного ответа липидными наночастицами, содержащими РНК приведена на рисунке 1. В ряде работ было показано, что продукты метаболизма липидных компонентов или сами липидные компоненты активируют такие патоген-распознающие рецепторы, как TLR2, TLR4, NLRP3 или STING [178, 199, 289]. Было показано, что продукт окисления фосфолипида (фосфохолин) вызывает активацию врожденного иммунного ответа, хотя время данных о его окислении при соблюдении условий хранения нет [335]. Также активацию врожденного иммунного ответа могут вызывать продукты метаболизма ионизируемых липидов [43, 176, 215]. Наконец, стоит отметить опосредованные реакции: разрушение эндосомы само по себе активирует врожденный иммунный ответ через галектины, наконец содержимое эндосомы также может взаимодействовать с цитоплазматическими патоген-распознающими рецепторами [176, 212].

А. Потенциальные рецепторы, узнающие мРНК, её производные и загрязнения

Б. Потенциальные рецепторы, узнающие липидные наночастицы (ЛНЧ)

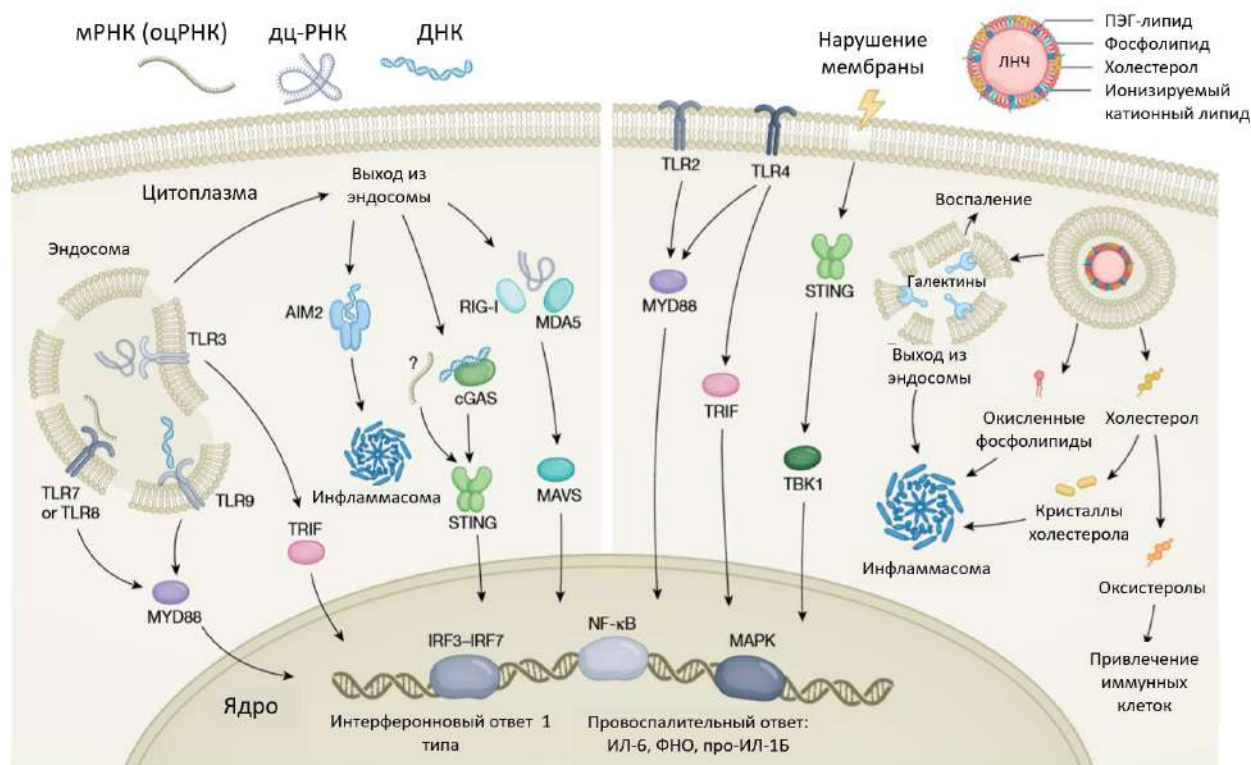


Рис. 1 – Схема активации врожденного иммунного ответа липидными наночастицами, содержащими РНК Адаптировано из [176].

Ещё одним компонентом липидных наночастиц является холестерол. Было показано, что высокие количества холестерина в клетке способствуют образованию инфламмосомы и выработке IL-1β [140]. Провоспалительный эффект оказывают и продукты окисления холестерина, в частности оксистеролы [57, 176]

Наконец было показано, что в крови многих людей есть антитела против ПЭг-липида, которые взаимодействуя с липидными наночастицами вызывают их разрушение через систему комплемента. Также происходит активация тучных клеток, что может привести к тяжелым аллергическим реакциям [10, 38, 89, 102, 130, 148, 286].

В настоящее время ведутся работы по дальнейшей оптимизации состава липидных наночастиц для обеспечения селективного проникновения в определенные типы клеток, а также снижение реактогенности [110, 135, 299].

Существуют также альтернативные варианты упаковки мРНК, в частности липоплексы и наночастицы на основе неорганических соединений

Липоплексы представляют собой альтернативный подход к упаковке РНК, не требующий микрофлюидной формуляции и задействующий меньший спектр липидов. Этот подход был успешно применен при разработке мРНК-препаратов против рака. Однако в его составе также присутствуют ионизированные липиды, и как следствие, этому подходу характерен схожий с платформой липидных наночастиц набор проблем [260, 331].

Совершенно иной механизм используется при доставке нуклеиновых кислот селеновыми наночастицами. На первом этапе происходит получение ядра, состоящего из электронейтрального селена и положительного покрытия, такого как хитозан или полилизин. Следующим этапом становится сорбция РНК и её покрытие снаружи еще одним заряженным слоем, таким как гиалуроновая кислота, альгинат или гепарин. При попадании в эндосому рН резко снижается и внешний полимер уже не связывается с РНК, происходит распаковка. Этот подход был успешно применен для лечения рака [49, 88, 122, 172, 329, 333].

Теперь перейдем к обобщению технологических и иммунологических особенностей характерных для линейных, самореплицирующихся и кольцевых мРНК-векторов.

Далее следует подробнее сравнить особенности ДНК- и РНК-векторов.

ДНК-векторы

Векторы на основе ДНК содержат в своем составе целевой ген, экспрессия которого управляется промотором. Также они содержат точку начала репликации и ген устойчивости к антибиотику для наработки плазмидной ДНК в бактериальных клетках. В последнее время ведутся работы по уменьшению «бактериальной части» ДНК-векторов или получению векторов, не содержащих её [307].

В конце 1990-ых проводились неудачные клинические испытания ДНК-вакцины против вируса иммунодефицита [183]. В 2021 году в Канаде была одобрена к применению ДНК-вакцина ZyCoV-D против COVID-19 [339]. Помимо одобренных препаратов в настоящее время ведутся клинические испытания ДНК-вакцины от папилломавируса [267]. Также ведутся клинические испытания ряда комбинированных противоопухолевых препаратов, кодирующих не только опухолевые антигены, но и различные цитокины [74, 128, 160].

Вакцины на основе ДНК обладают такими преимуществами, как безопасность, простота производства, низкая реактогенность, высокая пакующая емкость и транзистентность экспрессии. Главным же недостатком является низкая иммуногенность и невозможность проникнуть в ядра неделящихся клеток. Отдельные опасения вызывают векторные компоненты, необходимые для амплификации ДНК в бактериальных продуцентах. В то же время избавление от этих компонентов при производстве существенно усложняет и удорожает процесс [138].

Помимо ДНК-векторов существует целый ряд различных РНК-векторов, включающий в себя самореплицирующиеся РНК-векторы, линейные мРНК-векторы и кольцевые мРНК-векторы.

РНК-векторы

История РНК-векторов началась в 1961 году с открытия Brenner и др, который показал, что мРНК переносит информацию о нуклеотидной последовательности белка в рибосому [33]. В 1981 году Melton и др показал возможность синтеза мРНК *in vitro*, что открыло перспективы ее дальнейшего исследования [196].

По сравнению с ДНК-векторами векторам на основе РНК не требуется проникновение в ядро клетки для начала продукции целевого белка, что расширяет возможности их применения и сокращает время между введением препарата и

началом продукции целевого белка. РНК-векторы разделяют на самореплицирующиеся, линейные и кольцевые.

РНК-векторы, введенные в организм, попадают в различные клетки системы врожденного иммунитета и не иммунных клеток, таких как фибробласты и адипоциты [40, 112, 165].

Более того после внутримышечной инъекции макрофаги, моноциты и дендритные клетки могут поглощать липидные наночастицы и эффективно транслировать мРНК в лимфоузлах, что существенно усиливает иммунный ответ [40, 112, 165].

Castano et al. было показано, что дендритные клетки 2 типа, эффективно праймирующие CD4⁺ Т-лимфоциты также эффективно транслируют белок с мРНК-векторов. При этом фрагменты транслируемого белка демонстрируются через главный комплекс гистосовместимости [40].

В последние годы было проведено множество исследований по изучению иммунного ответа, вызываемого мРНК-векторами. Одной из их отличительных особенностей является образование высоких титров антител, в том числе нейтрализующих, в сравнении с другими платформами [158, 159, 176, 269, 296].

Прежде чем рассматривать индивидуальные реакции, происходящие при введении различных типов РНК-векторов, остановимся на общих аспектах.

1.3 ТИПЫ РНК-ВЕКТОРОВ

1.3.1 ЛИНЕЙНЫЕ КЭП-ЗАВИСИМЫЕ МРНК-ВЕКТОРЫ

Векторы на основе линейной мРНК включают в себя целевой ген, фланкированный 5' и 3' нетранслируемыми областями. На 5' конце вектора находится кэп-структура, а на 3' – полиадениновый хвост.

История использования РНК в качестве векторов началось в 1989 с работы Malone и др, который показал, что при введении мРНК, упакованной в липидные

наночастицы, клетки начинают транслировать закодированный белок [187]. В 1990 были проведены опыты Wolff и др, по использованию неупакованной мРНК [320]. А в 1993 была получена первая мРНК-вакцина от вируса гриппа, в основе которой лежали липидные наночастицы, содержащие мРНК-вектор, кодирующий ген белка NP вируса гриппа [191]. Однако полученная в ходе *in vitro* транскрипции мРНК была нестабильна в клетках, что тормозило широкое применение этой технологии. В 2005 году Karikó и др. показали, что использование N1-метилпсевдоуридина значительно повышает стабильность мРНК, а также снижает активацию врожденного иммунного ответа [133].

В 2017 году завершились первые клинические испытания мРНК-вакцины против инфекционного заболевания – бешенства. Интересно, что вакцина, разработанная компанией CureVac, подразумевала использование немодифицированных нуклеотидов, а также предполагала использование безыгольного инжектора для доставки неупакованной РНК в клетки. Однако из-за побочных эффектов и технологической сложности безыгольной доставки от дальнейшего применения отказались [11]. В 2017 году были также проведены клинические испытания вакцины против вирусов гриппа H10N8 and H7N9, в основе которой лежала мРНК, содержащая N1-метилпсевдоуридин и упакованная в липидные наночастицы [23]. Первыми одобренными к применению мРНК-препаратами стали вакцины от COVID-19 компаний Pfizer/BioNTech и Moderna [211, 232]. В настоящее время одобрена также мРНК-вакцина от респираторно-синцитиального вируса mRESVIA, а также противоопухолевая вакцина mRNA-4157 / V940 [127, 311].

Линейные мРНК-векторы показали свою применимость и для пассивной иммунизации. На их основе были сделаны препараты для борьбы с вирусными, бактериальными и опухолевыми заболеваниями, а также препараты от ядов [12, 44, 218, 256, 293,]. В целом, на сегодняшний день проводится более 550 клинических и доклинических исследований различных препаратов на основе мРНК [164].

Для понимания основных проблем данного подхода стоит рассмотреть и другие важные части линейных РНК-векторов: кэп и полиадениновый хвост. Выделяют несколько природных кэп-структур: кэп-0, кэп-1 и кэп-2. Все они присоединяются к первому нуклеотиду РНК-цепи с помощью связи 5'-5'. Кэп-0 представляет собой 7-метил-гуанозин, в кэп-1 структуре помимо присоединения 7-метил-гуанозина первый нуклеотид цепи РНК подвергается 2'-O-метилированию, в кэп-2 структуре помимо 7-метил-гуанозина и первый, и второй нуклеотиды цепи РНК подвергаются метилированию [59].

Впервые кэп-структура на 5' конце РНК была обнаружена Furuichi и др. в 1975 году [91]. В 1984 году Krieg, и др. впервые синтезировал кэпированную РНК *in vitro*. В качестве кэп-структуры он использовал инвертированный нуклеотид, состоящий из метил-гуанозина и гуанозина, соединенных между собой 5'-5' связью. Однако данный метод давал сравнительно низкие выходы функционально активной РНК [150]

Для повышения выходов целевой кэпированной РНК в 2001 году Stepinski и др. был разработан аналог кэп-структуры – ARCA (anti-reverse cap analog). В этой структуре 3' гидроксильная группа немодифицированного гуанозина была метилирована, что делало невозможным синтез цепи в «неправильном» направлении. Однако данный метод давал кэп-0 структуру, которая связана со сравнительно более низкой трансляционной активностью и более сильной активацией иммунного ответа [281].

Для решения этой проблемы было предложено использование ферментативных технологий кэпирования, в частности на основе вируса осповакцины. Однако этот подход является дорогостоящим и сложномасштабируемым [273].

Революция в методах кэпирования произошла в 2017 году, когда компания TriLink BioTechnologies представила свой аналог кэпа – CleanCap, который обеспечил практически 100% эффективность кэпирования, более того его

структура была аналогичной кэп-1 структуре. Однако стоит отметить высокую стоимость этого реагента, который составляет значительную часть от общей себестоимости линейных мРНК-векторов [194]. В настоящее время продолжают работы по поиску новых более сильных аналогов кэп-структур и альтернативных аналогов на основе других химических веществ, в частности комплексов меди [147, 188].

Ещё одной технологической сложностью является поддержание структуры поли-(А) хвоста в ДНК-матрицах для синтеза мРНК. Из-за его структуры в ходе культивирования штаммов-продуцентов происходят делеции, что снижает дальнейшую трансляционную активность мРНК.

Существуют различные подходы к решению этих проблем: использование ПЦР-амплификации матрицы для синтеза РНК, использование сегментированных поли-(А) структур и специализированных штаммов продуцентов, использование ферментативного полиаденилирования и, наконец, химических модификаций. Однако все эти методы обладают своими недостатками. ПЦР-амплификация поли-(А)-хвоста существенно удорожает процесс производства и усложняет масштабирование, более того при амплификации существует риск спонтанного мутагенеза целевого гена. Использование сегментированного поли(А)-хвоста также не обеспечивает 100% сохранности и требует оптимизаций условий культивирования. Использование ферментативного полиаденилирования, в свою очередь, оказывается сложно стандартизуемым процессом, что также негативно сказывается на масштабировании данной технологии [114, 195, 278, 295, 332].

К преимуществам линейных мРНК-векторов стоит отнести быстроту внесения модификаций, нулевой риск интеграции РНК в геном, высокую эффективность трансляции, универсальность, а также низкую иммуногенность самого вектора. К недостаткам стоит отнести высокую стоимость синтетических аналогов кэп-структур, сравнительно высокую токсичность липидных наночастиц, нестабильность ДНК-матриц-содержащих длинные поли-(А)-хвосты и

необходимость холодовой цепи при транспортировке. Также последние данные говорят о смещении рамки считывания при трансляции белка с мРНК, содержащей N1-метилпсевдоуридин, что может приводить к нежелательным побочным эффектам [46, 203, 285].

Отдельно стоит рассмотреть механизм активации врожденного иммунитета линейными мРНК-векторами.

Существует два основных типа рецепторов врожденного иммунитета: эндосомальные и цитоплазматические. Среди эндосомальных рецепторов РНК-векторы активируют TLR3, TLR7 и TLR8, а среди цитоплазматических RIG-1 и MDA-5. В разрезе мРНК-векторов также стоит отметить TLR9, который активируется CpG-мотивами в бактериальной ДНК, в данном случае остаточными количествами матрицы для синтеза РНК.

Активаторами TLR3 и MDA-5 являются длинные двуцепочечные участки РНК. В норме линейные мРНК не активируют этот рецептор. Однако в ходе *in vitro* транскрипции в реакции образуются побочные двуцепочечные продукты, которые вызывают активацию TLR3. Решением этой проблемы является очистка целевой РНК от побочных двуцепочечных продуктов [330].

Также важную роль в индукции иммунного ответа на линейные мРНК-векторы играют TLR7 и TLR8. Активатором TLR7 являются Г-У-богатые участки РНК, а активатором TLR8 – А-У-богатые. Линейная мРНК является сильным активатором TLR7 и TLR8. Для решения этой проблемы в составе мРНК уридин заменяют на N1-метилпсевдоуридин. В результате модифицированный нуклеотид не может попасть в активный центр фермента из-за стерического фактора, что защищает РНК от деградации [31, 123, 132, 316].

Ещё одним важным активатором врожденного иммунного ответа является RIG-1. Ранние исследования показали, что RIG-1 активируется за счет фосфатных групп на 5' конце молекулы РНК [229].

Однако позднее было показано, что к его активации приводят шпильки, при этом размер комплементарного участка может составлять менее 30 нуклеотидов, в то время как размер петли не влияет активацию [22]. Lee и др. показал, что при использовании фрагментов кольцевых шпилек генома вируса гриппа активация RIG-1 происходит и в отсутствие трифосфата [162].

Целевая линейная мРНК в составе препаратов имеет на 5' конце кэп-структуру и в норме не активирует RIG-1, однако примеси некэпированной РНК способны его активировать. В то же время было показано, что использование N1-метилпсевдоуридина снижает его активацию даже при отсутствии кэпа, хотя и не полностью [65, 118].

Также стоит рассмотреть активацию TLR9, которая может происходить при некачественной деградации ДНК-матрицы для синтеза и недостаточной очистке целевого продукта [310].

1.3.2 САМОРЕПЛИЦИРУЮЩИЕСЯ мРНК-ВЕКТОРЫ

Основой для создания самореплицирующихся РНК-векторов стали РНК-вирусы из семейства альфавирусов. В 1991 году Liljeström и другие создали вектор на основе вируса леса Симлики. Из целевого вектора удалили белки капсида, что не позволило получать полноценные вирусные частицы, а вирусный аппарат амплификации РНК оставили, что позволило размножать количество копий РНК в клетке. При этом для упаковки этих частиц использовался репликативно дефектный хелперный вирус [167]. По аналогичной схеме были созданы векторы на основе вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей (VEEV) и вируса Синдбис [62, 106].

Уже в 1995 году Zhou X и др. успешно применили вектор на основе вируса леса Симлики для создания вакцины против гриппа, эффективно защищавшей мышей от летальной инфекции [338]. Однако полноценное использование этих систем как самореплицирующихся РНК-векторов, не содержащих вирусные белки

началось в 2012 году с работы Geall и др. Они показали возможность успешного применения самореплицирующейся РНК, упакованной в липидные наночастицы для индукции иммунного ответа [93].

На сегодняшний день единственным одобренным к применению препаратом на основе самореплицирующейся РНК является вакцина от COVID-19 ARCT-154 [210].

Также в настоящее время ведутся клинические испытания вакцин на основе самореплицирующейся РНК против вируса бешенства и вируса гриппа [3, 247].

Также самореплицирующиеся РНК-векторы показали свою применимость при пассивной иммунизации. В частности, Erasmus и др. показал протективный эффект нейтрализующих антител против вируса Зика в составе самореплицирующегося РНК-вектора от летальной инфекции [78].

К преимуществам самореплицирующихся РНК-вакцин стоит отнести их эффективность при введении низких доз за счет репликации и возможность продукции белка как в делящихся, так и неделящихся клетках. Также стоит отметить отсутствие предсуществующего иммунитета к белкам этих вирусов в большинстве стран [63, 107, 152, 201].

Среди недостатков самореплицирующихся векторов стоит отметить высокую активацию врожденного иммунного ответа. Помимо общей для всех РНК-векторов проблемы активации TLR3 и MDA-5 побочными продуктами *in vitro* транскрипции самореплицирующаяся РНК при попадании в эндосому дополнительно активирует TLR7 и TLR8, а в ходе своей репликации является сильнейшим триггером рецепторов MDA-5 и RIG-1. Также стоит отметить, что введение в состав этой РНК N1-метилпсевдоуридина приводит к потере возможности амплификации, что сводит на нет преимущества этого типа векторов. Альтернативным подходом является модификация вирусной полимеразы или использование других модифицированных нуклеотидов [20, 181, 241].

Активация врожденного иммунного ответа в свою очередь, запускают продукцию интерферонов I и III типов, которые вызывают деградацию РНК, арест трансляции и привлечение иммунных клеток. С одной стороны, привлечение иммунных клеток играет роль адьюванта, положительно влияя на эффективность вакцинации. С другой стороны, чрезмерная активация врожденного иммунитета приводит к низким уровням продукции антигена, что оказывает негативное влияние на эффективность вакцинации [176, 246]. Для снижения нежелательной иммуногенности ряд исследователей предлагают ко-экспрессировать ингибиторы nF-kB пути [168].

К другим недостаткам стоит отнести большой размер вектора, что усложняет процессы инкапсуляции, невозможность использования модифицированных нуклеотидов для повышения стабильности, а также низкую точность вирусной полимеразы, что приводит к накоплению мутаций в целевом гене при репликации *in vivo*. Также стоит отметить, что при *in vitro* транскрипции требуется использование аналогов кЭПА, однако из-за введения значительно меньших доз препаратов самореплицирующейся РНК этот фактор не оказывает значительного влияния на себестоимость её производства [63, 107, 152, 201].

1.3.3 КОЛЬЦЕВЫЕ МРНК-ВЕКТОРЫ

Векторы на основе кольцевой мРНК представляют собой ковалентно замкнутые молекулы, единственным обязательным элементом является целевой ген, другие элементы вектора отличаются в зависимости от методов циклизации и трансляции. Эти аспекты будут подробнее рассмотрены в соответствующих разделах, посвященных кольцевым мРНК-векторам.

Впервые природные кольцевые РНК были обнаружены в 1976 году. В работе Sanger et. al. было описано 4 кольцевых РНК, выделенных из растений. Затем в 1979 году они были обнаружены и в культуре HeLa, и в ткани *Drosophila* [120, 265].

В 1995 Chen et. al показал возможность *in vitro* трансляции белка с кольцевых мРНК при наличии в них сайта посадки рибосомы. При этом также была показана невозможность использования классического кЭП-зависимого механизма трансляции. Эти открытия заложили основу для дальнейших исследований в области кольцевых мРНК [45].

В настоящее время нет одобренных к применению препаратов на основе кольцевой мРНК, однако ведется ряд клинических испытаний. Эти препараты охватывают не только вакцины против инфекционных и опухолевых заболеваний, но также терапию аутоиммунных и других заболеваний.

Среди вакцин на основе кольцевой мРНК стоит отметить препарат TI-0093, разработанный компанией Theroma, для лечения рака, вызванного папилломавирусной инфекцией. В качестве антигенов используются белки Е6 и Е7 папилломавируса человека 16 серотипа. Для удаления онкогенного потенциала этих белков в домены, отвечающие за взаимодействие с белком р53, были внесены мутации [284, 337].

В настоящее время завершены клинические испытания по изучению безопасности кольцевой мРНК-вакцины от вируса SARS-Cov-2. В данной вакцине используется не полноразмерный S-гликопротеин, а его рецептор-связывающий домен [14, 240].

Также на основе кольцевых мРНК был создан ряд терапевтических препаратов, например компания RegBio проводит клинические испытания препарата от диабета второго типа. В его основе лежит кольцевой мРНК-вектор, кодирующий аналог глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) [4].

Компанией Shanghai CirCodeBiomed был разработан препарат NM2002 для лечения ишемической болезни сердца. Ввиду значимости данного заболевания Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов присвоило статус ускоренной разработки (FDA Fast Track

Designation). В качестве терапевтического гена используется фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Важно также отметить, что компания разработала собственную проприетарную технологию получения кольцевого мРНК-вектора. Это говорит о высоком интересе фармацевтической отрасли к этой сфере и готовности к фундаментальным исследованиям в этой области [84].

В марте 2026 года компания Shanghai CirCodeBiomed подала заявку на проведение клинических испытаний ещё одного препарата на основе кольцевой мРНК NM2003. Препарат направлен на создание коллатеральных сосудов и улучшение кровообращения конечностей, однако более подробной информации в пресс-релизе компании представлено не было [53].

Осенью 2024 года в США были одобрены первые клинические испытания препарата RXRG001, кодирующего ген аквапорина-1, для лечения ксеростомии, вызванной радиотерапией. А в марте 2025 года компанией RiboX Therapeutics начались его клинические испытания [283].

Еще одним препаратом, разрабатываемым компанией RiboX Therapeutics, является препарат RXIM002, предназначенный для CAR-T терапии В-клеточных аутоиммунных заболеваний. В его основе лежит кольцевая мРНК, которая кодирует химерный CAR-T рецептор, нацеленный на CD19. В отличие от традиционного *ex vivo* подхода к CAR-T терапии этот препарат вводится пациенту внутривенно [259]. Ещё один препарат TI-0032, функционирующий по такому же принципу, но разработанный компанией Therorna, также проходит клинические испытания в настоящий момент [294].

Наряду с CAR-T терапией компанией Therorna разрабатывается альтернативный подход к лечению В-клеточных аутоиммунных заболеваний. В его основе лежит кольцевая мРНК, кодирующая биспецифическую молекулу, которая, связываясь с CD3 на поверхности Т-клетки и с CD19 на поверхности В-клетки, приводит к их сближению и уничтожению последней [291].

В последние годы появляются данные об использовании кольцевой мРНК для экспрессии антител или их фрагментов. Так Y. Liu и др. показали эффективную терапию метастазов HER-2-положительного рака груди у мышей при использовании кольцевого мРНК-вектора, кодирующего одноцепочечный переменный домен антитела к PD-L1 (scFv-PD-L1) [174].

Далее будут рассмотрены рецепторы врожденного иммунитета, с которыми взаимодействует кольцевая мРНК и технологические особенности платформы.

Как и для других типов РНК-векторов, побочные двуцепочечные продукты *in vitro* транскрипции способны активировать TLR3 [330].

В то же время благодаря своей замкнутой структуре кольцевые мРНК-векторы не активируют TLR7 и TLR8. Однако даже небольшие примеси линейных предшественников способны индуцировать их активацию. Аналогичная ситуация происходит с цитоплазматическим рецептором RIG-1: кольцевые векторы инертны по отношению к этому рецептору, в отличие от линейных предшественников. Эта особенность требует тщательной очистки и контроля качества препаратов [316].

Еще одним подходом для снижения активации врожденного иммунитета является использование модифицированных нуклеотидов. Однако для кольцевых мРНК-векторов применяют N⁶-метиладенозин, а не N1-метилпсевдоуридин [48, 50].

В то же время у пикорнавирусов были обнаружены вторичные структуры РНК, которые подавляли иммунный ответ. Например, у пикорнавирусов родов *Cardiovirus* и *Aphthovirus* с 5' стороны от IRES-элемента был выявлен длинный полицитозинный участок, размер которого варьируется в зависимости от вида и может достигать 400 нуклеотидов [117, 121, 224]. В ряде работ было показано, что его частичная или полная делеция существенно снижала инфекционность вируса у взрослых животных, но не у новорожденных, не затрагивая также *in vitro* инфекционность [70, 108, 111, 189, 190, 224, 249,]. Это говорит о наличии какой-то

важной функции в данном участке, ответственной не за саму репликацию вируса, а за его элиминацию иммунитетом. Более того было показано, что такие вирусы давали более сильный иммунный ответ, чем их дикие аналоги [216, 224]. Теоретически эти структуры могут быть использованы в качестве составных элементов кольцевых мРНК-векторов, однако на данный момент работы по этой теме отсутствуют.

Отдельно стоит рассмотреть технологические особенности получения кольцевых мРНК-векторов, и особенности трансляции.

Существует целый ряд подходов к получению кольцевых мРНК:

- химическое лигирование;
- ферментативное лигирование;
- интроны циклизации.

Химическое лигирование

Для химической сшивки РНК используются такие активирующие агенты, как цианогенбромид (BrCN) и 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC).

Этот метод имеет ряд недостатков. Например, из-за большого количества свободных гидроксильных групп образуется смесь побочных продуктов. Помимо целевой кольцевой молекулы мРНК, соединенной 5'-3' фосфодиэфирной связью продуктами являются кольцевые молекулы с 5'-2' связью. Другими нежелательными побочными продуктами являются димерные и олигомерные линейные молекулы мРНК, полученные при межмолекулярной сшивке двух и более молекул. Наконец по мере увеличения размера молекулы РНК падает эффективность циклизации. Отдельную опасность представляют остаточные количества токсичных активирующих агентов и продуктов реакции. Поэтому в настоящее время данный метод практически полностью вытеснен ферментативными и рибозимными методами циклизации мРНК [209, 308].

Ферментативное лигирование

В качестве альтернативного подхода применяют ферментативное лигирование с использованием РНК- и ДНК-лигаз. Среди недостатков данного подхода стоит отметить необходимость того, чтобы на 5' конце мРНК находилась монофосфатная группа, в то время как продукты *in vitro* транскрипции содержат на 5' конце трифосфат. Для получения целевой группы требуются дополнительные стадии дефосфорилирования и кинирования. Другим способом решения этой проблемы является добавление в среду нуклеотид монофосфатов. Также помимо циклизации РНК возможно получение димерных и олигомерных продуктов, как и при химическом лигировании. Наконец использование сплинтов также увеличивает себестоимость [227, 308].

Среди преимуществ данного метода можно указать отсутствие швов и «лишних» нуклеотидов, а также безопасность и значительно большую эффективность, в сравнении с химическим методом сшивки [308].

Интроны циклизации

В настоящее время известно два типа интронов циклизации: интроны 1 и 2 типов. Интроны первого типа были обнаружены у вирусов, бактерий, а также в рибосомальной и митохондриальной РНК эукариотов [113, 308].

Интроны первого типа представляют собой сложную структуру, состоящую из 10 доменов. Для своего функционирования интронам 1 типа необходим гуанозин трифосфат, а также ионы магния [205, 308, 315].

В природе происходит вырезание интронов и сшивка экзонов, при этом если поменять местами эти последовательности, то произойдет циклизация линейной молекулы голова к хвосту, или обратный сплайсинг [308].

В 1992 году Puttaraju and Been обнаружили, что интроны, участвующие в сплайсинге пре-тРНК^{лейцин} *Anabaena* PCC7120, подходят для *in vitro* циклизации

РНК [237]. А в 1994 году, Ford E. и Ares M применили интрон, полученный из гена тимидилатсинтазы (td) бактериофага T4 для циклизации РНК [86]. В 2018 году Wesselhoeft et. al. создали самосплайсирующийся *in vitro* кольцевой мРНК-вектор, в основе которого лежит интрон пре-тРНК^{лейцин} *Anabaena*. Также была показана успешная циклизация мРНК размером 5 тыс. оснований [315]. В качестве альтернативы в 2021 году Rausch et. al. была предложена модификация интронов из гена тимидилатсинтазы бактериофага T4 для повышения выходов реакции циклизации [245, 308].

Схожий, но несколько иной механизм действия имеют интроны 2 группы. Интроны 2 типа, представляют собой мобильные генетические элементы. Они не так распространены в природе, как интроны 1 типа, и встречаются преимущественно в геномах бактерий и органелл. Некоторые исследователи считают интроны 2 типа предшественниками ретротранспозонов и сплайсосомных интронов эукариот [155]. В отличие от интронов 1 типа в их структуре насчитывается всего 6 доменов [169, 239, 250].

Большинство интронов второй группы кодируют интрон-кодируемый белок (IER), расположенный в петле домена IV. Этот IER играет решающую роль в *in vivo* сплайсинге, стабилизируя вторичную структуру и повышая каталитическую активность интронов. В то же время, была показана способность интронов 2 типа к произвольному сплайсингу *in vitro* [155, 238, 308].

Ключевым отличием интронов второго типа является отсутствие необходимости в ГТФ для инициации реакции, а также образование связанных между собой интронов 5'-2', связью [308].

К преимуществам интрон-экзонного подхода циклизации можно отнести её автокаталитичность, что существенно упрощает технологию и снижает себестоимость. Также для данной технологии существенно увеличен предельный размер, который может успешно циклизоваться, в отличие от ферментативного лигирования и тем более химической сшивки. К недостаткам технологии стоит

отнести наличие «шва» – остаточного участка экзонов, которые могут быть потенциально иммуногенны [308, 315].

Chen et. al. показали, что значительную роль в иммуногенности играет организм происхождения интронов. В частности, при использовании интронов циклизации, полученных от гена тимидилатсинтазы (td) бактериофага Т4, была показана активация врожденного иммунного ответа. При этом эффект сохранялся независимо от того вводилась ли РНК, циклизованная с помощью интронов, РНК, содержащая интроны, но циклизованная ферментативно, или ДНК, с которой клетках транскрибировалась и процессировалась эта РНК внутри клетки. В то же время при использовании для циклизации интрона гена человека ZKSCAN1 или интрон *Drosophila laccase2* активации иммунного ответа не наблюдалось. Более того, было показано, что включение в состав одной молекулы РНК и интронов бактериофага Т4 и интронов гена человека ZKSCAN1 делает РНК неиммуногенной независимо от порядка расположения интронов в векторе [51].

Далее подробно будут рассмотрены подходы к трансляции целевых белков с кольцевых мРНК векторов

Трансляция белка с кольцевых мРНК-векторов

Кольцевые РНК в клетке не подвергаются ни кэпированию, ни полиаденилированию и для трансляции они используют кэп-независимые механизмы. К настоящему моменту достоверно известно о четырех способах трансляции белка с кольцевых мРНК [308]:

- трансляция по типу катящегося кольца;
- трансляция опосредованная N⁶-метиладенозином;
- искусственная кэп-зависимая трансляция;
- IRES-зависимая трансляция.

Рассмотрим подробнее каждый из них.

Трансляция по типу катящегося кольца

В 1998 г. Perriman и Ages показали, что кольцевые молекулы РНК могут транслироваться в *E. coli* [226]. Abe et al. показали, что при отсутствии стоп-кодонов бактериальная рибосома продолжает трансляцию. Позднее Fan et al. показали, что около 50% белков, транслируемых с эндогенных кольцевых мРНК, делают это по типу катящегося кольца [81]. В результате образуются длинные конкатемерные белки, состоящие из повторяющихся целевых белков. С одной стороны, пропускание стадии инициации существенно повышает трансляционную активность, с другой стороны, этот подход требует введения протеазных сайтов и дизайна нуклеотидной последовательности вектора, также существует риск неправильного фолдинга и агрегации целевого белка. Наконец, из-за наличия скрытых рамок считывания в кольцевых РНК использование трансляции по типу катящегося кольца может приводить к образованию нежелательных побочных продуктов [5, 6, 81, 308].

В настоящее время этот подход не нашел применения при разработке иммунологических препаратов.

Трансляция опосредованная N⁶-метиладенозином

Было показано, что метилированный аденозин в составе определенных мотивов, таких как RRACH (где R = Г или А; H = А, Ц или У), позволяет с высокой эффективностью транслировать белок с кольцевой РНК [124].

При этом трансляция, опосредованная N⁶-метиладенозином, присутствует в различных типах клеток. Более того, даже единичного метилированного сайта оказывается достаточно для начала трансляции [233, 322].

Включение метиладенозина в состав кольцевой мРНК также повышает её устойчивость к разрушению нуклеазами и снижает иммуногенность, что повышает продолжительность трансляции [48, 50].

Однако данный механизм остается недостаточно изученным и его использование в кольцевых мРНК-векторах ограничено. В отличие от добавления N6-метиладенозина для повышения стабильности и снижения иммуногенности [308].

Искусственная кэп-зависимая трансляция

Кэп-структура на 5' конце линейной мРНК играет одну из ключевых ролей в инициации трансляции, привлекая трансляционный комплекс через взаимодействие с факторами инициации трансляции. В тоже время для кэпирования требуется свободный конец молекулы мРНК, поэтому природные кольцевые мРНК не подвергаются кэпированию [308]. В то же время кэп не удастся включить в состав кольцевой РНК при транскрипции [142].

Для решения этой проблемы были созданы кэпированные разветвленные олигонуклеотиды, которые затем пришивались к РНК и циклизовались. Из преимуществ данной технологии стоит отметить более чем десятикратное увеличение трансляционной активности. В то же время данный метод является дорогостоящим и трудоемким, а использование многостадийного химического синтеза требует повышенного контроля качества препаратов на предмет токсичности [47, 308].

В качестве альтернативного подхода Fukuchi, et. al. предложил использовать гибридизацию кэпированных нуклеотидов с кольцевой РНК, кодирующей целевой белок. Это значительно упростило технологию производства таких векторов. В работе было показано значительное повышение трансляционной активности, однако была обнаружена существенная активация врожденного иммунного ответа, за счет образования двуцепочечной РНК при гибридизации. Также была показана невозможность комбинирования данного подхода с использованием IRES-элементов [90].

В настоящее время широкого применения в производстве иммунобиотехнологических препаратов этот подход не нашел.

IRES-зависимая трансляция

IRES – internal ribosome entry site представляет собой последовательность РНК, служащую для привлечения рибосомы по кэп-независимому механизму [7].

Вирусные IRES-элементы имеют сложную вторичную структуру, состоящую из шпилек и псевдоузлов различной длины [73, 161, 225, 280,].

Первоначально они были обнаружены у вирусов из семейства Picornaviridae., где они располагаются на 5` конце геномной РНК. Именно эти IRES-элементы являются наиболее изученными [126, 308].

Было также показано, что пикорнавирусы сохраняют свою активность даже при замене родного IRES-элемента на другой, принадлежащий этому же роду, что говорит о значительной универсальности IRES-элементов, как инструмента трансляции [224, 326].

Существует большое разнообразие вирусных IRES-элементов, помимо этого ведутся работы по поиску IRES-подобных элементов в клетках эукариотов [58, 139, 312].

По вторичной структуре и используемых механизмах трансляции IRES-элементы можно разделить на 4 группы [139, 323]:

- подобные IRES паралича сверчка CrPV;
- подобные IRES вируса гепатита С;
- подобные IRES вируса энцефаломиокардита;
- подобные IRES полиовируса.

Схематическое изображение вторичной структуры, а также трансляционных особенностей перечисленных групп приведено на рисунке 2.

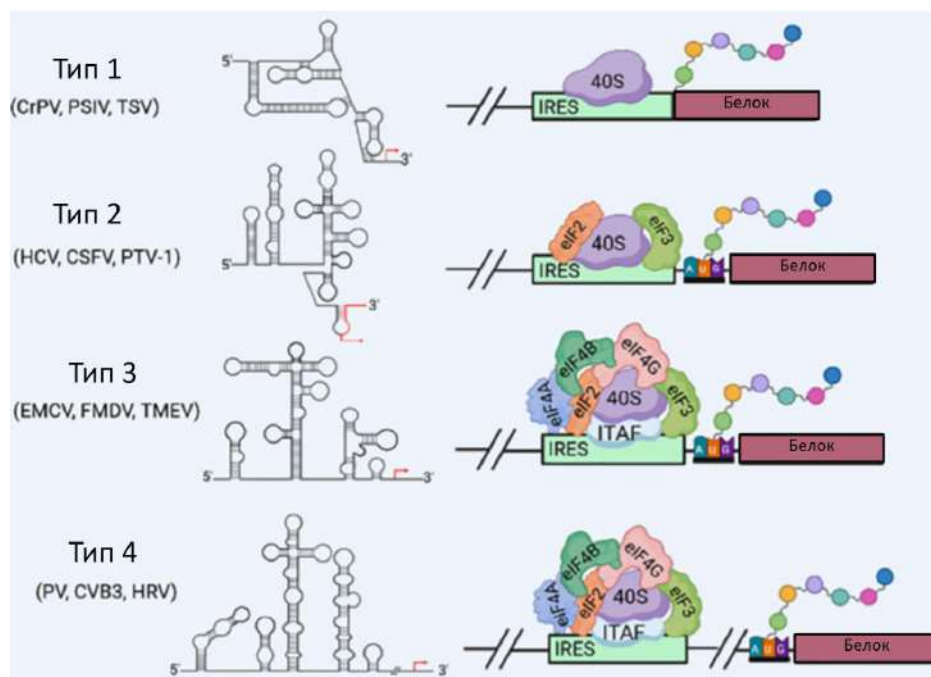


Рисунок. 2 – Схематическое изображение различных групп IRES-элементов, а также необходимых для трансляции факторов. Адаптировано из [308].

IRES-элементы подобные IRES-элементу вируса паралича сверчка CrPV

Помимо вируса паралича сверчка туда также относятся IRES-элементы кишечного вируса *Plautia stali* (PSIV) и вируса синдрома Таура (TSV). Этот тип IRES-элементов является наиболее компактным (около 200 нуклеотидов) [83, 100, 131, 137, 207].

Главной особенностью этой группы является способность взаимодействовать с 40S-субъединицей рибосомы напрямую, без участия других кофакторов. Однако стоит отметить, что этот тип IRES-элементов способен инициировать трансляцию не с АУГ-кодона, что может приводить к смещению рамки считывания и нежелательным побочным явлениям при их клиническом применении [308, 323].

IRES-элементы подобные IRES-элементу вируса гепатита С

Помимо вируса гепатита С (семейство *Flaviviridae*), эта группа включает представителей пикорнавирусов: вирус классической чумы свиней (CSFV), тешовирус свиней 1 (PTV-1) пикорнавирус обезьян (SPV). IRES-элементы этой группы способны взаимодействовать с 40S-субъединицей, однако для эффективной инициации им нужны такие эукариотические факторы инициации как eIF2 и eIF3 [230, 308, 323].

Этот тип IRES не нашел широкого применения, так как с одной стороны, требует факторов инициации трансляции и сравнительно больше вируса паралича сверчка, с другой стороны, обладает значительно меньшими уровнями трансляционной активности, чем IRES-элементы подобные полиовирусам [143].

IRES-элементы подобные IRES-элементу вируса энцефаломиокардита

Помимо EMCV эта группа включает также вирус ящура (FMDV) и вирус энцефаломиелита мышей Тейлера (TMEV) и другие. В отличие от двух предыдущих групп показано, что IRES-элементы этой группы не способны напрямую взаимодействовать с рибосомой и для инициации трансляции им необходим ряд факторов. Одним из таких факторов является PTB (Polypyrimidine Tract-Binding Protein), который связывается с первым доменом IRES-элемента [145]. Кроме того, IRES-элементы этого типа взаимодействует с факторами инициации трансляции eIF4B, eIF3 и eIF4G [182, 214, 242, 243]. При этом природный вирус ящера имеет два стартовых кодона, и трансляция с обоих из них регулируется одним IRES-элементом, что потенциально может быть использовано при дизайне векторов [15].

IRES-элементы подобные IRES-элементу полиовируса

Эта группа включает в себя IRES-элементы энтеровирусов, вирусов Коксаки, в том числе широко используемого Коксаки В3, а также IRES-элементы риновирусов. Именно с IRES-элементами этой группы и началось изучение вирусной кэп-независимой трансляции [223]. Благодаря этому данная группа является наиболее изученной.

Общая длина IRES-элементов этой группы составляет около 500 нуклеотидов, а их структура состоит из 6 доменов, при этом делеции I и VI доменов не являются критическими для трансляционной активности [25, 48, 315].

Как и для предыдущей группы эти IRES-элементы не могут самостоятельно связываться с рибосомой, для этого им нужен ряд трансляционных факторов и ITAF, таких как PTB, PCBP2 (Poly(C)-binding protein 2), eIF4G/eIF4A, eIF4B и eIF3 [48, 98, 206, 224,].

Еще одной отличительной особенностью данного типа IRES-элементов является то, что рибосома сканирует мРНК в поисках стартового кодона. Это позволяет вносить дополнительные нуклеотиды, например, последовательность Козака, между IRES и АУГ-кодоном для повышения экспрессии белка [48, 161, 323].

Особенности трансляции и современный подход к использованию IRES-элементов

Было показано, что в стрессовых условиях в эукариотической клетке усиливается трансляция по альтернативным кэп-независимым механизмам, в частности с использованием IRES-подобных элементов [170, 279]. При этом зачастую в клетках этот тип трансляции продолжает функционировать даже при подавлении кэп-зависимой трансляции [308, 323].

Эта особенность IRES-элементов была использована Lim et. al. для снижения иммунного ответа против самореплицирующегося РНК-вектора. Целевой ген транслировался по стандартному кэп-зависимому механизму, а IRES-элемент контролировал трансляцию противовоспалительных белков, для предотвращения ареста классической трансляции [168].

Среди особенностей IRES-элементов важно отметить, что эффективность их трансляции зависит от типа клеток, что позволяет делать вектор с преимущественно таргетным синтезом белка [48, 308].

Накопленные данные свидетельствуют о том, что мутации в IRES также влияют на вирулентность и тропизм. Так, было показано, что внесение мутаций в IRES-элемент, также может приводить к изменению тропизма. В частности, мутация Ц→У в положении 472 IRES-элемента у вакцинного штамма вируса полиомиелита Sabin-3 приводила к снижению нейровирулентности. Эта особенность открывает поле для дальнейшей разработки таргетной экспрессии целевого белка [134].

Использование вирусных IRES-элементов в искусственно сконструированных кольцевых мРНК является предпочтительной стратегией для обеспечения кэп-независимой инициации у эукариот. Среди них наиболее известными являются вирусы Коксаки В3 (CVB3), полиомиелита (PV), энцефаломиокардита (EMCV), ящура (FMDV) и энтеровирусов 29 и 71 (EV 29, EV71) [48, 163, 224, 326].

Помимо этого, ряд исследователей предлагает модифицировать IRES-элементы, путем введения в их состав аптамеров и сайтов для связывания с теми или иными факторами трансляции, например, фактором инициации 4G (Apt-eIF4G). В то же время было показано, что IRES-элемент имеет сложную вторичную структуру критически важную для его функционирования, и что введение аптамера в неоптимальные места приводит к потере трансляционной активности [48].

К преимуществам кольцевых мРНК-векторов стоит отнести их высокую стабильность, нулевой риск интеграции в геном, низкую стоимость производства, пролонгированную в сравнении с линейной мРНК продукцию целевого белка и универсальность. К недостаткам данного типа векторов стоит отнести более низкие уровни продукции целевого белка, в сравнении с линейными мРНК-векторами [69, 259, 294, 308].

Ввиду этого целью нашей работы стала разработка кольцевого мРНК-вектора, обеспечивающего высокий уровень продукции трансгена и изучение его в качестве основы для разработки вакцин и средств пассивной иммунизации.

2 ГЛАВА МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 МАТЕРИАЛЫ

2.1.1 ОБОРУДОВАНИЕ

Для взвешивания компонентов питательных сред и других реактивов использовались весы аналитические EX224 (Ohaus, США).

Для приготовления растворов и сред использовалась магнитная мешалка MR Hei-End (Heidolph, Германия).

Для приготовления сред и реактивов использовалась дистиллированная вода, полученная с использованием аквадистиллятора (GFL, Германия), и осмотическая вода, полученная с помощью системы очистки Milli-Q® Type 1 (Merck, Германия).

Измерение pH растворов проводилось pH-метром Mettler Toledo Seven Compact Duo S213 (Mettler Toledo GmbH, Швейцария).

Стерилизация посуды и сред методом автоклавирования проводилась в автоклаве 2540ML (Tuttnauer, Израиль).

Для определения количества и чистоты нуклеиновых кислот использовался спектрофотометр NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Линеаризацию ДНК-матриц проводилась в твердотельном термостате с термостатируемой крышкой «Гном» (ДНК-Технология, Россия).

Трансформацию компетентных клеток и инактивацию фетальных сывороток проводилась в водяной бане WB-4MS (BioSan, Латвия). В работе также использовался ледогенератор PORKKA KF 45 (PORKKA, Финляндия).

ПЦР и реакция сборки по Гибсону проводились в амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США).

Электрофорез проводился в горизонтальной камере для электрофорезов (Bio-Rad, США) с источником питания «Эльф-4» (ДНК-Технология, Россия).

Для визуализации результатов электрофореза использовался трансиллюминатор TCF-26LMX для Fusion, Vilber Lourmat.

Культивирование клеточных линий проводилось в CO₂-инкубаторе SANYO MCO-19AIC(UV) (SANYO, Япония).

Микроскопия клеточных линий при культивировании и трансфекции проводилась на микроскопе инвертированном флуоресцентном CKX41 (Olympus, Япония).

Подсчет количества клеток и оценка их жизнеспособности проводились с помощью счетчика клеток Countess (Thermo Fisher Scientific, США).

Оценка результатов ИФА и изучение *in vitro* люциферазной активности проводились на планшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия).

Изучение *in vitro* кинетики люциферазной активности проводилось с использованием модуля контроля атмосферы (для ридера CLARIOstar) (BMG Labtech, Германия).

Измерение прижизненной биолуминесценции проводилось на системе IVIS Lumina II (Life Sciences, США).

Приготовление гомогенатов легких проводилось в гомогенизаторе FastPrep-24 (MP Biomedicals, США).

Упаковка мРНК в липидные наночастицы проводилась на приборе Nanoassembler Ignite (Precision NanoSystems, США). Диализ проводился с использованием диализных кассет Slide-A-Lyzer (20 кДа) (Thermo Fisher Scientific, США).

Определение размера частиц и их заряда и распределения проводились на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Заражение лабораторных животных проводилось в ламинарном боксе класса II/тип А2 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия). Дальнейшее содержание зараженных животных велось в системе IsoCage N (Techniplast, Италия).

В работе также использовались центрифуги с охлаждением Centrifuge 5804R (Eppendorf, Германия) и Centrifuge 5417C (Eppendorf, Германия), морозильные установки на -80 °C SANYO Biomedical Freezer (SANYO, Япония) и на -20 °C MDF-DU300H-PE (PHCbi, Сингапур), наборы автоматических пипеток переменного объема (Thermo Scientific, Россия), электронные дозаторы для серологических пипеток (Thermo Scientific, США) и шприцевые фильтры 0,22 мкм PES (Pall Corporation, США).

2.1.2 КЛЕТОЧНЫЕ И БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КУЛЬТУРЫ, ВИРУСЫ

В работе использовались следующие клеточные культуры:

- НЕК-293 (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия);
- Vero E6 (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия);
- САСО-2 (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия);
- первичная культура костного мозга мышей C57BL/6;
- первичная культура спленоцитов мышей C57BL/6;

В работе также использовались клетки *E. coli* штамм Neb stable (New England Biolabs, США).

В работе использовался заражения лабораторных животных использовался вирус гриппа А H5N2 A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84 (адаптированный к мышам) (коллекция ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия).

Для заражения лабораторных животных также использовался вирус SARS-CoV-2 штамм hCoV-19/Russia/Moscow PMVL-1/2020 (коллекция ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия).

Для использования в качестве рекрутирующего компонента в стратегии “Prime and pull” использовался репликативно дефектный аденовирус человека 5 типа, не содержащий гена интереса (Ad5-null), предоставленный лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия.

2.1.3 ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Культивирование клеток *E. coli* проводилось на жидкой и агаризованной среде Лурия-Бертрани (Bioss, Китай) с добавлением Ампициллина (Applchem, Германия) до конечной концентрации 100 мкг/мл.

При проведении трансформации компетентных клеток использовалась среда SOB (HiMedia, Индия).

Культивирование клеток HEK-293 проводилось на среде DMEM (HyClone, США) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) до конечной концентрации 10%.

Разведение РНК и трансфекционного агента проводили в среде Opti-MEM I (Thermo Scientific, США)

Для гомогенизации легких, зараженных вирусом гриппа, использовалась среда 199 Хэнкса (Gibco, США).

Для работы с культурой костного мозга использовалась среда ImmunoCult™-ACF Dendritic Cell Medium (StemCell, США) с добавлением рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) (Gibco, США) до конечной концентрации 10 нг/мл

Для работы с первичной культурой из селезенки мыши использовалась среда RPMI 1640 (HyClone, США), с добавлением инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой (HyClone, США) до конечной концентрации 10%., а также смеси незаменимых аминокислот (Gibco, США)/

Во всех средах, использованных для культивирования клеток, конечная концентрация Пенициллина 100 ЕД/мл и Стрептомицина 100 мкг/мл.

2.1.4 ГОТОВЫЕ КОММЕРЧЕСКИЕ НАБОРЫ

В работе использовались следующие наборы.

- набор для выделения ДНК из геля и реакционных смесей Cleanup Standart (Евроген, Россия);
- набор для выделения плазмидной ДНК MiniPrep (Евроген, Россия);
- набор для выделения плазмидной ДНК MidiPrep (Евроген, Россия);
- GeneArt™ Gibson Assembly HiFi Master Mix (Invitrogen, США);
- HiScribe T7 High Yield mRNA Synthesis Kit (NEB, США);
- Monarch mRNA Cleanup Kit (NEB, США);
- Quant-iT RiboGreen mRNA Reagent (Thermo Fisher Scientific, США);
- POLIVIR SARS-CoV-2 «Express» (ПЦР-РВ) (Литех, Россия);
- BD Biosciences Mouse IFN-γ ELISPOT Set (BD Biosciences, США);
- MagniSort™ Mouse CD8 T cell Enrichment Kit (Thermo Fisher Scientific, США);
- ELISA kit IgG total-EIA-BEST (Вектор-Бест, Россия).

2.1.5 ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Получение ПЦР-фрагментов для молекулярного клонирования проводилось Фьюжн ДНК-полимеразой (Biolabmix, Россия).

Линеаризация матриц для синтеза мРНК проводилась ферментами рестрикции AflIII (Thermo Fisher Scientific, США) и BspQI (NEB, США).

Деградация ДНК-матрицы после проведения *in vitro* транскрипции проводилась ДНКазой I (NEB, США).

Деградация линейного предшественника кольцевой мРНК проводилась РНКазой R (Epicenter, США)

2.1.6 РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ, ТОКСИНЫ, АНТИТЕЛА

Для изучения протективной активности рекомбинантных антител в составе мРНК векторов использовался токсин А *Clostridium difficile*, предоставленный Лабораторией молекулярных основ патогенности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия, и ботулотоксин, предоставленный Лабораторией иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия.

Для оценки количества рекомбинантного S-гликопротеина в культуральной среде использовалось рекомбинантное антитело 1p1B10-Fc, предоставленное лабораторией иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия. В качестве вторичных антител использовался конъюгат козьих антител к IgG мыши с пероксидазой хрена (Sigma, США)

Рекомбинантный CROPs домен токсин А *Clostridium difficile* для оценки продукции рекомбинантного антитела С4.2-Fc был предоставлен Лабораторией молекулярных основ патогенности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия.

Для оценки титров специфических антител в сыворотке крови иммунизированных мышей использовался рекомбинантный рецептор-связывающий домен S-гликопротеина В.1.1.1 вируса SARS-CoV-2 (SinoBiological, Китай).

В качестве положительного контроля для построения калибровочной кривой при изучении кинетики синтеза рекомбинантного антитела B11-Fc после введения мРНК векторов использовалось очищенное антитело B11-Fc, предоставленное Лабораторией иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия.

2.1.7 ДРУГИЕ РЕАКТИВЫ

- гуанозин-5'-трифосфат (GTP) (NEB, США);
- N1-метилпсевдоуридин-5'-трифосфат (Биолабмикс, Россия);
- кэпирующий реагент CleanCap AG (TriLink, США);
- ионизируемый липид ALC-0315 (Cayman Chemical Company, США);
- фосфолипид DSPC (Cayman Chemical Company, США);
- холестерин (Cayman Chemical Company, США);
- ПЭГ-липид (Cayman Chemical Company, США);
- D-люциферин (Promega, США);
- трансфекционный реагент Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США);
- ТМБ (тетраметилбензидин) (Immunotech, Россия);
- H₂SO₄ (стоп-реагент) (Химмед, Россия);
- фосфатно-солевой буфер (PBS) (Sigma, США);
- Маркер молекулярного веса GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

2.1.8 РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

При работе с нуклеиновыми кислотами использовались свободные от нуклеаз пробирки объемом 15 и 50 мл, а также микропробирки объемом 0,2 мл 0,5 мл и 1,5 мл и наконечники для автоматических пипеток объемом 10, 200 и 1000 мкл (GenFollower, Китай).

В работе также использовались одноразовые бактериальные чашки Петри (Перинт, Россия). Культивирование клеток проводилось на матрасах площадью 25

и 75 см² (Corning, США). Анализ люциферазной активности проводился в непрозрачных плоскодонных 96-луночных планшетах (Greiner, Германия). Определение вирусной нагрузки проводилось в культуральных плоскодонных 96-луночных планшетах (Corning, США). Реакция гемагглютинации проводилась в U-образных 96-луночных планшетах (Corning, США)

Для гомогенизации легких использовался гранатовый песок для гомогенизации 0,7 мм (OMNI International, США)

2.1.9 ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ

Сборка ДНК-матриц для синтеза кольцевых и линейных векторов проводилась на основе плазмиды pCDNA3.1(Zeo+). Нуклеотидная последовательность IRES-элементов была синтезирована в компании Евроген (Россия).

В работе использовались IRES-элементы вируса Коксаки В3 (GenBank: M33854.1) и риновируса В6 (GenBank: DQ473486.1).

Плазмида, содержащая последовательность рекомбинантного антитела С4.2-Fc, была предоставлена Лабораторией молекулярных основ патогенности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия.

Плазмида, содержащая последовательность рекомбинантного антитела В11-Fc, была предоставлена Лабораторией иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия.

Плазмида, содержащая последовательность S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2, была предоставлена Лабораторией клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия.

Плазмида, содержащая последовательности рекомбинантных выравненных белков М2 и NP вируса гриппа А, была предоставлена н.с лаборатории

молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия
Щербининым Д.Н.

ДНК-матрицы для синтеза линейной мРНК, кодирующей S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2 и рекомбинантное антитело B11-Fc, были предоставлены лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия.

2.1.10 ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Для изучения кинетики люциферазной активности *in vivo*, гуморального иммунного ответа и выживаемости при летальной инфекции вирусом гриппа А использовались самки лабораторных мышей линии BALB/ полученные из Филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России/ Возраст животных варьировался от 6 до 8 недель, вес – от 18 до 20 г, Статус животных SPF.

Для изучения протективной активности против летальной интоксикации ботулотоксином и токсином А *Clostridium difficile* и клеточного иммунного ответа против вируса гриппа А использовались самки мышей линии C57B1/6, весом 18 - 20 г и возрастом 6 - 8 недель., статус здоровья SPF. Животные также были получены из Филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для изучения иммуногенности и протективной активности мРНК векторов против летальной инфекции вирусом SARS-CoV-2 использовались трансгенные мыши F1, полученные путем скрещивания нетрансгенных самок мышей C57BL/6 Gamrc (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) и трансгенных самцов B6.Cg-Tg(K18ACE2)2Prlmn/J (Jackson Laboratory). Статус животных SPF.

Все животные имели неограниченный доступ к пище и воде. При содержании использовались предварительно стерилизованные клетки, корма, подстилка и вода. Содержание лабораторных животных проводилось в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», а также при соблюдении

«Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» и «Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях» от 22 сентября 2010 года.

Для постановки реакции гемагглютинации вирусами гриппа использовалась суспензия эритроцитов морской свинки.

Эксперименты были одобрены локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России в соответствии с протоколами №93 от 14 мая 2025, №96 от 23 мая 2025, №97 от 03 июня 2025 и №100 от 24 июля 2025.

2.2 МЕТОДЫ

2.2.1 ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Для получения ПЦР-продуктов для клонирования использовалась Фьюжн ДНК-полимераза (Biolabmix, Россия). Реакционная смесь готовилась согласно инструкции производителя.

Амплификацию ПЦР-продуктов проводили в амплификаторе T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Программа амплификации состояла из следующих этапов:

1. Изначальная денатурация – 95 °C 3 минуты.
2. 30 циклов амплификации:
 - денатурация 95 °C 15с;
 - отжиг праймеров 55-65 °C 10с (температура варьировалась в конкретных случаях в зависимости от используемой матрицы и праймеров);

- элонгация 72 °C 1-5 мин (длительность элонгации варьировалась от размера амплифицируемого фрагмента).

3. Финальная элонгация – 5 мин.

Для создания панели кольцевых мРНК-векторов применялся кольцевой ПЦР, пары использованных праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры, использованные для получения панели кольцевых мРНК векторов.

Конструкция	Название праймеров	Последовательность
CVB3-polyAC	CVB-polyAC-F	5'-CAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACCAAAAAAAC- AAAACACATTAAACAGCCTGTGGGTGATC -3'
	polyAC-R	5'-GGTTTTTTTTTTGTTTTTTTGTGTTTTGTTTTTCG- GCTATTGCGTTTCCGGCGT -3'
CVB3-PABP3	CVB3-PABP3-F	5'-CAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAATAATTG- ACTAATTAACAGCCTGTGGGTGATC -3'
	PABP3-R	5'-TTAGTCAATTATTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTT- GGTTTTTTTTTTTCGGCTATTGCGTTTCCG-3'
HRVB6-polyAC	HRVB6-polyAC-F	5'-CAAAAAAAAAACAAAAAAAAAACCAAAAAACA- AAACACATTAAACAGCGGATGGGTATCCCACC-3'
	polyAC-R	5'-GGTTTTTTTTTTGTTTTTTTGTGTTTTGTTTTTCG- GCTATTGCGTTTCCGGCGT -3'
HRVB6-PABP3	HRVB6-PABP3-F	5'-CAAAAAAAAAAAAAATAATTGACTAATTAATACA- GCGGATGGGTATCC-3'
	PABP3-R	5'-TTAGTCAATTATTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTT- GGTTTTTTTTTTTCGGCTATTGCGTTTCCG-3'

Затем для получения мРНК векторов, кодирующих целевые антигены или рекомбинантные антитела, использовалось две универсальные пары праймеров для амплификации векторов (см. табл. 2).

Таблица 2 – Универсальные праймеры для амплификации линейного и кольцевого мРНК-векторов

Вектор	Название праймеров	Последовательность
Кольцевой	Universal-Circ-F	5'-TGATAATAGAAAAAACAAAAACAAACGGCTATTATG-3
	Universal-Circ-R	5'-CATGGTGGCGATCACAGTATATTTAAC-3'
Линейный	Universal-Linear-F	5'-TGATGACTCGAGCTGGTACTGCATG-3'
	Universal-Linear-R	5'-GGTGGCGGGTTCTCTCTGAG-3'

Пары праймеров, использованные для амплификации целевых генов, приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Наборы праймеров для амплификации целевых генов

Целевой ген	Название праймера	Последовательность праймера
S-SARS-Cov-2	S-to-circ-F	5'-TATTTGTTAAATATACTGTGATCATGTTTGTGTTTCCTTGTGTTA-TTGCCACTAGTCTCTAGTCAG-3'
	S-to-circ-R	5'-TTTTTTGTTTTTTCTATTATCATTATGTGTAATGTAATTTGACTC-CTTTGAGCACGGGC-3'
M2NP	M2NP-to-circ-F	5'-TATTTGTTAAATATACTGTGATCATGAGCCTGCTCACCGAGG-3'
	M2NP-to-circ-R	5'-GTTTTTTGTTTTTTCTATTATCAGGATCTATTGTCGTACTIONCCT-CGG-3'
	M2NP-to-linear-F	5'-AGACTCAGAGAGAACCCGCCACCATGAGCCTGCTCACCGAGG3'
	M2NP-to-linear-R	5'-TGCAGTACCAGCTCGAGTCATCAGGATCTATTGTCGTACTIONCCTC-3'
B11-Fc	B11-to-circ-F	5'-TATTTGTTAAATATACTGTGATCATGGGCTGGAGTCTGATCC-TTC-3'
	Fc-to-circ-R	5'-TTTTTTGTTTTTTCTATTATCACTTGCCAGGAGACAAAGACA-GGCTCTTC-3'
B11	B11-to-circ-F	5'-TATTTGTTAAATATACTGTGATCATGGGCTGGAGTCTGAT-CCTTC-3'
	B11-to-circ-R	5'-TTTTTTGTTTTTTCTATTATCATGAGGAGACAGTGACCTGGG-TCCCTGGCCCCAGTAGTCATACTCA -3'
C4.2-Fc	C4.2-to-circ-F	5'-ATTTGTTAAATATACTGTGATCATGGGCTGGAGCTTGATCCTTC-TGTTCC-3'
	Fc-to-circ-R	5'-TTTTTTGTTTTTTCTATTATCACTTGCCAGGAGACAAAGA-CAGGCTCTTC-3'
	C4.2-to-linear-F	5'-AGACTCAGAGAGAACCCGCCACCATGGGCTGGAGCTTGAT-CCTTCTG-3'
	Fc-to-linear-R	5'-TTTTTTGTTTTTTCTATTATCACTTGCCAGGAGACAAAGACAGG-CTCTTC-3'

2.2.2 ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Электрофорез проводили в трис-ацетатном буфере ТАЕ (40 мМ трис-ацетат рН 8.1 и 2 мМ ЭДТА). Для разделения фрагментов ДНК использовали гель с содержанием агарозы 0,8%. Для анализа мРНК использовался гель с содержанием агарозы 1%. Содержание бромистого этидия составляло 0,5 мкг/мл для обоих типов гелей. Электрофорез фрагментов ДНК проводился при комнатной температуре, электрофорез РНК проводился в холодном ТАЕ-буфере.

Детекцию фрагментов ДНК осуществляли с помощью системы GelDoc EZ Imager (Bio-Rad, США). Для определения молекулярного веса фрагментов ДНК использовался маркер молекулярного веса GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.3 СБОРКА ДНК-МАТРИЦ ДЛЯ СИНТЕЗА РНК

Целевые ПЦР-продукты были вырезаны из агарозного геля и выделены набором Clean up mini (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Определение концентрации выделенной ДНК проводилось спектрофотометрически на приборе NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Реакция сборки проводилась набором GeneArt™ Gibson Assembly HiFi Master Mix (Invitrogen™, США) согласно инструкции производителя.

2.2.4 ТРАНСФОРМАЦИЯ КОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК

Компетентные клетки *E.coli* Neb stable готовили с помощью хлорида кальция по методике, описанной Chang и соавт. Трансформацию проводили по измененному протоколу Chang и соавт.: Аликвота компетентных клеток была разморожена на льду, затем к клеткам была добавлена реакционная смесь после сборки матриц по методу Гибсона. Клетки и ДНК инкубировались на льду в течение 30 минут, затем проводился тепловой шок при 42 °C в течение 40 секунд, затем клетки инкубировались во льду в течение 5 минут, после чего к добавлялась среда SOB и культивировалась на шейкере при 37 °C в течение 1 часа [42].

2.2.5 СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЭНГЕРУ

Секвенирование полученных конструкций проводилось в лаборатории анализа геномов в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России под руководством к.б.н., доцента Ворониной О.Л. В работе использовался генетический анализатор 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

2.2.6 ВЫДЕДЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Культивирование клеток *E.coli* Neb stable проводилось на жидкой питательной среде Луи-Бертрана. Конечная концентрация ампициллина в среде составляла 100 мкг/мл. Культивирование проводилось при 37 °C в течение 18 часов.

Выделение плазмидной ДНК проводилось набором MidiPrep (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя.

Чистота и концентрация полученной ДНК определялась спектрофотометрически на приборе NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Стабильность ДНК-матриц определялась методом электрофореза в 0,8% агарозном геле.

2.2.7 ЛИНЕАРИЗАЦИЯ ДНК-МАТРИЦЫ

Линеаризация матриц для синтеза кольцевой мРНК проводилась ферментом рестрикции AflII (Thermo Fisher Scientific, США). Линеаризация проводилась в буфере Orange x1 (Thermo Fisher Scientific, США), при 37 °С в течение 18 часов.

Линеаризация ДНК-матриц для синтеза линейной мРНК проводилась ферментом BspQI (NEB, США) Линеаризация проводилась в буфере CutSmart x1 (NEB, США) при 50 °С в течение 18 часов.

Качество линеаризации проверялось методом электрофореза в 0,8% агарозном геле. Затем полученную матрицу очищали фенол-хлороформной экстракцией с последующим переосаждением ацетатом натрия. Очищенную ДНК растворяли в деионизированной воде, концентрацию матрицы определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.8 *IN VITRO* ТРАНСКРИПЦИЯ

Синтез мРНК проводился набором HiScribe T7 High Yield mRNA Synthesis Kit (NEB, США) согласно инструкции производителя. Реакционные смеси для получения линейной и кольцевой мРНК отличались. Для синтеза кольцевой мРНК смесь содержала уридин-5'-трифосфат, и не содержала кэпирующих агентов. В реакционной смеси для синтеза линейной мРНК уридин-5'-трифосфат был заменен на N1-метилпсевдоуридин-5'-трифосфат (YEASEN, Китай). Также в состав

добавлялся кэпирубщий агент CleanCap AG (TriLink, США). Реакцию синтеза проводили в течение 6 часов, после этого в реакционную смесь добавляли ДНКазу I (NEB, США) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C для удаления ДНК-матрицы. Далее проводилась очистка мРНК набором Monarch mRNA Cleanup Kit (NEB, США).

Для получения кольцевой мРНК из её линейного предшественника проводилась дополнительная стадия циклизации. Для этого к раствору полученного РНК добавляли гуанин-5'-трифосфат до конечной концентрации 2 мМ и инкубировали при 55°C в течение 15 мин. Далее снова следовала очистка набором Monarch mRNA Cleanup Kit (NEB, США). После этого проводилось разрушение остаточного количества линейных предшественников кольцевой мРНК. Для этого раствор кольцевой мРНК прогревали при 65°C в течение 3 мин, охлаждали на льду и обрабатывали РНКазой R (Epicenter, США) в течение 30 минут при 37°C. Затем проводилась окончательная очистка кольцевой мРНК набором Monarch mRNA Cleanup Kit (NEB, США).

2.2.9 УПАКОВКА МРНК В ЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

Перед использованием измеряли диаметр, распределение по размерам и дзета-потенциал частиц на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Эффективность инкапсуляции и концентрацию мРНК в конечных препаратах определяли с помощью анализа RiboGreen (Quant-iT RiboGreen mRNA Reagent, Thermo Fisher Scientific).

Липидные наночастицы состояли из ионизируемого липида ALC-0315, фосфолипида DSPC, холестерина и ПЭГ-липид в молярном соотношении 46,3:9,4:42,7:1,6. Липидные компоненты растворяли в этаноле. Очищенную мРНК растворяли в 10 мМ цитратном буфере натрия (pH 3,0) до конечной концентрации 0,2 мг/мл. Затем водную и спиртовую фракции смешивали в соотношении 3:1 на устройстве NANOassembler Spark (Precision NanoSystems, США).

Полученную смесь диализовали против PBS (pH 7,2) с 10% сахарозой в кассетах Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 24 ч, затем стерилизовали фильтрованием через PES-фильтр 0,22 мкм.

Перед использованием препаратов измеряли диаметр, индекс полидисперсности и дзета-потенциал полученных наночастиц на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Эффективность инкапсуляции и концентрацию мРНК определяли красителем Quant-iT RiboGreen mRNA Reagent, (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.10 ТРАНСФЕКЦИЯ АДГЕЗИОННЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ HEK293

Трансфекция клеток HEK293 проводилась реагентом Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Соотношение мРНК к трансфекционному агенту составило 1:2. При трансфекции 96-луночного планшета накануне трансфекции клетки засевались в количество 2×10^4 клеток на лунку. Количество мРНК составило 10 нг/лунку. При трансфекции 6-луночного планшета для изучения продукции целевых белков количество клеток на лунку составило 5×10^5 количество мРНК 1 мкг/лунку.

2.2.11 ИЗМЕРЕНИЕ ЛЮЦИФЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO*

Клетки HEK-293 высевали в 96-луночные планшеты, затем проводили трансфекцию мРНК-векторами, кодирующими люциферазу светлячка.

Измерение тотальной люциферазной активности проводили через 18 часов. К клеткам добавлялся лизирующий буфер (Promega, США), лизис проводили в течение 20 минут, затем центрифугировали при 12 000 g, супернатант переносили в лунки непрозрачного планшета и добавляли D-люциферин (Promega, США) до конечной концентрации 5 мМ. Измерение люциферазной активности проводилось на планшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия).

При измерении прижизненной кинетики люциферазной активности клетки сразу высевали в непрозрачный плоскодонный планшет. (Greiner, Германия). Затем через 15 мин после трансфекции в культуральную среду добавляли D-люциферин (Promega, США) до конечной концентрации 5 мМ. Затем планшет помещали в планшетный ридер CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) с модулем контроля атмосферы. Эксперимент проводили при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Измерение люциферазной активности проводилось автоматически каждый час, на протяжении 120 часов.

2.2.12 ИЗМЕРЕНИЕ ПРИЖИЗНЕННОЙ ЛЮЦИФЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ *IN VIVO*

Самок мышей BALB/c внутримышечно иммунизировали препаратами липидных наночастиц, содержащими различные мРНК-векторы, кодирующие люциферазу светлячка, в дозе 10 мкг мРНК на мышь. Затем по прошествии 10, 24, 48 и 72 ч после введения мРНК после седации изофлураном мышам внутрибрюшинно вводили 2,5 мкг D-люциферина. Измерение биолюминесцентного сигнала проводили на системе IVIS Lumina II (Life Sciences, США).

2.2.13 ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА S-ГЛИКОПРОТЕИНА SARS-COV-2 *IN VITRO* МЕТОДОМ ИФА

Клетки HEK-293 трансфицировали в 6-луночных планшетах мРНК, кодирующими S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2. Через 20 ч после трансфекции клетки собирали, трижды отмывали PBS и лизировали. Клеточный лизат центрифугировали при 12 000 g в течение 10 минут. Супернатант использовали для твердофазного ИФА.

Накануне анализа в лунки 96-луночного планшета (Costar, США) сорбировали антитела 1p1B10-Fc [270]. в количестве 100 нг на лунку и инкубировали при +4°C в течение ночи. После блокировки и промывок в лунки

вносили супернатанты лизатов и контрольные образцы. В качестве положительного контроля использовали рекомбинантный S-гликопротеин SARS-CoV-2 (Sino Biological, Китай).

В качестве первичных антител использовали сыворотку мышей, иммунизированных S-гликопротеином, в разведении 1:1000. Для детекции применяли вторичные антитела против IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (GE Healthcare, США). Реакцию проявляли субстратом ТМБ (Immunotech, Россия) и останавливали 1М H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при 450 нм на планшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия).

2.2.14 ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИТЕЛА C4.2 *IN VITRO* МЕТОДОМ ИФА

Клетки HEK293 были трансфицированы в 6-луночных планшетах, как было описано в пункте 2.2.9. По прошествии 18 часов после трансфекции проводился сбор культуральной среды и её фильтрование через PES-фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Полученный фильтрат использовался для постановки ИФА.

В качестве антигена использовался рекомбинантный CROPs домен TcdA в количестве 100 нг на лунку. Сорбцию проводили в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6) в течение 16 часов при 4 °C. На следующий день проводили промывку и блокировку. Затем в лунки с антигеном добавляли серию разведений культуральной среды (1:1, 1:4, 1:16 и 1:48) в блокирующем буфере, и инкубировали 1 ч при 37 °C. После промывки планшета в лунки добавляли конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к IgG человека (Sigma, Германия). Разведение конъюгированных антител составило 1:1000. Затем проводилась инкубация в течение 1 ч при 37 °C. Далее планшет промывали и добавляли ТМБ (Immunotech, Россия). Реакцию останавливали с помощью 4М H₂SO₄. Измерение оптической плотности проводили при 450 нм на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.15 ВВЕДЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ТОКСИНОВ ЛАБОРАТОРНЫМ ЖИВОТНЫМ

Введение мРНК препаратов проводилось внутримышечно в объеме, не превышающем 100 мкл. Введение репликативно-дефектного аденовируса человека 5 серотипа проводилось интраназально в объеме 50 мкл. Введение токсинов проводилось внутрибрюшинно в объеме, не превышающем 200 мкл.

2.2.16 ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ИФА

Кровь иммунизированных мышей инкубировалась в течение 30 минут при 37°C, затем на льду в течение ещё 30 минут. Центрифугирование проводилось при температуре +4 °C при 800 g в течение 10 минут.

Для экспериментов по иммуногенности векторов, кодирующих S-гликопротеин SARS-CoV-2, в качестве антигена использовался рецептор-связывающий домен S-гликопротеина B.1.1.1 вируса SARS-CoV-2 (SinoBiological, Китай) в количестве 100 нг/лунку. Накануне анализа проводилась сорбция антигена, затем проводилась отмывка и блокировка.

Для экспериментов по изучению иммуногенности векторов, кодирующих консервативные антигены вируса гриппа, в качестве антигена использовался препарат H5N2 A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/ выращенный в куриных эмбрионах и очищенный методом центрифугирования в сахарозе в количестве 100 нг общего белка на лунку. Накануне анализа проводилась сорбция антигена, затем проводилась отмывка и блокировка.

Сорбция антител из разведений сыворотки проводилась при 37°C в течение часа, затем проводилась отмывка и внесение антител против IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена, (Abcam, Соединенное Королевство). Разведение вторичных антител составило 1:5000. Затем проводилось

инкубирование при 37°C в течение часа, после чего следовала серия отмывок и внесение ТМБ (Immunotech, Россия). Реакцию останавливали 4М H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при 450 нм на спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США). Титр определяли как наибольшее разведение сыворотки, дающее сигнал как минимум вдвое превышающий сигнал контрольной сыворотки в том же разведении.

Для измерения кинетики синтеза рекомбинантного антитела B11-Fc в сыворотках использовался коммерческий набор ELISA kit IgG total-EIA-BEST (Вектор-Бест, Россия). В качестве положительного контроля использовалось очищенное рекомбинантное антитело B11-Fc, предоставленное лабораторией иммунобиотехнологии НИЦЭМ Н.Ф. Гамалеи.

2.2.17 ЗАРАЖЕНИЕ И МОНИТОРИНГ СОСТОЯНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Заражение животных проводилось интраназально после седации изофлураном, количество вводимого раствора составляло 50 мкл.

Для летальной модели инфекции вирусом SARS-CoV-2 использовался штамм hCoV-19/Russia/Moscow PMVL-1/2020 в дозе 10⁵ ТЦД₅₀.

Для летальной модели инфекции вирусом гриппа А использовался штамм вируса гриппа H5N2 A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/ выращенный в куриных эмбрионах и очищенный методом центрифугирования в сахарозе. Доза заражения 5 ЛД₅₀.

Животные, зараженные вирусом SARS-CoV-2, были под наблюдением в течение 28 дней, животные, зараженные вирусом гриппа А, были под наблюдением в течение 14 дней. Животных периодически взвешивали.

2.2.18 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ SARS-COV-2 В ЛЕГКИХ ИММУНИЗИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ

На 3-й день после заражения лёгкие извлекали, готовили 10% гомогенаты в среде DMEM с 2% инаktivированной фетальной телячьей сывороткой. Гомогенизацию проводили с помощью прибора FastPrep-24 (MP Biomedicals, США) в пробирках с керамическими бусинами. Полученные гомогенаты центрифугировали при 12 000 g в течение 10 мин, супернатанты аликвотировали и использовали для дальнейшей работы.

Вирусную нагрузку оценивали двумя способами: как инфекционный титр методом ТЦД₅₀ и методом обратной транскрипции с ПЦР в реальном времени.

Титрование инфекционного вируса по ТЦД₅₀

За сутки до анализа клетки Vero E6 высевали в 96-луночные культуральные планшеты. Из полученных гомогенатов легких готовили серийные 10-кратные разведения в среде DMEM с 2% инаktivированной фетальной телячьей сывороткой.

Из каждого разведения в клетки вносили по 100 мкл раствора в 8 повторностях. Планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 120 ч, после чего визуально оценивали цитопатический эффект (ЦПЭ). Инфекционный титр рассчитывался по методу Спирмена-Кербера. Результаты выражали в виде log₁₀(ТЦД₅₀) на 1 г ткани легкого.

Количественный ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией

Из аликвот гомогенатов легких проводилось выделение totalной РНК набором RNeasy Plus Universal Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя.

Концентрацию и чистоту РНК проверяли спектрофотометрически. Обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени проводили с использованием коммерческого набора POLIVIR SARS-CoV-2 «Express» (Литех, Россия), содержащего специфичные праймеры и зонды к гену E SARS-CoV-2. Для количественного анализа на каждой планшете параллельно с образцами амплифицировали стандарты – серийные разведения вирусной РНК с известной концентрацией (ГЭ/мл, геномных эквивалентов на мл), по которым строили калибровочную кривую. Результаты выражали в виде $\log_{10}$ (геном-эквивалентов) на 1 г ткани легкого.

2.2.19 ОЦЕНКА CD8⁺ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ МЕТОДОМ ELISPOT-АНАЛИЗА

Анализ цитотоксических Т-лимфоцитов проводился по методике Атлауханова и соавт. [1].

Интактные мыши линии C57BL/6 были подвергнуты эвтаназии методом цервикальной дислокации. Затем в асептических условиях из костного мозга бедренных и больших берцовых костей была получена суспензия клеток в фосфтно-солевом буфере, содержащем 2% термически инактивированной сыворотки (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences HyClone, США). Затем проводился лизис эритроцитов методом осмотического лизиса.

Полученные ядродержащие клетки культивировались в среде ImmunoCult™-ACF Dendritic Cell Medium (StemCell, США). с добавлением рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) (Gibco, США) до конечной концентрации 10 нг/мл. при температуре 37 °C в 5% атмосфере CO₂. По прошествии 3 дней к клеткам вносили равный объем среды с теми же добавками.

Elispot-анализ проводили набором BD Biosciences Mouse IFN-ELISPOT Set (BD Biosciences, США) согласно инструкции производителя.

По прошествии 7 дней культивирования проводился подсчет клеток и оценка их жизнеспособности с помощью счетчика клеток Countess (Thermo Fisher Scientific, США). Активацию клеток проводили липополисахаридом (LPS) из *E. coli* (Sigma, США) в конечной концентрации 0,1 мкг/мл и нагружали антигенами. В качестве антигена использовался препарат H5N2 A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/ выращенный в куриных эмбрионах и очищенный методом центрифугирования в сахарозе. В качестве контрольных образцов использовался аллантоис куриного эмбриона и фосфатно-солевой буфер. Доза вируса гриппа составляла 10 БОЕ/клетку.

Затем клетки высевали в предварительно подготовленный планшет из набора с сорбированными антителами к интерферону-гамма. Количество клеток на лунку составило 5×10^4 .

В данном эксперименте изучалось количество клеток через 60 суток после иммунизации. На следующий день после активации дендритных клеток проводилась эвтаназия иммунизированных мышей методом цервикальной дислокации. Затем в асептических условиях из селезенки была получена суспензия клеток в фосфатно-солевом буфере, содержащем 2% термически инактивированной сыворотки (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences HyClone, США). Затем проводился лизис эритроцитов методом осмотического лизиса.

Из полученной суспензии $CD8^+$ клетки выделяли набором MagniSort™ Mouse CD8 T cell Enrichment Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Затем проводились подсчет и оценка жизнеспособности клеток с помощью счетчика клеток Countess (Thermo Fisher Scientific, США). Затем клетки вносили к предварительно активированным дендритным клеткам в количестве 1×10^5 клеток на лунку. По прошествии 36 часов проводилась фиксация клеток с последующим проведением анализа согласно инструкции производителя.

Индивидуальные фотографии лунок делали с помощью микроскопа Levenhuk DTX 700 LCD (Levenhuk, США), подсчет спотов проводился вручную.

2.2.20 СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). *In vitro* эксперименты повторяли трижды, количество технических повторов 3. Принятые в работе уровни значимости и их обозначение на рисунках: ns – не значимо, * – $p \leq 0.05$; ** – $p \leq 0.01$; *** – $p \leq 0.001$; **** – $p < 0.0001$. Данные, представленные на линейных графиках и гистограммах, показывают среднее значение с доверительным интервалом 95%. Сравнение двух исследуемых групп между собой проводилось с помощью U-критерия Манна-Уитни. При количестве исследуемых групп >2 проводилось попарное сравнение групп между собой. Различия между выживаемостью животных в экспериментальных группах оценивали с использованием логрангового метода Мантель-Кокс.

3 ГЛАВА. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе данной работы для получения кольцевых мРНК была выбрана платформа на основе рибозимной циклизации с использованием интронов 1 типа. Выбор рибозимного метода циклизации объясняется технологической простотой, и как следствие, более низкой себестоимостью данного метода в сравнении с ферментативными методами сшивки [308].

Метод циклизации на основе интронов используется компаниями Orna therapeutics и Therorna – лидерами в области кольцевых мРНК векторов [308].

В качестве механизма трансляции был выбрана IRES-зависимая трансляция. В данном типе трансляции ключевую роль играет внутренний сайт посадки рибосомы. Кэп-зависимая трансляция белка с кольцевых мРНК не использовалась из-за технологической сложности и трудоемкости данной технологии, малоприменимой для масштабного производства в настоящее время. Изучение использования N⁶-метиладенозина в данной работе не проводилось. Использование трансляции по типу катящегося кольца не использовалось так как нуклеотиды IRES-элемента и остаточных экзонных участков приводят к синтезу побочного белкового продукта [308, 323].

Существует большое количество различных IRES-элементов, которые можно разделить на четыре группы (подробнее об этом см. раздел 1.3.3). Среди них были выбраны IRES-элементы, подобные полиовирусу.

В работе не использовались IRES-элементы подобные IRES паралича сверчка (CrPV). Это объясняется тем, что при трансляции данному IRES-элементу не требуется стартовый кодон, что приводит к частому смещению рамки считывания и, как следствие, нежелательным побочным эффектам, вызванным абберрантными белками [308, 323].

Также не использовались IRES-элементы, подобные IRES-элементу гепатита С (HCV) и IRES-элементу вируса энцефаломиокардита (ECMV), поскольку, согласно литературным данным, они показывают более низкие уровни трансляционной активности в сравнении с IRES-элементом вируса Коксаки В3 [143].

В то же время последние данные говорят о перспективности использования IRES-элементов риновирусов, однако степень их изученности сравнительно мала [48].

3.1 ДИЗАЙН КОЛЬЦЕВЫХ мРНК-ВЕКТОРОВ

На первом этапе работы с помощью программного обеспечения RNAfold на основе минимальной свободной энергии было проведено предсказание вторичной структуры интрон-экзонных стыков пре-тРНК^{лейцин} *Anabaena*. Схематическое изображение вторичной структуры мРНК вектора до и после циклизации приведено на рисунке 3. Для лучшей визуализации вторичная структура кодирующей последовательности вектора изображена упрощенно [101].

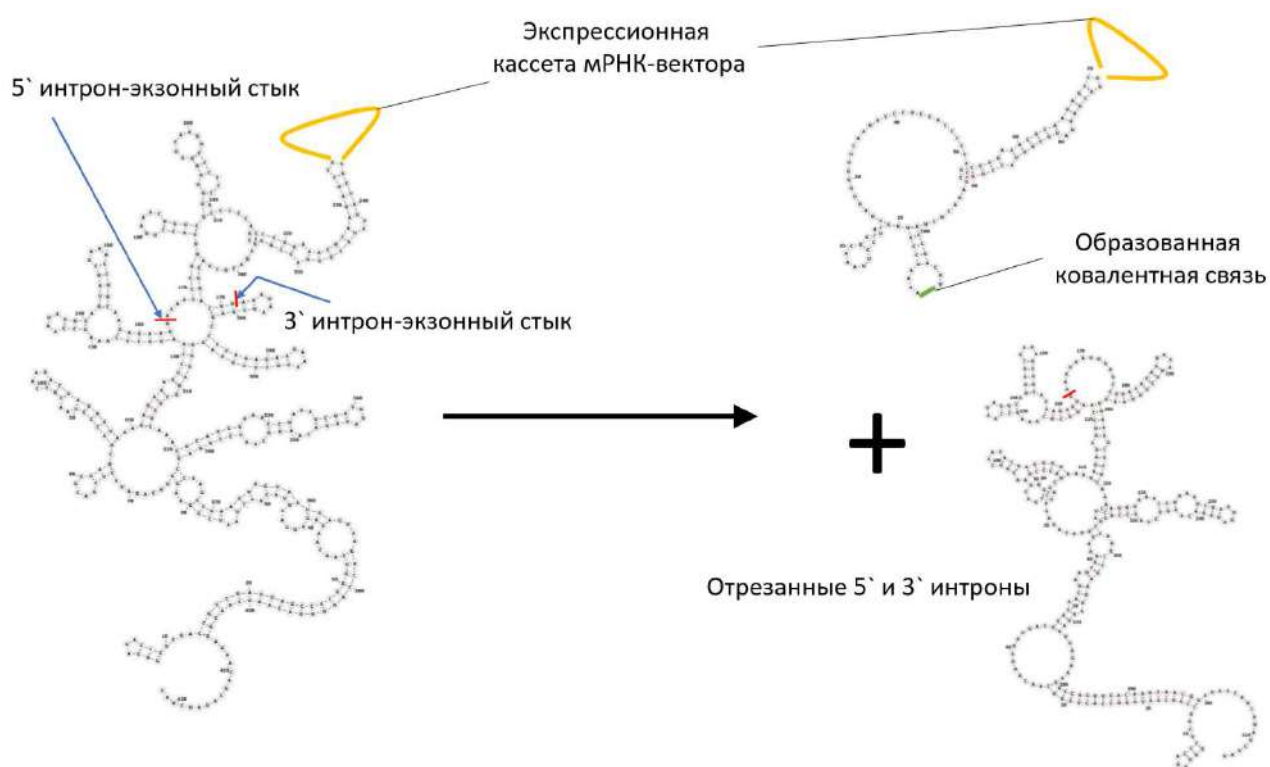
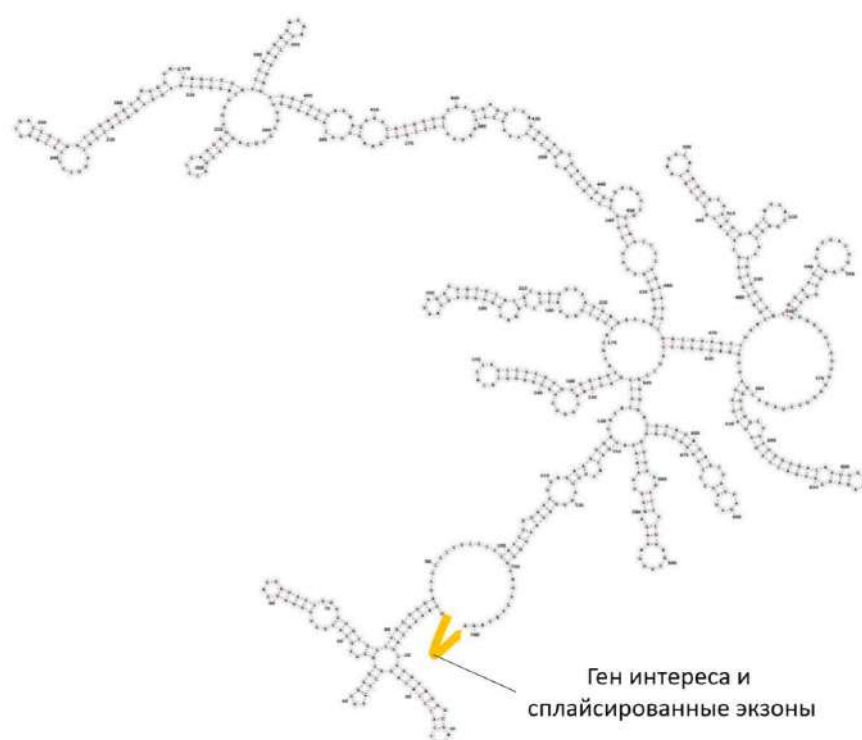


Рисунок 3. – Схематическое изображение вторичной структуры кольцевого мРНК вектора в процессе циклизации интрон-экзонных стыков пре-тРНКлейцин *Anabaena*. Стрелками и красными линиями показаны места вырезания интронов. Образованная ковалентная связь показана зеленым. Из-за ограничений программного обеспечения оба интроны показаны одной вторичной структурой, место разреза показано красным. Предсказание вторичной структуры на основании расчетной свободной энергии выполнено программным обеспечением RNAfold [101].

Далее был проведен анализ вторичной структуры IRES-элементов. Для работы нами был выбран широко используемый IRES-элемент вируса Коксаки В3, а также IRES-элемент риновируса В6. С помощью программного обеспечения RNAfold была предсказана вторичная их вторичная структура на основании расчета минимальной свободной энергии она приведена на рисунке 4А и 4Б.

А



Б

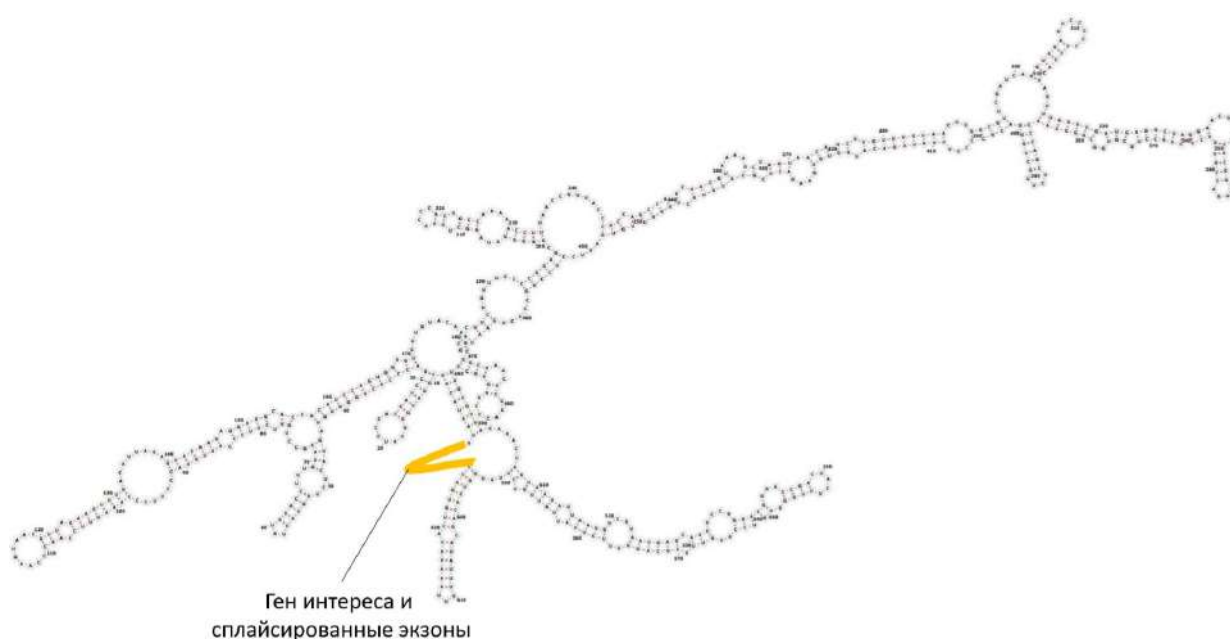


Рисунок 4 – Предсказанная вторичная структура используемых IRES-элементов (А) – IRES-элемент вируса Коксаки В3, (Б) – IRES-элемент риновируса В6. Для лучшей визуализации остальная часть мРНК-вектора показана оранжевой линией. Расчеты минимальной свободной энергии, выполнены программным обеспечением RNAfold [101].

Несмотря на то, что оба IRES-элемента относятся к группе подобных полиовирусу IRES-элементов, они имеют различную вторичную структуру и даже длину. IRES-элемент вируса Коксаки В3 имеет длину 741 нуклеотид, в то время, как IRES-элемент риновируса В6 только 627. Однако в их структуре существует схожая доменная организация, хотя размер и количество шпилек в их составе различны.

Нетрудно заметить, что и IRES-элементы, и интрон-экзонные стыки претРНК^{лейцин} *Anabaena* имеют сложную вторичную структуру, состоящую из целого ряда доменов, образованных группами шпилек. Здесь стоит отметить, что для эффективной циклизации кольцевой мРНК важно сохранение вторичной структуры интрон-экзонных стыков. Изменение их конформации негативно влияет на выходы реакции циклизации и, как следствие увеличивает стоимость производства. В то же время, для эффективной трансляции белка в клетках важно сохранение конформации IRES-элемента.

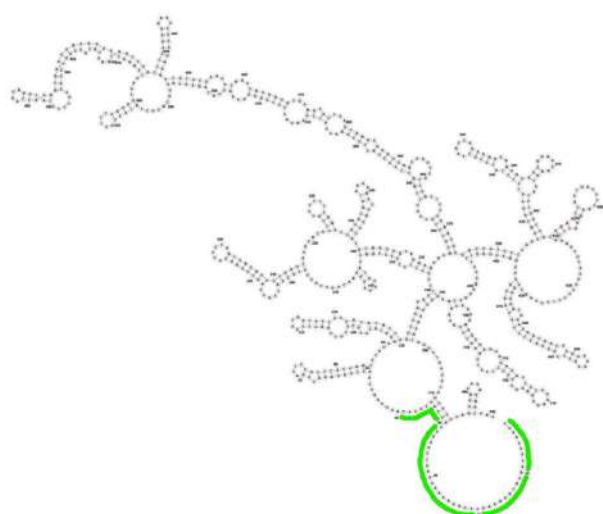
Для разнесения в пространстве этих элементов вектора используются спейсерные последовательности. При этом важно, чтобы они не образовывали вторичных структур ни с интрон-экзонными стыками, ни с IRES-элементом. Выбор оптимальных спейсерных последовательностей оказывает существенное влияние на качество мРНК-векторов.

Согласно литературным данным, оптимальный размер спейсерного участка составляет около 50 нуклеотидных остатков [48]. Однако единого мнения об оптимальных последовательностях спейсеров на данный момент нет. В работе Cheng et. al. было показано, что использование поли(АЦ)-тракта значительно хуже, чем использование сайта для связывания поли(А)-связывающего белка 3, и даже хуже использования случайных 50-нуклеотидов в качестве спейсера. При этом Wesselhoeft и др. показал, что использование поли(АЦ)-тракта показывает лучший результат [315].

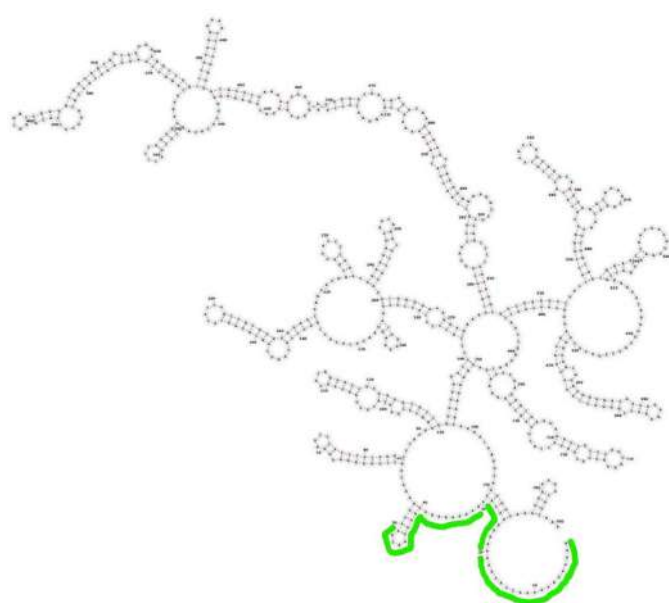
В пользу использования А-богатых спейсеров говорит тот факт, что природные пикорнавирусы также имеют поли(А)-хвост, не смотря на использование кэп-зависимой трансляции. При этом их геном сворачивается в ковалентно незамкнутое кольцо и поли(А)-хвост оказывается около IRES-элемента для привлечения трансляционных факторов [224].

Далее было проведено изучение вторичной структуры комбинаций IRES-элементов вируса Коксаки В3 и риновируса В6 со спейсерными последовательностями. Результаты предсказанной вторичной структуры на основе минимальной свободной энергии приведены на рисунке 5.

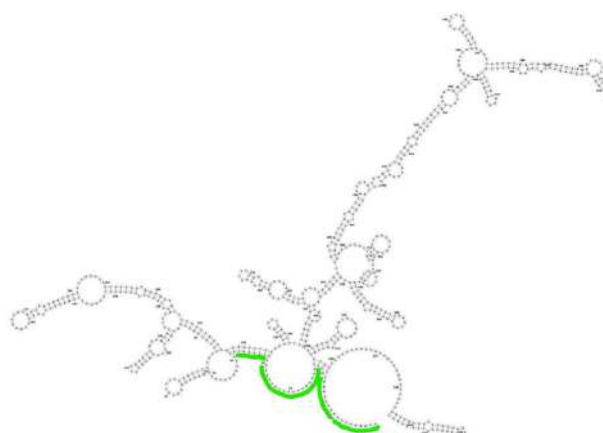
А



Б



В



Г

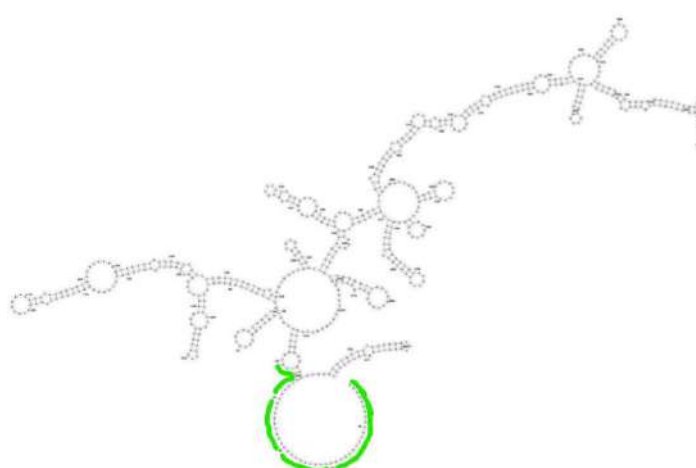


Рис. 5 – Предсказанная вторичная структура IRES-элементов с различными спейсерами, зеленым выделены последовательности 50-нуклеотидных спейсеров (А) – IRES-элемент вируса Коксаки В3 и поли(АЦ)-тракт качестве спейсера, (Б) – IRES-элемент вируса Коксаки В3 и сайт для поли(А)-связывающего белка 3 в качестве спейсера, (В) – IRES-элемент риновируса В6 и поли(АЦ)-тракт качестве спейсера, (Г) – IRES-элемент риновируса В6 и сайт для поли(А)-связывающего белка 3 в качестве спейсера. Расчеты минимальной свободной энергии, выполнены программным обеспечением RNAfold [101].

Мы видим, что при использовании одного и того же спейсера, для различных IRES-элементов наблюдается различная вторичная структура. Так для поли(АЦ)-тракта в комбинации с IRES-элементом вируса Коксаки В3 наблюдается всего 5 оснований, спаренных первым доменом. В то же время при использовании поли(АЦ)-тракта в комбинации с IRES-элементом риновируса В6 их число возрастает до 12. Для сайта распознавания поли(А)-связывающего белка 3 наблюдается обратный эффект, при использовании совместно с IRES-элементом вируса Коксаки В3 наблюдается 9 спаренных оснований, а при использовании совместно с IRES-элементом риновируса В6 только 3 основания.

Следующим этапом работы стало получение ДНК-матриц для синтеза панели кольцевых мРНК-векторов.

3.1.1 ПЛАЗМИДНЫЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ СИНТЕЗА КОЛЬЦЕВОЙ мРНК

В ходе работы была получена панель кольцевых мРНК векторов, её схематическое изображение представлено на рисунке 6. ДНК-матрица для синтеза мРНК имеет следующие важные участки: промотор для ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага Т7, необходимый для синтеза мРНК, интроны циклизации на 5' и 3' конца РНК-вектора, необходимые для кольцевания мРНК, спейсерную

последовательность, обеспечивающую стабильность структуры IRES-элемента, а также сам IRES-элемент и ген интереса.

В данной работе было изучено использование в качестве спейсеров поли(АЦ)-тракта или сайта для посадки поли(А)-связывающего белка 3. В качестве исследуемых сайтов посадки рибосомы использовались IRES-элементы, полученные от риновируса В6 или вируса Коксаки В3. В таблице 4 приведены полученные кольцевые мРНК-векторы.

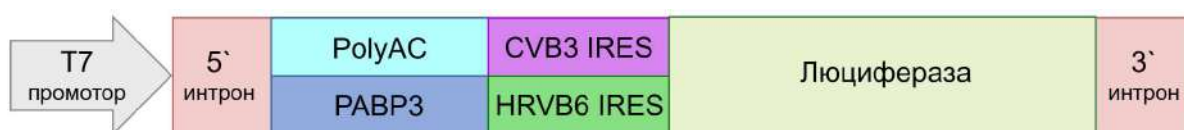


Рисунок 6 – Схематическое изображение панели кольцевых мРНК-векторов. T7 – промотор фага T7, 5'PIE – 5' интрон циклизации Anabaena, PolyAC – Поли(АЦ)-тракт, PABP3 – сайт для поли(А)-связывающего белка, 3 CVB3 IRES – внутренний сайт посадки рибосомы вируса Коксаки В, HRVB6 IRES – внутренний сайт посадки рибосомы Риновируса В6, Fluc – репортерный белок (люцифераза светлячка), 3'PIE – 3' интрон циклизации Anabaena

Таблица 4 – Описание кольцевых мРНК-векторов, входящих в панель

Номер	Название вектора	Спейсер	Внутренний сайт посадки рибосомы
1	CVB3-polyAC	Поли(АЦ)-тракт	Коксаки вирус В3
2	CVB3-PABP3	Сайт для поли(А)-связывающего белка 3	Коксаки вирус В3
3	HRVB6-polyAC	Поли(АЦ)-тракт	Риновирус В6
4	HRVB6-PABP3	Сайт для поли(А)-связывающего белка 3	Риновирус В6

3.1.2 ВЫБОР НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНОГО КОЛЬЦЕВОГО мРНК-ВЕКТОРА

Первым этапом изучения панели кольцевых мРНК векторов являлось сравнение люциферазной активности клеток НЕК293 после трансфекции

соответствующими векторами. Результаты измерения через 18 часов после трансфекции приведены на рисунке 7.

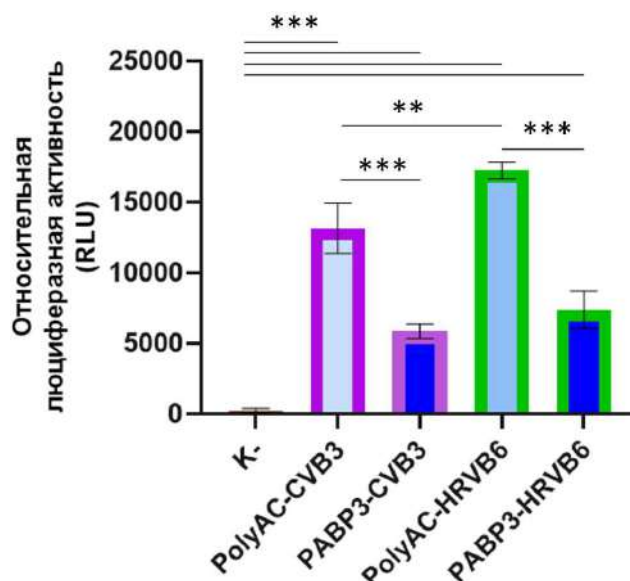


Рисунок 7 – Сравнение люциферазной активности клеток HEK293 через 18 часов после трансфекции различными кольцевыми мРНК векторами. Оценка значимости проводилась методом Манна-Уитни, $n=3$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, ns – незначимо).

Результаты измерения люциферазной активности говорят о том, что использование в качестве спейсера поли(АЦ)-тракта, более чем в два раза повышает уровни продукции целевого белка, в сравнении с линкером PABP3. Также заметно превосходство сайта посадки рибосомы риновируса В6 над таковым от вируса Коксаки В3, независимо от используемого спейсера.

Для дальнейшей работы было выбрано два лучших вектора, содержащих поли(АЦ)-тракт в качестве спейсера и оба типа IRES-элементов.

3.1.3 СРАВНЕНИЕ КОЛЬЦЕВОГО И ЛИНЕЙНОГО МРНК-ВЕКТОРОВ *IN VITRO*

Для всестороннего изучения полученного вектора была исследована кинетика синтеза целевого белка в сравнении с линейным мРНК вектором. Линейный мРНК вектор содержал 5' и 3' нетранслируемые области альфа-глобина,

а также сегментированный поли(А)-хвост, состоящий из 30 и 70 поли(А)-сегментов, разделенных десятинуклеотидным «островом» для повышения стабильности. Кэпирование мРНК осуществлялось реагентом CleanCap, как наиболее эффективным. Так как стабильность линейным мРНК векторов зависит от использования N1-метил псевдоуридина, в эксперименте использовался, как модифицированный, так и немодифицированный вектор.

На первом этапе сравнения линейных и кольцевых мРНК-векторов проводилось изучение кинетики продукции люциферазы *in vitro*. Клетки НЕК293 были трансфицированы линейными и кольцевым мРНК-векторами. Через 15 минут после трансфекции в среду добавлялся Д-люциферин и проводилось измерение люциферазной активности каждый час на протяжении 5 дней. Результаты приведены на рисунке 8, численные значения некоторых временных точек приведены в таблице 5.

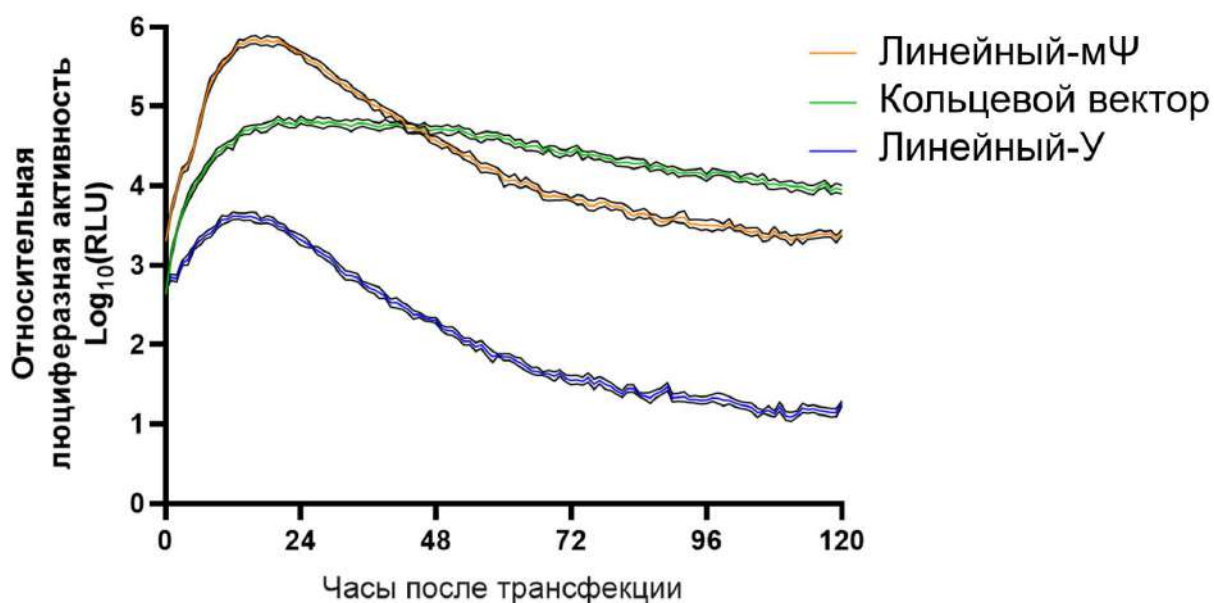


Рисунок 8 – Сравнение кинетики люциферазной активности клеток НЕК293 после трансфекции мРНК векторами. Жирной линией в центре показано среднее значение, тонкие линии ограничивают доверительный интервал 95%. Адаптировано из [300].

Таблица 5 – численные значения люциферазной активности, значение с доверительным интервалом 95%.

Вектор	10 часов	24 часа	48 часов	72 часов	96 часов	120 часов
Линейный-мΨ	340 144.3 ±29 534.5	472 710.2 ±17 678.9	37 323.7 ±3 602.7	6 732.3 ±251.8	3 193.7 ±326.2	2 569.3 ±157.6
Кольцевой	28 538.7 ±2 605.1	68 002.1 ±5 582.4	51 310.4 ±4 404.4	26 724.8 ±2 696.7	12 672.5 ±953.7	8 849.6 ±872.7
Линейный -У	3 735.7 ±401.7	2 075.3 ±244.9	202.9 ±13.5	35.6 ±3.7	20 ±1.7	18.3 ±1

Результаты измерения люциферазной активности показывают, что трансляционная активность нового кольцевого мРНК-вектора достоверно превышает таковую линейного мРНК-вектора, содержащего уридин. Продукция люциферазы после трансфекции линейным мРНК-вектором, содержащим N1-метилпсевдоуридин вектора сравнима с продукцией люциферазы новым кольцевым мРНК-вектором.

Наконец, важно отметить разницу в кинетике между линейными и кольцевым мРНК векторами. Для линейной мРНК пиковые значения люциферазной активности наблюдаются на 18 часов после трансфекции, а затем стремительно снижаются. Пик люциферазной активности после трансфекции кольцевой мРНК приходится на 22 часовую точку, а снижение является более плавным.

Далее было проведено сравнение люциферазной активности *in vivo*. Из гуманных соображений линейный вектор содержащий уридин, был исключен как низкоэффективный.

3.1.4 СРАВНЕНИЕ КОЛЬЦЕВОГО И ЛИНЕЙНОГО МРНК-ВЕКТОРОВ *IN VIVO*

Для данного эксперимента мРНК была упакована в липидные наночастицы. Доза мРНК на мышь составила 10 мкг. По прошествии 10, 24, 48 и 72 часов после введения мРНК мыши были подвергнуты седации, им был введен Д-люциферин. Визуализация измерения люциферазной активности приведена на рисунке 9, численные значения приведены в таблице 6.

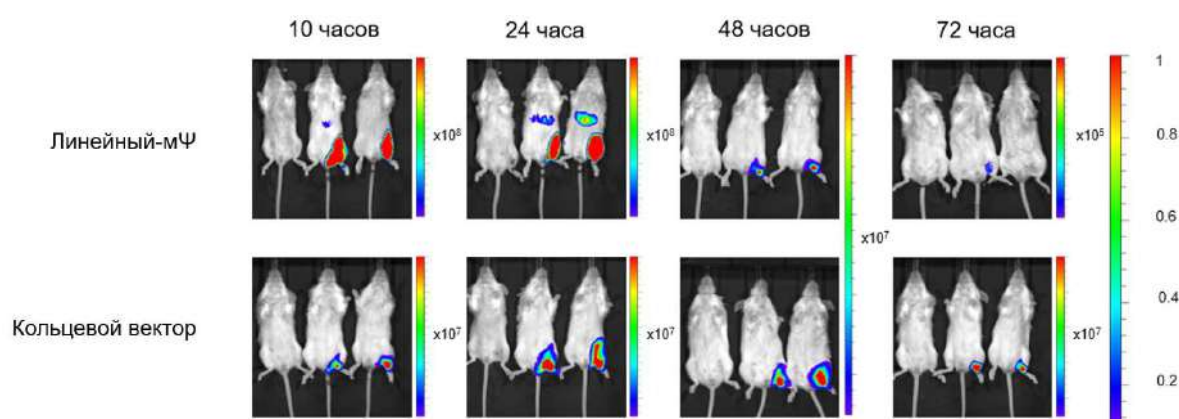


Рисунок 9 – Сравнение *in vivo* люциферазной активности после введения линейного и кольцевого мРНК-векторов, методом прижизненной визуализации биолуминесценции в мышах линии BALB/c. Адаптировано из [300].

Таблица 6 – Численные значения общей светимости лабораторных животных после введения линейного и кольцевого мРНК-векторов.

Вектор	Мышь	Общая светимость [протон/с]			
		10 часов	24 часа	48 часов	72 часа
Линейный-мΨ	1	6.42×10^9	7.62×10^9	5.25×10^7	2.50×10^5
	2	4.19×10^9	5.70×10^9	4.22×10^7	1.31×10^5
	Контрольная	4.73×10^7	8.69×10^7	1.95×10^5	1.07×10^5
Кольцевой	1	6.57×10^7	5.27×10^8	1.47×10^8	7.67×10^7
	2	1.10×10^8	5.75×10^8	2.28×10^8	1.18×10^8
	Контрольная	2.53×10^5	8.25×10^5	3.53×10^5	2.69×10^5

Результаты сравнения трансляционной активности линейного и кольцевого мРНК-вектора коррелируют с результатами *in vitro* эксперимента. По прошествии 10 и 24 часов видны более высокие значения люциферазной активности у мышей, получивших линейный вектор, к 48 часам значения линейной и кольцевой мРНК выравниваются, а по прошествии 72 часов после введения препаратов наблюдается превосходство кольцевой мРНК в уровнях люциферазной активности.

Ввиду того, что первой мРНК-вакциной, широко применяемой в мире, была вакцина против вируса SARS-CoV-2, мы выбрали этот патоген в качестве модельного. Также стоит отметить воспроизводимую модель летальной инфекции и отработанные методики оценки вирусологических показателей при заражении.

Далее было проведено сравнение трансляционной двух кольцевых мРНК-векторов, содержащих в качестве спейсера активности кольцевой и линейной мРНК на примере целевого антигена – S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2.

3.1.5 СРАВНЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ЦЕЛЕВОГО АНТИГЕНА ПОСЛЕ ТРАНСФЕКЦИИ КОЛЬЦЕВЫМИ мРНК-ВЕКТОРАМИ

Было получено два кольцевых мРНК-вектора, кодирующие количества S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2, и содержащие поли(АЦ)-тракт в качестве спейсера, при этом один содержал IRES-элемент риновируса В6 (HRVB6-S), а другой IRES-элемент вируса Коксаки В3 (CVB3-S).

Клетки НЕК-293 были трансфицированы кольцевыми мРНК-векторами. По прошествии 20 часов после трансфекции проводился лизис клеток и измерение количества S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 методом ИФА. Результаты измерения приведены на рисунке 10.

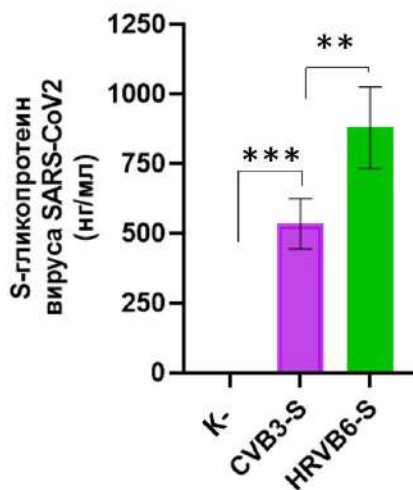


Рисунок 10 – Сравнение продукции S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 клетками HEK293 после трансфекции кольцевыми мРНК-векторами. (n=3, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). Для оценки значимости различий использовался критерий Манна-Уитни.

Производство целевого антигена в после введения кольцевого мРНК-вектора, содержащего IRES-элемент риновируса В6 достоверно превышает производство

после введения кольцевого вектора, содержащего IRES-элемент вируса Коксаки В3.

Для дальнейшей работы был выбран кольцевой мРНК-вектор, IRES-элемент риновируса В6.

3.2 ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ И ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КОЛЬЦЕВОГО мРНК ВЕКТОРА, КОДИРУЮЩЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ S-ГЛИКОПРОТЕИНА ВИРУСА SARS-COV-2

В качестве сравнения использовался линейный мРНК-вектор, полученный ранее в нашем центре. Линейная и кольцевая мРНК была упакована в липидные наночастицы. На рисунке 11 приведена схема эксперимента. На первом этапе проводилась двухкратная иммунизация трансгенных ACE-2 мышей липидными наночастицами, содержащими мРНК в дозе 3 мкг/мышь с интервалом 21 день. По прошествии 21 дня у части мышей проводился отбор крови и измерение титров анти-RBD антител. Другие животные были интраназально заражены вирусом SARS-CoV-2 в дозе 10^5 ТЦД₅₀. Через 4 дня после заражения часть мышей была подвергнута эвтаназии с последующим отбором легких для определения вирусной нагрузки. Остальные животные были под наблюдением на протяжении 28 дней. Результаты определения титров антител в сыворотках иммунизированных животных приведены на рисунке 12А

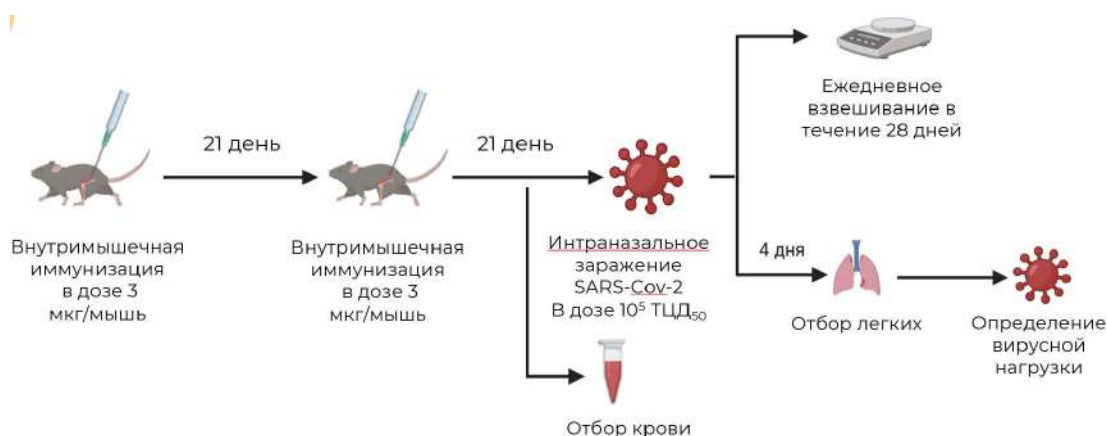


Рисунок 11 – Схема эксперимента по изучению иммуногенности и протективной активности линейных и кольцевых мРНК векторов, кодирующих S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2.

Вирусная нагрузка определялась двумя способами: методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией, а также методом титрования на перmissive клеточной линии Vero E6. Эти результаты приведены на рисунках 12Б и 12В.

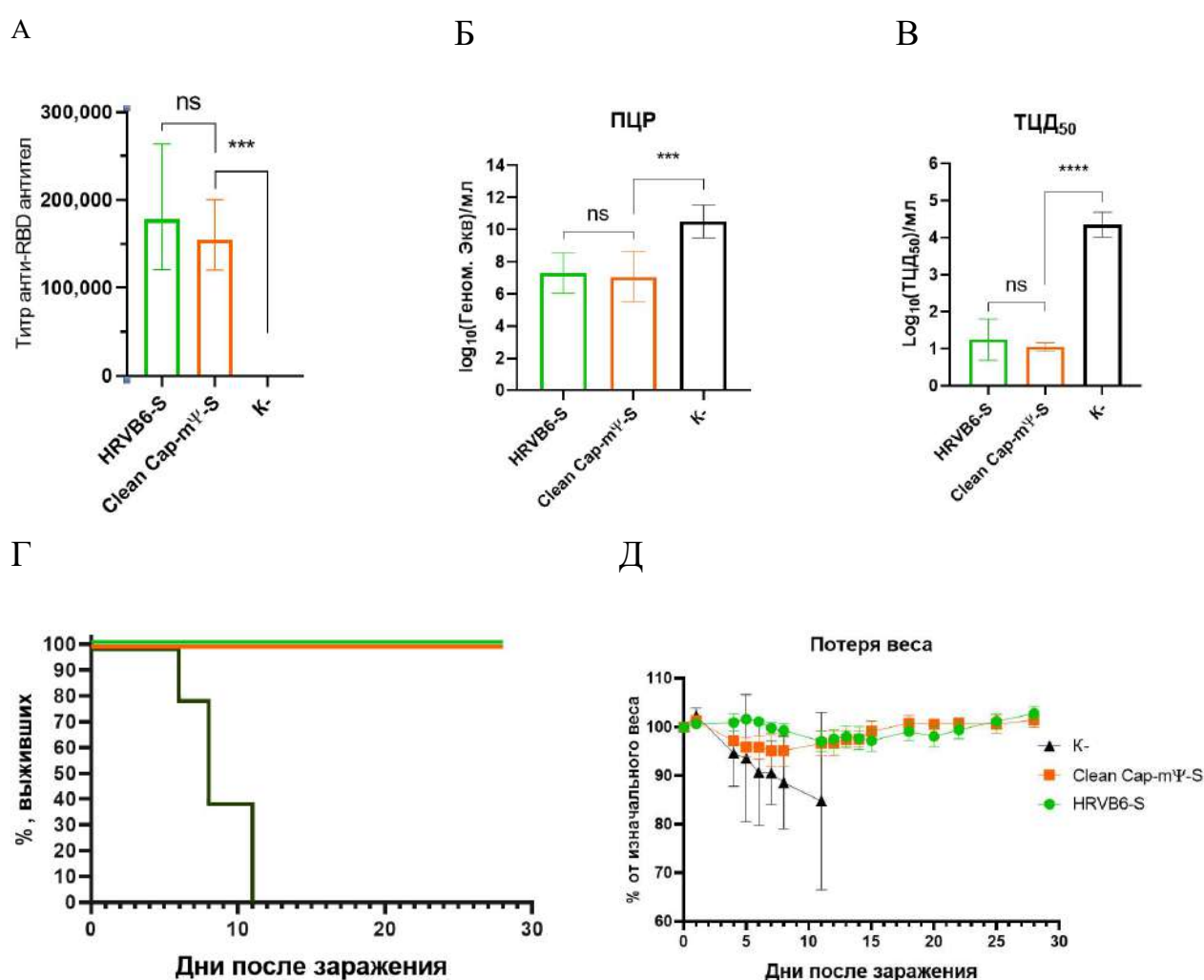


Рисунок 12 – Изучение иммуногенности и протективной активности линейного и кольцевого мРНК-векторов. (А) – сравнение титров антител в сыворотке иммунизированных животных $n=5$. Для оценки значимости различий использовался критерий Манна-Уитни, (Б) – определение вирусной нагрузки в легких зараженных животных методом ПЦР-РВ с обратной транскрипцией,

*n=5. Для оценки значимости различий использовался критерий Манна-Уитни (В) – определение вирусной нагрузки в легких зараженных животных методом титрования по ТЦД₅₀ n=5. Для оценки значимости различий использовался критерий Манна-Уитни (Г) – оценка выживаемости зараженных животных. Сравнение значимости проводилось попарно логранговым критерием Мантела-Кокса n=10, (Д) – измерение потери веса зараженных животных, данные приведены, как среднее значение с доверительным интервалом 95%. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). Адаптировано из [300].*

Новый кольцевой мРНК вектор, несущий ген S-гликопротеина SARS-CoV-2 индуцирует сопоставимый с линейными уровень нейтрализующих антител в сыворотках иммунизированных животных. При этом титры достоверно отличаются от титров невакцинированных мышей.

Оба вектора показывают 100% защиту мышей от летальной инфекции вирусом SARS-CoV-2, в то время как, невакцинированные животные умерли к 11 дню (см. рис. 12Г).

Оба вектора также демонстрируют снижение вирусной нагрузки более чем на $3\log_{10}$, как при измерении методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией, так и при титровании по ТЦД₅₀. При этом достоверной разницы между двумя типами векторов не наблюдается. Снижение веса у вакцинированных животных не превышает 10%, в отличие от контрольных животных (см. рис.12Д).

Таким образом была показана высокая эффективность нового кольцевого мРНК вектора, содержащего сайт посадки рибосомы риновируса В6, как основы для разработки вакцин.

Далее нами было проведено изучение кольцевого мРНК вектора, для создания универсальной вакцины против гриппа А.

3.3 ИЗУЧЕНИЕ КОЛЬЦЕВОГО мРНК-ВЕКТОРА КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА А

В качестве второй модели нами были выбраны вирусы гриппа А. Из-за высокой изменчивости и реассортации возможен переход межвидового барьера. В результате появится штамм, к которому в популяции нет предсуществующего иммунного ответа. В то же время создание вакцины под все существующие варианты, которые потенциально могут перейти межвидовой барьер нереализуемо. Решением этой проблемы является поиск консервативных мишеней, использование которых дает широкий спектр защиты.

Важно отметить первостепенную роль Т-клеточного иммунного ответа и второстепенную роль гуморального при использовании этих антигенов, что было продемонстрировано в работе Chung et al. Поэтому в рамках данной работы мы проводили сравнение Т-клеточного иммунного ответа при использовании линейного и кольцевого мРНК-векторов [52].

В качестве таких мишеней перспективно использовать белки М2 и NP из-за их высокой гомологии между различными типами вируса гриппа.

Белок NP является полностью внутриклеточным, соответственно он оказывается вне досягаемости антител, нацеленных на него. Белок М2 имеет в своем составе эктодомен 1-23, что делает его доступным для узнавания антителами. В то же время в работе Zharikova et. al. была показана возможность получения эскейп мутантов при длительном культивировании вируса с соответствующей сывороткой. Это сводит на нет «универсальность» этого участка. В то же время внутриклеточные участки этого белка остаются неизменными из-за отсутствия давящего отбора [334]. При этом зараженная клетка продолжает демонстрировать на своей поверхности пептидные фрагменты с помощью главного комплекса гистосовместимости I, что позволяет ей быть узнаваемой цитотоксическими Т-клетками. Именно это и выводит клеточный иммунный ответ на первостепенную

роль в предотвращении летального исхода при иммунизации универсальной вакциной против гриппа А [52].

3.3.2 ВЫБОР АНТИГЕНА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ ГРИППА А И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ПРОДУКЦИИ В СОСТАВЕ МРНК ВЕКТОРОВ

Ранее в лаборатории молекулярной биотехнологии НИЦЭМ им. Гамалеи были разработаны последовательности рекомбинантных белков М2 и NP, которые представляют собой выравненные последовательности белков природных изолятов вирусов гриппа А за период времени до 2014 года [297].

Была показана высокая протективная активность аденовирусного вектора, несущего эти белки против широкого спектра вирусов гриппа А разных серотипов: H2N3 (A/BlackDuck/NewJersey/1580/78), H3N2 (A/Aichi/2/68), H5N2 (A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84), H7N2 (A/Chicken/NJ/294508-12/2004) и H9N2 (A/Swine/Hong Kong/9A-1/98) и H1N1 (A/USSR/90/77) [297].

Ввиду того, что данные антигены были получены более 10 лет назад, нами было проведено биоинформатическое исследование их актуальности. Нами были сделаны консенсусные последовательности белков М2 и NP, выделенных из изолятов, полученных от коров и представителей семейства кошачьих в ходе вспышки H5N1 в Техасе в 2025 году. Далее было проведено сравнение этих консенсусных последовательностей с последовательностями антигенов, разработанными ранее, а также с последовательностью модельного вируса гриппа H5N2 (A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84). Результаты идентичности аминокислотных замен приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Сравнение гомологии выбранного рекомбинантного антигена, модельного вируса гриппа А и консенсусных последовательностей изолятов в ходе выделенных в 2025 году в ходы вспышки в Техасе.

	M2NP (рекомб.)	H5N1 (Кош*)	H5N1 (Кор**)	H5N2 A/Duck(Mallard)/ Pennsylvania/10218/84
M2NP (рекомб.)	—	84,54% M2	82,47% M2	83,51% M2
		94,98% NP	94,38% NP	94,98% NP
H5N1 (Кош*)	84,54% M2	—	97,94% M2	93,81% M2
	94,98% NP		99,4% NP	100% NP
H5N1 (Кор**)	82,47% M2	97,94% M2	—	91,75% M2
	94,38% NP	99,4% NP		99,4% NP
H5N2 A/Duck(Mallard)/ Pennsylvania/ 10218/84	83,51% M2	93,81% M2	91,75% M2	—
	94,98% NP	100% NP	99,4% NP	

Кош* — консенсусная последовательность изолятов, полученных от кошачьих в ходе вспышки 2025.

Кор** — консенсусная последовательность изолятов, полученных от молочных коров в ходе вспышки 2025.

Нетрудно заметить, что белок NP обладает большей консервативностью, чем белок M2. В то же время разница между выбранными антигенами, модельным вирусом и циркулирующими штаммами оказалась примерно одинаковой. В этой связи в качестве адекватной модели инфекции, вызванной современным штаммом вируса гриппа А, был выбран штамм A/Duck(Mallard)/ Pennsylvania/10218/84

В ходе работы нами были сконструированы линейный и кольцевой мРНК-векторы, кодирующие рекомбинантные M2 и NP белки, разделенные Р2А-пептидом. Схематическое изображение антигенной конструкции приведено на рисунке 13.



Рисунок 13 – Схематическое изображение используемого антигена. M2 – матриксный белок 2 вируса гриппа, 2A-пептид – сайт разделения белка на две цепи, NP – нуклеопротеин вируса гриппа.

Затем было проведено предсказание распределения рекомбинантных белков в клетке с использованием программы Protter его схематическое изображение приведено на рисунке 14 [211].

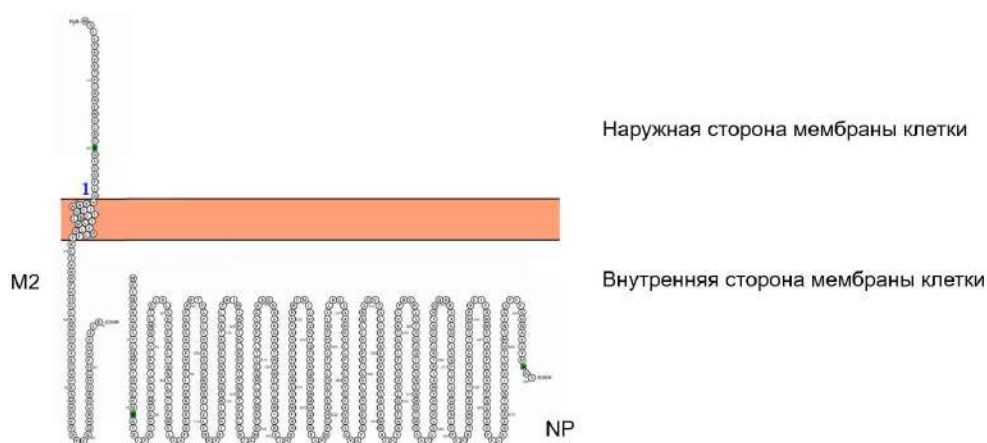


Рисунок 14 – Схематическое распределение антигенов между внутриклеточным, и внеклеточным пространством, а также в мембране. Моделирование выполнено программным обеспечением Protter [211].

Анализ распределения показывает, что рекомбинантный белок M2, также как и его природные аналоги, имеет трансмембранный домен и внеклеточную часть, в то время как белок NP является внутриклеточным.

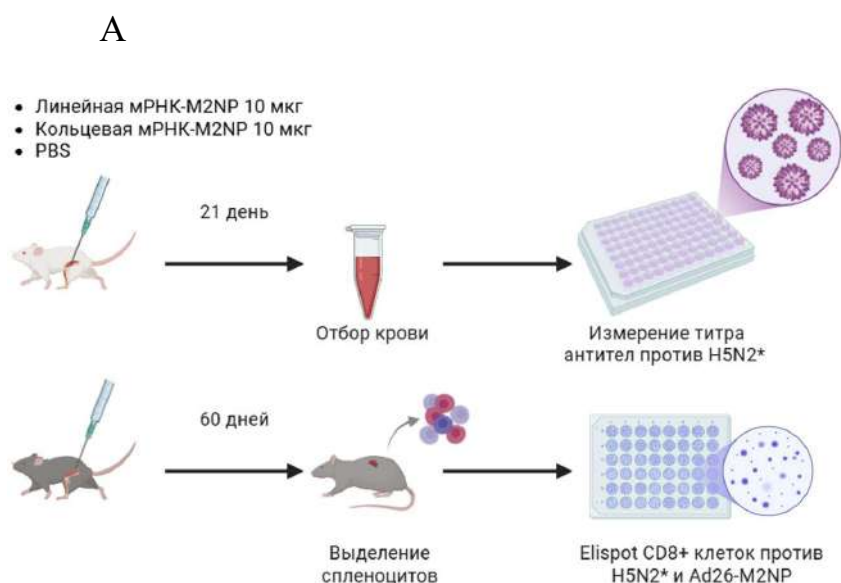
Далее методом вестерн-блот-анализа была подтверждена экспрессия целевых антигенов. Затем проводилось изучение иммуногенности.

3.3.2 СРАВНЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ ЦЕЛЕВОГО АНТИГЕНА, ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИНЕЙНОГО И КОЛЬЦЕВОГО мРНК-ВЕКТОРОВ.

Схема эксперимента приведена на рисунке 15 А. Для изучения гуморального иммунного ответа использовались мыши линии BALB/с, для изучения клеточного иммунного ответа использовались мыши линии C57BL/6

Мыши однократно иммунизировались липидными наночастицами, содержащими линейный или кольцевой мРНК вектор в дозе 10 мкг/мышь. По прошествии 21 дня после иммунизации у мышей BALB/с проводился отбор крови и измерение титров антител против вируса гриппа H5N2 A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/. Результаты измерения титров антител в сыворотках иммунизированных животных приведены на рисунке 15Б

По прошествии 60 дней после иммунизации мыши линии C57BL/6 были подвергнуты эвтаназии с последующим отбором селезенки. Затем из селезенки были выделены CD8⁺ клетки, которые использовались в Elispot-анализе, его результаты приведены на рисунке 15В.



3.3.3 ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КОЛЬЦЕВОГО МРНК ВЕКТОРА, КОДИРУЮЩЕГО КОНСЕРВАТИВНЫЕ АНТИГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА А

Схема эксперимента приведена на рис. 16 А. Мыши двукратно или однократно иммунизировались внутримышечно в дозе 5 мкг/мышь. Интервал между первой и второй иммунизацией был 14 дней. Через 28 дней после первой или единственной иммунизации проводилось интраназальное заражение мышей вирусом гриппа А H5N2 A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/ в дозе 5 ЛД₅₀. Результаты оценки выживаемости и потери веса приведены на рис. 16 Б и 16 В, соответственно .

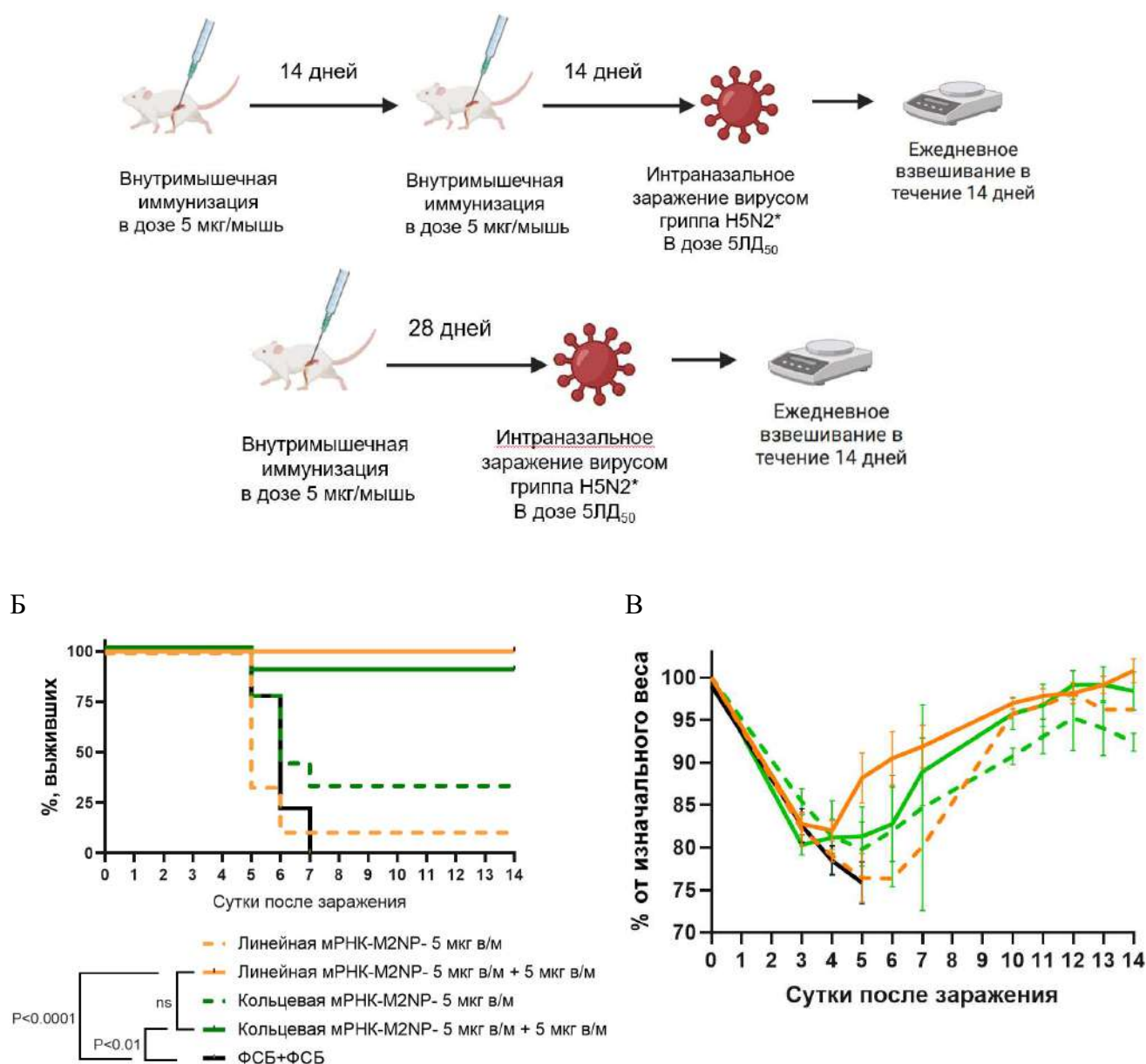


Рисунок 16 – Изучение протективной активности линейного и кольцевого мРНК-векторов, кодирующих консервативные антигены вируса гриппа А. (А) – схема эксперимента, (Б) – Оценка выживаемости вакцинированных животных при заражении вирусом гриппа A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/H5N2 в дозе 5ЛД₅₀, (В) – Оценка убыли веса вакцинированных животных при заражении вирусом гриппа A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/H5N2 в дозе 5ЛД₅₀ (Сравнение выживаемости проводилось попарно логранговым критерием Мантела-Кокса, $n=9$, $* = p < 0.05$, $** = p < 0.01$, $*** = p < 0.001$, ns – незначимо)

3.4 КОЛЬЦЕВЫЕ МРНК-ВЕКТОРЫ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АНТИТОКСИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

Для изучения использования кольцевого мРНК-вектора для пассивной иммунизации было выбрано две модели острой интоксикации: ботулотоксином и токсином А *Clostridium difficile*.

Одной из причин выбора модели интоксикации, а не вирусной инфекции является то, что в процессе репликации вирусы изменяют трансляционные механизмы в зараженных клетках. Помимо этого, иммунные реакции в ответ на инфекцию также затрагивают механизмы трансляции [282]. При этом линейные и кольцевые мРНК-векторы используют различные механизмы трансляции, которые по-разному регулируются в стрессовых условиях [142, 308, 323].

В то же время, использование токсинов позволяет нивелировать влияние вирусных и иммунных факторов на трансляцию, обеспечив при этом воспроизводимую летальную модель.

Более того введение, антител или сывороточных концентратов является «золотым стандартом» при терапии интоксикаций, в отличие от терапий вирусных инфекций.

3.4.1 ПАССИВНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ КОЛЬЦЕВЫМ мРНК-ВЕКТОРОМ, КОДИРУЮЩИМ ТЯЖЕЛОЦЕПОЧЕЧНОЕ АНТИТЕЛО, НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЕ БОТУЛОТОКСИН

На первом этапе нами была получена конструкция для синтеза кольцевой мРНК, кодирующая одноцепочечное антитело B11, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека [96]. Линейный мРНК-вектор, кодирующий антитело B11, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека, был получен ранее в нашем центре [218].

Затем нами была изучена кинетика *in vivo* продукции антитела B11 слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека, при введении линейного и кольцевого мРНК-векторов мышам линии BALB/с. Результаты измерения кинетики приведены на рисунке 17.

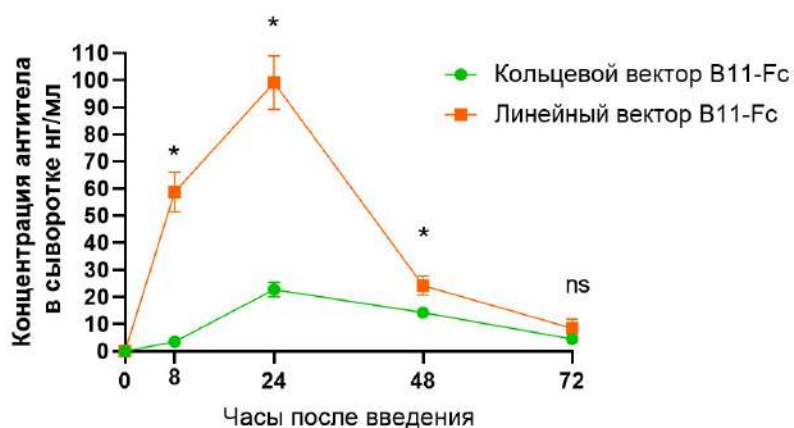


Рисунок 17 – Изучение *in vivo* кинетики продукции однодоменного антитела B11-Fc после введения линейного и кольцевого мРНК-векторов.

Оценка значимости проводилась методом Манна-Уитни, $n=4$, * = $p < 0.05$,

** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, ns – незначимо).

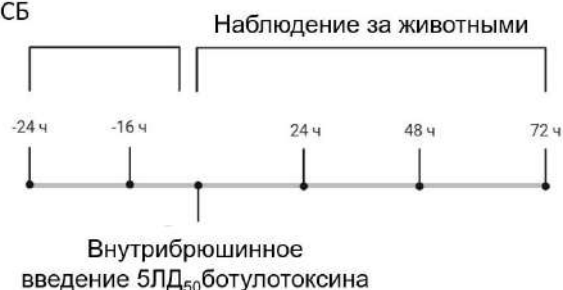
Затем проводилось изучение протективной активности линейного и кольцевых мРНК-векторов, кодирующих рекомбинантное антитело B11, схема эксперимента приведена на рисунке 18А. На первом этапе мышам линии BALB/с за 24 или 16 часов до введения токсина вводили липидные наночастицы, содержащие мРНК-векторы или PBS. Доза на мышь составила 10 мкг мРНК. Затем животным вводили 5ЛД₅₀ ботулотоксина внутривентрально, после чего животные

оставались под наблюдением в течение 72 часов. Результаты изучения выживаемости представлены на рисунках 18 Б и 18 В. Из-за быстрой гибели животных после введения токсина измерение потери веса в экспериментах не проводилось.

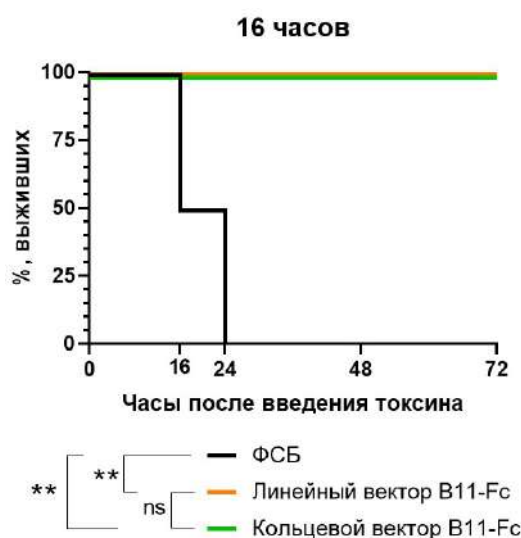
А

Однократное в/м введение
В одну из временных точек

- Линейная мРНК 10 мкг
- Кольцевая мРНК 10 мкг
- ФСБ



Б



В

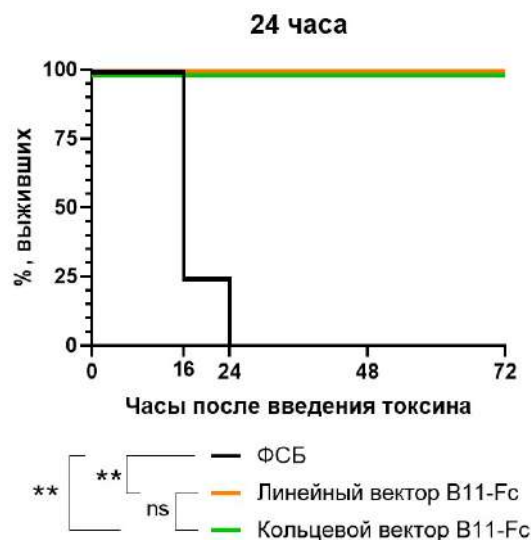


Рисунок 18 – Изучение протективной активности мРНК-векторов, кодирующих однодоменное антитело B11 слитое с Fc-фрагментом IgG1 против летальной дозы ботулотоксина. (А) – Схема введения мРНК векторов и токсина. (Б) – Выживаемость мышей при введении мРНК-вектора за 16 часов

до введения токсина. (В) – Выживаемость мышей при введении мРНК-вектора за 24 часа до введения токсина. (Сравнение выживаемости проводилось попарно логранговым критерием Мантела-Кокса, $n=4$, $* = p < 0.05$, $** = p < 0.01$, $*** = p < 0.001$, ns – незначимо)

Было показано, что линейный и кольцевой мРНК-векторы, кодирующие однодоменное антитело B11, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека, в равной степени обеспечивают 100% защиту мышей от летальной интоксикации ботулотоксином. В то же время кольцевой мРНК вектор, кодирующий однодоменное антитело, не содержащее Fc-фрагмент, не обеспечивает никакой защиты. Схожие данные были получены при использовании самого рекомбинантного антитела B11 модифицированного и немодифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека [96]. Это говорит о критически важной функции Fc-фрагмента для повышения периода полувыведения антитела.

Далее исследование пассивной иммунизации было расширено. В качестве дополнительной модели использовалась модель летальной интоксикации токсином *A Clostridium difficile*.

3.4.2 ПАССИВНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ КОЛЬЦЕВЫМ мРНК-ВЕКТОРОМ, КОДИРУЮЩИМ НАНОАНТИТЕЛО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЕ ТОКСИН A CLOSTRIDIUM DIFFICILE

На первом этапе нами было получены линейный и кольцевой мРНК-векторы кодирующие наноантитело C4.2, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека. Получение конструкций, не содержащих Fc-фрагмент, было признано нецелесообразным из-за их низкой эффективности.

Затем было проведено сравнение относительной продукции тяжелоцепочечного антитела C4.2 в культуре клеток НЕК293 через 18 часов после трансфекции линейным и кольцевым мРНК-векторами, результаты приведены на рисунке 18.

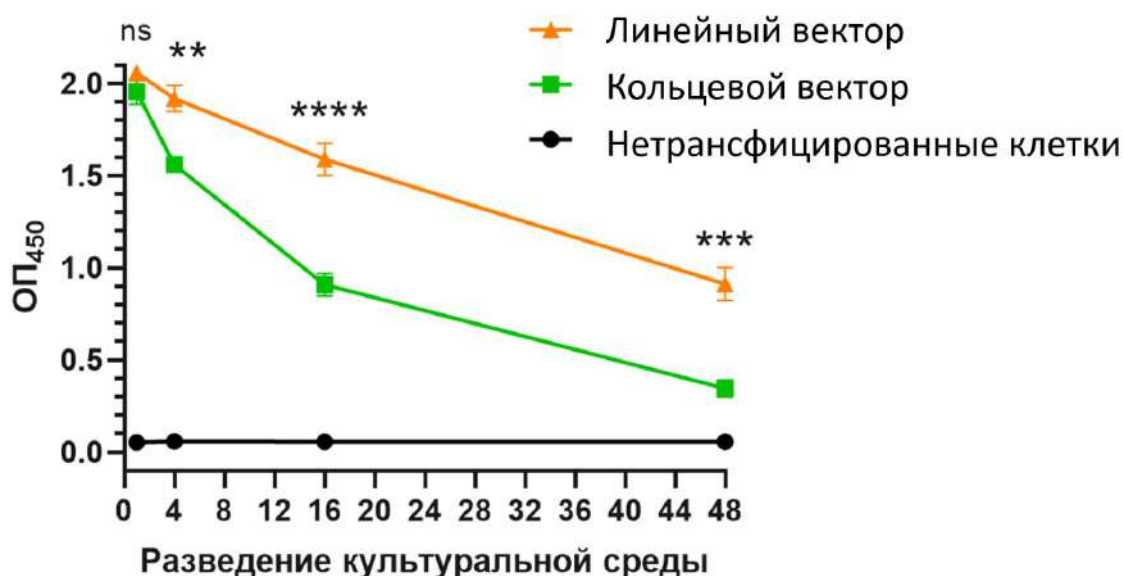


Рисунок 19 – Сравнение относительной продукции тяжелоцепочечного антитела C4.2-Fc клетками HEK293 через 18 часов после трансфекции мРНК-векторами. Для оценки значимости различий использовался критерий Манна-Уитни, $n=4$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, ns – незначимо) Адаптировано из [2].

Было показано, что для данной временной точки линейный мРНК-вектор обеспечивает достоверно большую продукцию рекомбинантного антитела, чем кольцевой.

Затем проводилось изучение протективной активности полученных векторов на модели летальной инфекции токсином A *Clostridium difficile*. Схема эксперимента приведена на рисунке 20А. В данном эксперименте было принято решение изучить выживаемость в более широких интервалах: введение мРНК за 48 часов до введения токсина и введение мРНК за 2 часа до введения токсина. После введения токсина животные были под наблюдением в течение 7 суток. Результаты изучения выживаемости приведены на рисунках 20Б и 20В.

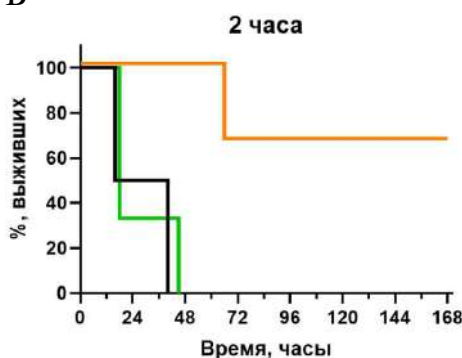
А

Однократное в/м введение
В одну из временных точек

- Линейная мРНК 10 мкг
- Кольцевая мРНК 10 мкг
- ФСБ



Б



В

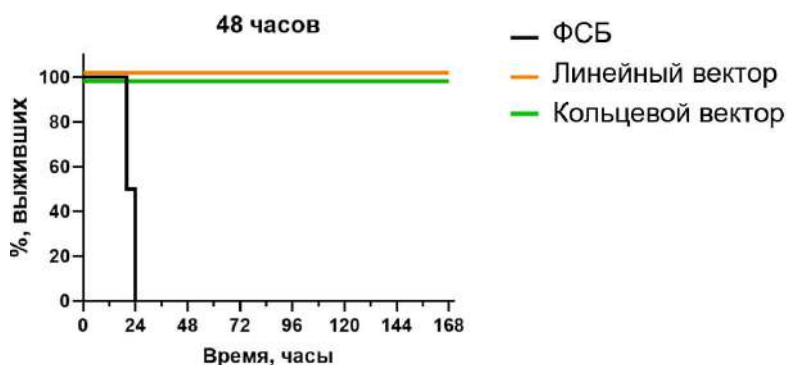


Рисунок 20 – Изучение протективной активности мРНК-векторов, кодирующих тяжелоцепочечное антитело C4.2 слитое с Fc-фрагментом IgG1 против летальной дозы токсина A *Clostridium difficile*. (А) – Схема введения мРНК векторов и токсина. (Б) – Выживаемость мышей при введении мРНК-вектора за 2 часа до введения токсина. (В) – Выживаемость мышей при введении мРНК-вектора за 48 часов до введения токсина. N=3. Адаптировано из [2].

Из полученных данных следует, что оба вектора обеспечивают 100% защиту мышей от летальной интоксикации при введении за 48 часов до введения токсина. При введении за 2 часа до введения токсина линейный вектор демонстрирует неполную защиту, а кольцевой вообще не показывает никакой защиты. Это обусловлено, по-видимому, разницей в кинетике продукции белка линейными и кольцевыми мРНК-векторами. За счет более быстрого начала трансляции целевого белка после введения линейного мРНК-вектора часть животных оказывается

защищена, однако защита не полная. Кольцевой же мРНК-вектор показывает медленный рост трансляции в первые часы, как следствие этого оказывается недостаточно для защиты.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Векторы на основе мРНК в последние годы стали новой технологической платформой для создания медицинских препаратов. мРНК-технологии предложили быстрый, универсальный и безопасный подход в терапии и профилактике как инфекционных, так и опухолевых заболеваний. Несмотря на то, что кольцевые мРНК являются сравнительно новым классом, на их основе был создан ряд кандидатных вакцин и препаратов. Их главным преимуществом перед линейными мРНК-векторами является стабильность: благодаря своей структуре и отсутствию свободных концов они менее доступны для деградации внутриклеточными ферментами.

Кольцевые мРНК обеспечивают трансляцию закодированного белка посредством кэп-независимого механизма, центральным элементом которого служит внутренний сайт посадки рибосомы. Несмотря на значительное разнообразие известных IRES-элементов, функциональная характеристика большинства из них ограничена, а практически применяется только ограниченный набор IRES-элементов. При этом эффективная инициация трансляции возможна только при сохранности вторичной структуры IRES-элемента. В связи с этим критически важно не только выбрать оптимальный IRES, но и спейсерный участок, отделяющий его от интрона циклизации.

В данной работе была разработана панель кольцевых мРНК-векторов, содержащих, как новый IRES-элемент, принадлежащий риновирусу В6, так и широко используемый IRES-элемент вируса Коксаки В3.

Анализ вторичной структуры показал, что несмотря на незначительные отличия в нуклеотидных последовательностях между двумя спейсерами, наблюдается различная вторичная структура. Также было показано, что А-богатые спейсеры не образуют вторичную структуру частями IRES-элемента. Затем была сконструирована панель кольцевых мРНК-векторов, содержащая различные типы IRES-элементов и спейсерных последовательностей.

В данной работе при синтезе кольцевых мРНК векторов не использовался N1-псевдоуридин, так как он негативно сказывается на вторичной структуре IRES-элемента и, как следствие, существенно снижают трансляционную активность [129].

В рамках данной работы также не ставилось целью изучение влияния N6-метиладенозина на эффективность кольцевых мРНК-векторов.

Результаты измерения люциферазной активности после трансфекции клеток HEK293 кольцевыми мРНК- векторами показали, что полученный новый IRES риновируса B6 превосходит широко используемый IRES вируса Коксаки B3. А также было показано, что использование в качестве спейсерной последовательности поли(AC)-тракта существенно повышает уровень трансляционной активности кольцевых мРНК-векторов, независимо от используемого IRES-элемента.

Для дальнейшей работы нами был выбран наиболее эффективный вектор, содержащий поли(AC)-тракт в качестве спейсера и IRES-элемент риновируса B6. Результаты нашей работы также соотносятся с работой Chen R et. al, в которой было показано превосходство IRES-элементов некоторых представителей риновирусов против широко используемого IRES-элемента вируса Коксаки B3 [48].

Сравнение *in vitro* люциферазной активности при использовании кольцевого мРНК вектора с линейными модифицированным и немодифицированным показало существенное превосходство кольцевого мРНК-вектора над линейным немодифицированным вектором. В то же время кольцевой мРНК-вектор обеспечивал сопоставимые уровни продукции люциферазы с линейным вектором модифицированным N1-псевдоуридином. Ввиду наличия такого нежелательного побочного эффекта, как смещение рамки считывания при использовании N1-псевдоуридина [203], использование кольцевых мРНК-векторов является более перспективным.

Полученные данные о низкой трансляционной активности линейных немодифицированных мРНК-векторов коррелируют с работой Kariko et. al, где была показана ведущая роль активации Толл-подобных рецепторов в подавлении трансляции при введении чужеродной немодифицированной мРНК [132].

Отдельно стоит отметить разницу в паттерне кинетики люциферазной активности: для линейного мРНК вектора характерен значительно более резкий подъем экспрессии в первые часы с последующим снижением, в то время как для кольцевой мРНК характерен более плавный рост люциферазной активности и затем существенно более медленное снижение. В итоге, в первые 48 часов наблюдается превосходство линейной мРНК в уровнях синтеза целевого белка, а после 48 часов уже кольцевого. Результаты сравнения прижизненной люциферазной активности на мышах линии BALB/c коррелируют с результатами, полученными *in vitro*.

Сравнение продукции целевого антигена на примере S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 также показало значительное превосходство кольцевого мРНК вектора над линейным немодифицированным и сопоставимые с линейным, содержащим N1-севдоуридин. Эти данные коррелируют с работой Qu et. al, в которой продемонстрировано превосходство кольцевых мРНК-векторов против линейных в уровнях продукции рецептор-связывающего домена S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 [240].

Далее было проведено комплексное сравнение полученного нового кольцевого мРНК-вектора с существующим линейным мРНК-вектором. В качестве моделей для сравнения было выбрано два респираторных вируса с высоким пандемическим потенциалом это вируса SARS-CoV-2 и вирус гриппа H5N2 A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/.

Рассмотрим подробнее результаты, полученные при работе с вирусом SARS-CoV-2. Изучение гуморального иммунного ответа при двухкратной внутримышечной иммунизации показало статистически неотличимые уровни титров антител в сыворотке. Эти данные сходны с результатами, полученными Qu

et. al, который показал, что двухкратная иммунизация в дозе 2,5 мкг/мышь линейным и кольцевым мРНК-векторами дает одинаковую сероконверсию [240]. Также интересно, что статистически значимое превосходство линейного мРНК вектора по уровню экспрессии *in vitro* не привело к значимому увеличению иммуногенности. Это говорит о сложности процесса возникновения иммунного ответа, который нелинейно связан с количеством антигена. Во-первых, для эффективной стимуляции В-клеток может быть достаточно сравнительно небольшого количества целевого антигена, презентируемого фолликулярными дендритными клетками, и дальнейшее повышение дозы не приводит к линейному росту титров. Во-вторых, немодифицированная кольцевая РНК способна активировать RIG-1 и MDA5-зависимые сигнальные пути, выступая в роли встроенного адъюванта, что частично компенсирует более низкую продукцию антигена [316, 50]. Наконец, более продолжительная экспрессия антигена кольцевыми векторами может способствовать более сильному иммунному ответу.

В экспериментах по изучению выживаемости и линейный, и кольцевой мРНК-векторы продемонстрировали 100% защиту иммунизированных животных от летальной инфекции, в то время как невакцинированные животные умерли к 11 дню. При этом убыль веса животных, иммунизированных как линейным, так и кольцевым мРНК-векторами была одинаковой и не превышала 10% от изначального веса.

Измерение вирусной нагрузки в легких зараженных животных также не выявило достоверных различий между группой, вакцинированной кольцевым и линейным мРНК- векторами. Оба вектора показали достоверное снижение вирусной нагрузки не менее чем на $3 \log_{10}$. Это говорит о перспективности полученного кольцевого мРНК вектора, как основы «вакцинного» вектора.

Далее был проведен эксперимент по изучению кольцевой мРНК в качестве основы для создания универсальной вакцины против гриппа А. В отличие от COVID-19, где основным косвенным показателем защиты являются

вируснейтрализующие антитела к S-белку, эффективная вакцинопрофилактика гриппа А требует индукции мощного клеточного иммунного ответа, направленного на консервативные внутренние белки вируса, такие как нуклеопротеин (NP) и матриксный белок М2

Для этого были получены линейный и кольцевой мРНК-векторы, кодирующие консервативные антигены вируса гриппа А. Важно отметить сложность детекции целевых антигенов: из-за того, что их последовательности были получены путем выравнивания белков различных изолятов, они значительно хуже связываются с антителами, специфичными к какому-либо определенному изоляту.

Далее было проведено сравнение гуморального и клеточного иммунных ответов против целевых антигенов при введении линейного и кольцевого мРНК-векторов. Из-за более низкой иммуногенности этих антигенов была использована большая доза, чем в эксперименте с S-гликопротеином вируса SARS-CoV-2. Результаты проведенного эксперимента показали, что линейный мРНК-вектор индуцирует более сильный гуморальный иммунный ответ, в то время как кольцевой – Т-клеточный. Полученные нами данные могут быть объяснены эффективной трансляцией кольцевой мРНК в дендритных клетках, которая затем эффективно презентрует антигенные пептиды цитотоксическим Т-лимфоцитам, как было показано Amaya L et. al [13].

Результаты оценки протективного эффекта показали, что двукратная иммунизация кольцевым мРНК-вектором обеспечивает сопоставимую защиту от летальной инфекции вирусом гриппа А, как и линейный вектор. При этом оба вектора при однократной иммунизации не обеспечивают защиты.

Наконец, для всесторонней характеристики полученного кольцевого мРНК-вектора, он был изучен в качестве платформы для создания средств пассивной иммунизации. Для проверки полученных мРНК векторов было использовано две модели острой интоксикации: ботулотоксином и токсином А *Clostridium difficile*.

Сперва остановимся на модели летальной интоксикации ботулотоксином. Godakova et. al. было показано, что терапевтическое окно для введения антител после введения токсина составляет 3 часа, то есть задолго до появления первых симптомов [96]. При введении антитела позднее протективного эффекта уже не наблюдается. Поэтому в данной работе использовалась схема профилактического введения мРНК-векторов до введения токсина.

На первом этапе была изучена кинетика синтеза рекомбинантного тяжелоцепочечного антитела B11-Fc после внутримышечного введения липидных наночастиц, содержащих линейный или кольцевой мРНК-векторы.

В целом, данные коррелируют с результатами по измерению люциферазной активности: в первые 48 часов наблюдается превосходство трансляционной активности линейного мРНК-вектора, затем этот разрыв сокращается. Здесь также стоит отметить ограниченную чувствительность используемого ИФА-набора, ввиду которой при измерении концентрации рекомбинантного антитела в сыворотках в точках 48 и 72 часа, некоторые значения были ниже уровней детекции, что несколько исказило полученную картину. Изучение протективной активности проводилось по схеме профилактики: мРНК-векторы вводились за 16 или 24 часа до введения токсина. Из полученных данных следует, что при пиковых значениях продукции белка оба вектора обеспечивают 100% защиту от летальной интоксикации.

Далее была изучена протективная активность мРНК-векторов против токсина A *Clostridium difficile*. Для этого эксперимента был расширен интервал изучения: были выбраны точки 2 часа и 48 часов по схеме, описанной выше. Было показано, что при введении мРНК-векторов за 48 часов до введения токсина оба вектора также обеспечивают протективный эффект. В то же время при введении мРНК-векторов за 2 часа до введения токсина кольцевой мРНК-вектор не обеспечивал защиты, а линейный обеспечивал неполную защиту. Это обусловлено разной кинетикой продукции целевого белка в первые часа после введения. Также

некоторую роль в изменении времени начала продукции целевого белка играет использование липидных наночастиц. Тем не менее, на двух моделях летальной интоксикации бактериальными токсинами было показано, что при введении кольцевого мРНК-вектора в интервале 16-48 часов до введения токсинов он обеспечивает 100% защиту от летальной инфекции, сопоставимую с линейным мРНК-вектором.

В целом, важно отметить, что данные об использовании кольцевых мРНК, как платформы для пассивной иммунизации от инфекционных заболеваний и токсинов отсутствуют, в отличие от линейных аналогов [12, 44, 256, 293]. Примером успешного использования кольцевых мРНК для продукции рекомбинантных антител является работа, Liu et. al, где кольцевая мРНК использовалась для экспрессии одноцепочечного вариабельного домена к PD-L1 (scFv-PD-L1) при терапии метастазов HER-2 положительного рака груди. Однако важно отметить разницу в используемых моделях, так в модели, использованной Liu et. al начало падежа животных наблюдалось после 20 дня даже в контрольной группе, в то время как использованные в работе модели острой интоксикации показывают летальность не позднее 48 часов дня после введения токсинов [174].

Также рассматривая эффективность линейных и кольцевых мРНК-векторов, стоит отметить вклад векторных элементов в молярное соотношение векторов. Так при введении 10 мкг линейной и кольцевой мРНК, кодирующих S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2, молярное количество линейного вектора превышает таковое кольцевого примерно на 15% из-за большого размера вирусного антигена, в то время как для конструкций, кодирующих рекомбинантные антитела, это превосходство составляет уже около 40% из-за небольшого размера рекомбинантных антител. При этом в экспериментах использовалось одинаковое количество мРНК в мкг, исходя из дальнейшего практического применения данной платформы, а не их эквимольные соотношения, удобные при теоретическом сравнении.

Еще одной возможной причиной более низкой продукции терапевтического белка может служить недостаточная очистка от линейного предшественника, и как следствие, активация врожденного иммунного ответа. В частности, Wesselhoeft et al. показал, что при очистке кольцевой мРНК только с использованием РНКазы R наблюдается активация RIG-I MDA-5. При очистке же методом высокоэффективной жидкостной хроматографии этого не происходит [316].

Для этих же целей ряд исследователей предлагает включать в состав векторов N6-метиладенозин, который в отличие от N1-метилпсевдоуридина не снижает трансляционную активность IRES-элементов [50]. Однако снижение активации врожденного иммунного ответа играет двоякую роль, которое, с одной стороны, улучшает трансляционные характеристики вектора, а с другой – нивелирует его адъювантные свойства. С этой точки зрения поиск оптимальной технологии очистки для того или иного мРНК-препарата, равно как и модификация вектора являются обширными задачами, которые не ставились в рамках текущей работы.

С практической точки зрения, полученные результаты демонстрируют, что кольцевые мРНК-векторы являются полноценной альтернативой одобренным линейным аналогам в качестве вакцинной платформы. Более того, их применение позволяет полностью отказаться от использования модифицированных нуклеозидов, в частности, N1-метилпсевдоуридина, который приводит к смещению рамки считывания, и как следствие, к синтезу побочных пептидов с неизученным иммуногенным и потенциально аутоиммунным потенциалом [203]. В то же время применение кольцевых мРНК для экстренной пассивной иммунизации имеет некоторые ограничения, связанные с кинетикой продукции целевого белка.

Ввиду перспективности данных, полученных при изучении Т-клеточного иммунного ответа после введения кольцевых мРНК-векторов, в дальнейшем планируется изучить применение полученного вектора при разработке противораковых препаратов. А также изучить, как включение модифицированных нуклеотидов влияет на индукцию Т-клеточного иммунного ответа. Ещё одним

направлением дальнейшей работы является подбор оптимальных методов очистки кольцевых мРНК-векторов для их использования в качестве терапевтической и вакцинной платформ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы на основе интронов циклизации 1 типа была сконструирована панель кольцевых мРНК-векторов, содержащих IRES-элементы вируса Коксаки В3 и риновируса В6, а также различные спейсерные последовательности. Установлено, что комбинация IRES-элемента риновируса В6 с поли(АЦ)-спейсером обеспечивает максимальную трансляционную активность в клетках HEK293.

Сравнительное изучение кинетики люциферазной активности *in vitro* и *in vivo* показало различие в кинетическом паттерне после введения линейного и кольцевого мРНК-векторов. Линейный мРНК-вектор характеризуется более быстрым ростом трансляции в первые часы после введения, а его пиковое значение превышает таковое для кольцевого. При этом к 48 часам их трансляционная активность выравнивается, а далее наблюдается превосходство кольцевого мРНК-вектора.

Далее был получен кольцевой мРНК-вектор, кодирующий S-гликопротеин SARS-CoV-2, который при двухкратной иммунизации обеспечивал 100% защиту трансгенных ACE-2 мышей от летальной инфекции SARS-CoV-2. При этом вирусная нагрузка в легких иммунизированных животных была более чем на 3 log₁₀ ниже, чем у контрольной группы как по данным ПЦР-РВ, так и по титрованию ТЦД₅₀, что не отличается от показателей линейного вектора.

Сравнение гуморального и клеточного иммунного ответа против целевых антигенов, кодируемых кольцевым и линейным мРНК-векторами, проводилось на модели консервативных антигенов вируса гриппа А. Было показано, что линейный вектор обеспечивает достоверно более высокий гуморальный ответ, в то время как кольцевой вектор обеспечивает более сильный Т-клеточный иммунный ответ. При этом оба вектора при двухкратной иммунизации обеспечивают сопоставимый уровень протективной активности.

Кольцевые мРНК-векторы, кодирующие рекомбинантные антитела, показали свою эффективность при пассивной иммунизации. Кольцевой мРНК-вектор, кодирующий тяжелоцепочечное антитело B11-Fc, обеспечил 100% защиту мышей от 5 ЛД₅₀ ботулотоксина при введении за 16 или 24 часа до интоксикации. Кольцевой мРНК-вектор, кодирующий тяжелоцепочечное антитело C4.2-Fc, обеспечил 100% защиту мышей от 5 ЛД₅₀ токсина А *C. difficile* при введении за 48 часов до интоксикации.

В совокупности полученные данные говорят о применимости полученного нового кольцевого мРНК-вектора для широкого применения в различных сферах иммунологии от создания вакцин до средств пассивной иммунизации.

ВЫВОДЫ

1. Был получен новый кольцевой мРНК-вектор, содержащий IRES риновируса В6 и поли(АЦ)-спейсер, который обеспечивает прирост люциферазной активности *in vitro* на 30-300% относительно других комбинаций.
2. Изучение люциферазной активности *in vitro* на клетках HEK293 и *in vivo* на мышах линии Balb/c показало, отличие в кинетике люциферазной активности между линейным и кольцевым мРНК-векторами. В первые 48 часов линейный мРНК-вектор обеспечивает достоверно большую люциферазную активность, а после 48 часов наблюдается превосходство люциферазной активности, обеспеченной кольцевым мРНК-вектором.
3. Двухкратное введение кольцевого мРНК-вектора, несущего ген S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2, обеспечивает 100% защиту трансгенных мышей K18-hACE-2 от заражения летальной дозой вируса 10^5 ТЦД₅₀.
4. CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ против консервативных антигенов вируса гриппа, индуцированный кольцевым мРНК вектором, достоверно превосходит ответ, индуцированный линейным, более чем в два раза.
5. Двухкратное введение кольцевого мРНК-вектора, несущего консервативные антигены вируса гриппа А, обеспечивает 90% защиту мышей от заражения 5 ЛД₅₀ вируса гриппа А
6. Кольцевые мРНК-векторы, кодирующие тяжелоцепочечные антитела B11-Fc и C4.2-Fc, обеспечили 100% защиту мышей при внутрибрюшинном введении 5 ЛД₅₀ ботулотоксина и токсина A *Clostridium difficile* соответственно.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дцРНК – двухцепочечная рибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛД₅₀ – средняя доза вируса, которая вызывает гибель 50 % подопытных животных

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

мΨ – N1-метил-псевдоуридин

ОП_{450нм} – оптическая плотность, измеренная при длине волны 450 нм

оцРНК – одноцепочечная рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТМБ – тетраметилбензидин

ТЦД₅₀ – 50%-ная тканевая цитопатическая доза

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

АСЕ2 – рецепторы ангиотензинпревращающего фермента II типа

Ad-null – репликативно-дефектный аденовирус человека 5 серотипа, не содержащий трансгена

CAR-T – Т-клетки с химерным антигенным рецептором (Chimeric antigen receptor T-cells)

CleanCap – запатентованная технология ко-транскрипционного кэпирования мРНК в ходе *in vitro* транскрипции

CrPV – вирус паралича сверчков (Cricket paralysis virus)

ECMV – вирус энцефаломиокардита (Encephalomyocarditis virus)

FMDV – вирус ящура (Foot-and-mouth disease virus)

HCV – вирус гепатита С (Hepatitis C virus)

IgG – иммуноглобулины класса G

ITAF – IRES-транс-действующие факторы (IRES-trans-acting factors; полнее – Internal ribosome entry site trans-acting factors)

PTB – полипиримидиновый тракт-связывающий белок (polypyrimidine tract-binding protein)

TMEV – вирус энцефаломиелимита мышей Тейлера (Theiler's murine encephalomyelitis virus)

IgG – иммуноглобулины класса G

M2 – матриксный белок 2 вируса гриппа (matrix protein 2 of influenza virus)

MDA-5 – белок, ассоциированный с дифференцировкой меланомы 5 (melanoma differentiation-associated protein 5)

NP – нуклеокапсидный белок вируса гриппа (nucleocapsid protein of influenza virus)

PD-L1 – лиганд запрограммированной клеточной гибели 1 (programmed death-ligand 1)

RIG-I – белок, индуцируемый ретиноевой кислотой (ген I) (retinoic acid-inducible gene I)

PBS – фосфатно-солевой буфер

S – S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2

scFv-PD-L1 – одноцепочечный антигенсвязывающий фрагмент антитела против PD-L1 (single-chain variable fragment of antibody against PD-L1)

SPF – specific-pathogen-free, свободный от конкретных патогенов

TLR3 – Толл-подобный рецептор 3 (Toll-like receptor 3)

TLR7 – Толл-подобный рецептор 7 (Toll-like receptor 7)

TLR8 – Толл-подобный рецептор 8 (Toll-like receptor 8)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атауллаханов, Р. И. Исследование антигенной специфичности Т-клеточных иммунных реакций в ответ на иммунизацию лабораторных мышей рекомбинантным аденовирусным вектором, кодирующим Spike-белок SARS-CoV-2 / Р. И. Атауллаханов, Е. И. Ушакова, А. В. Пичугин [и др.] // Иммунология. — 2024. — Т. 45, № 1. — С. 33–49. — DOI: 10.33029/1816-2134-2024-45-1-33-49.
2. Вахтинский, В. М. Применение мРНК векторов для пассивной иммунизации против токсина A Clostridium difficile / В. М. Вахтинский, И. Л. Тутыхина, А. С. Унгур [и др.] // Иммунология. — 2026. — Т. 47, № 4. — С. 551–560. — DOI: 10.33029/0206-4952-2026-47-4-551-560.
3. A clinical trial to assess whether a self-amplifying ribonucleic acid (saRNA) vaccine against Rabies viruses is safe and induces immune responses : ISRCTN Registry. — Reg. number ISRCTN91975924. — DOI: 10.1186/ISRCTN91975924. — URL: <https://beta.isrctn.com/ISRCTN91975924> (дата обращения: 11.06.2026). — Текст : электронный.
4. \A Single-Center, Open-Label, Single Ascending Dose Study of Exenatide Circular RNA-Lipid Nanoparticle Injection (CR059) in Chinese Subjects With Type 2 Diabetes Mellitus (CR059101) : ClinicalTrials.gov. — Identifier: NCT07347080. — Updated April 6, 2026. — URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT07347080> (дата обращения: 12.05.2026). — Текст : электронный.
5. Abe, N. Rolling Circle Amplification in a Prokaryotic Translation System Using Small Circular RNA / N. Abe, M. Hiroshima, H. Maruyama [et al.] // Angewandte Chemie International Edition. — 2013. — Vol. 52. — P. 7004–7008. — DOI: 10.1002/anie.201302044.
6. Abe, N. Rolling Circle Translation of Circular RNA in Living Human Cells / N. Abe, K. Matsumoto, M. Nishihara [et al.] // Scientific Reports. — 2015. — Vol. 5. — Art. 16435. — DOI: 10.1038/srep16435.

7. Agalarov, S. Ch. Internal translation initiation and eIF4F/ATP-independent scanning of mRNA by eukaryotic ribosomal particles / S. Ch. Agalarov, P. A. Sakharov, D. Kh. Fattakhova [et al.] // *Scientific Reports*. — 2014. — Vol. 4. — Art. 4438. — DOI: 10.1038/srep04438.
8. Al Kaabi, N. Effect of 2 Inactivated SARS-CoV-2 Vaccines on Symptomatic COVID-19 Infection in Adults : A Randomized Clinical Trial / N. Al Kaabi, Y. Zhang, S. Xia [et al.] // *JAMA*. — 2021. — Vol. 326, № 1. — P. 35–45. — DOI: 10.1001/jama.2021.8565.
9. Alameh, M.-G. Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses / M.-G. Alameh, I. Tombácz, E. Bettini [et al.] // *Immunity*. — 2021. — Vol. 54, № 12. — P. 2877–2892.e7. — DOI: 10.1016/j.immuni.2021.11.001.
10. Alameh, M.-G. The benefits of emerging alternatives to PEG for lipid nanoparticle RNA delivery systems / M.-G. Alameh, D. Weissman, G. Tam [et al.] // *Expert Opinion on Drug Delivery*. — 2025. — Vol. 22, № 1. — P. 45–58. — DOI: 10.1080/17425247.2024.2443916.
11. Alberer, M. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults : an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial / M. Alberer, U. Gnad-Vogt, H. S. Hong [et al.] // *The Lancet*. — 2017. — Vol. 390, № 10101. — P. 1511–1520. — DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31665-3.
12. Almeida, J. R. Intramuscular delivery of mRNA-encoded single-chain variable fragments prevents myotoxin II-induced skeletal muscle damage in a preclinical model / J. R. Almeida, C. V. Sørensen, S. Gilabadi [et al.] // *Trends in Biotechnology*. — 2026. — Vol. 44, № 3. — P. 724–744. — DOI: 10.1016/j.tibtech.2025.11.008.
13. Amaya, L. Circular RNA vaccine induces potent T cell responses / L. Amaya, L. Grigoryan, Z. Li [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2023. — Vol. 120, № 20. — Art. e2302191120. — DOI: 10.1073/pnas.2302191120.

14. An Exploratory, Randomized, Double Blind, Dose Ranging Study to Evaluate the Safety and Immunogenicity of TI 0010 Vaccine to Prevent COVID 19 Caused by SARS CoV 2 in Healthy Adults Aged 18 59 Years : ClinicalTrials.gov. — Identifier: NCT06205524. — Updated January 18, 2024. — URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06205524> (дата обращения: 12.05.2026). — Текст : электронный.
15. Andreev, D. E. Differential factor requirement to assemble translation initiation complexes at the alternative start codons of foot-and-mouth disease virus RNA / D. E. Andreev, O. Fernandez-Miragall, J. Ramajo [et al.] // RNA. — 2007. — Vol. 13, № 8. — P. 1366–1374. — DOI: 10.1261/rna.547907.
16. Anywaine, Z. Safety and immunogenicity of a 2-dose heterologous vaccination regimen with Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola vaccines : 12-month data from a phase 1 randomized clinical trial in Uganda and Tanzania / Z. Anywaine, H. Whitworth, P. Kaleebu [et al.] // The Lancet Infectious Diseases. — 2022. — Vol. 22, № 1. — P. 97–109. — DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00224-5.
17. Artenstein, M. S. Control of meningococcal meningitis with meningococcal vaccines / M. S. Artenstein // The Yale Journal of Biology and Medicine. — 1975. — Vol. 48, № 3. — P. 197–200.
18. Atasheva, S. Cytokine Responses to Adenovirus and Adenovirus Vectors / S. Atasheva, D. M. Shayakhmetov // Viruses. — 2022. — Vol. 14, № 5. — Art. 888. — DOI: 10.3390/v14050888.
19. Atchison, R. W. Adenovirus-associated defective virus particles / R. W. Atchison, B. C. Casto, W. M. Hammon // Science. — 1965. — Vol. 149, № 3685. — P. 754–756. — DOI: 10.1126/science.149.3685.754.
20. Azizi, H. Self-amplifying RNAs generated with the modified nucleotides 5-methylcytidine and 5-methyluridine mediate strong expression and immunogenicity in vivo / H. Azizi, T. M. Renner, G. Agbayani [et al.] // NAR Molecular Medicine. — 2024. — Vol. 1, № 2. — Art. ugae004. — DOI: 10.1093/narmme/ugae004.

21. Baden, L. R. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine / L. R. Baden, H. M. El Sahly, B. Essink [et al.] // The New England Journal of Medicine. — 2021. — Vol. 384, № 5. — P. 403–416. — DOI: 10.1056/NEJMoa2035389.
22. Bae, S. H. Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis / S. H. Bae, H. K. Cheong, J. H. Lee [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2001. — Vol. 98. — P. 10602–10607. — DOI: 10.1073/pnas.191280198.
23. Bahl, K. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses / K. Bahl, J. J. Senn, O. Yuzhakov [et al.] // Molecular Therapy. — 2017. — Vol. 25, № 6. — P. 1316–1327. — DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.03.035.
24. Bahmanyar, M. Successful protection of humans exposed to rabies infection : Postexposure treatment with the new human diploid cell rabies vaccine and antirabies serum / M. Bahmanyar, A. Fayaz, S. Nour-Salehi [et al.] // JAMA. — 1976. — Vol. 236, № 24. — P. 2751–2754. — DOI: 10.1001/jama.1976.03270250019017.
25. Bailey, J. M. Structure of the 5' nontranslated region of the coxsackievirus B3 genome : chemical modification and comparative sequence analysis / J. M. Bailey, W. E. Tappich // Journal of Virology. — 2007. — Vol. 81, № 2. — P. 650–668. — DOI: 10.1128/JVI.01327-06.
26. Barbacid, M. Ras genes / M. Barbacid // Annual Review of Biochemistry. — 1987. — Vol. 56. — P. 779–827. — DOI: 10.1146/annurev.bi.56.070187.004023.
27. Barbas, C. F. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces : the gene III site / C. F. Barbas, A. S. Kang, R. A. Lerner, S. J. Benkovic // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1991. — Vol. 88, № 18. — P. 7978–7982. — DOI: 10.1073/pnas.88.18.7978.

28. Behring, E. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren / E. Behring, S. Kitasato // Deutsche Medizinische Wochenschrift. — 1890. — Bd. 16, № 49. — S. 1113–1114.
29. Behring, E. Zur Behandlung der Diphtherie mit Diphtherieheilserum / E. Behring, B. Boer, H. Kossel // Deutsche Medizinische Wochenschrift. — 1893. — Bd. 19, № 16. — S. 389–393.
30. Berkner, K. L. Generation of adenovirus by transfection of plasmids / K. L. Berkner, P. A. Sharp // Nucleic Acids Research. — 1983. — Vol. 11, № 17. — P. 6003–6020. — DOI: 10.1093/nar/11.17.6003.
31. Bérouti, M. Pseudouridine RNA avoids immune detection through impaired endolysosomal processing and TLR engagement / M. Bérouti, M. Wagner, W. Greulich [et al.] // Cell. — 2025. — Vol. 188, № 18. — P. 4880–4895.e15. — DOI: 10.1016/j.cell.2025.05.032.
32. Black, S. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children / S. Black, H. Shinefield, B. Fireman [et al.] // The Pediatric Infectious Disease Journal. — 2000. — Vol. 19, № 3. — P. 187–195. — DOI: 10.1097/00006454-200003000-00003.
33. Brenner, S. An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis / S. Brenner, F. Jacob, M. Meselson // Nature. — 1961. — Vol. 190. — P. 576–581. — DOI: 10.1038/190576a0.
34. Bulcha, J. T. Viral vector platforms within the gene therapy landscape / J. T. Bulcha, Y. Wang, H. Ma [et al.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. — 2021. — Vol. 6, № 1. — Art. 53. — DOI: 10.1038/s41392-021-00487-6.
35. Burmistrova, D. A. Genetic Passive Immunization with Adenoviral Vector Expressing Chimeric Nanobody-Fc Molecules as Therapy for Genital Infection Caused by Mycoplasma hominis / D. A. Burmistrova, S. V. Tillib, D. V. Shcheblyakov [et al.] // PLOS ONE. — 2016. — Vol. 11, № 3. — Art. e0150958. — DOI: 10.1371/journal.pone.0150958.
36. Buynak, E. B. Live Attenuated Mumps Virus Vaccine. 1. Vaccine Development / E. B. Buynak, M. R. Hilleman // Proceedings of the Society for

- Experimental Biology and Medicine. — 1966. — Vol. 123, № 3. — P. 768–775.
— DOI: 10.3181/00379727-123-31599.
37. Calmette, A. Contribution à l'étude du bacille tuberculeux bilié / A. Calmette [et al.] // Annales de l'Institut Pasteur. — 1921. — Vol. 35. — P. 561–570.
38. Carreño, J. M. mRNA-1273 but not BNT162b2 induces antibodies against polyethylene glycol (PEG) contained in mRNA-based vaccine formulations / J. M. Carreño, G. Singh, J. Tcheou [et al.] // Vaccine. — 2022. — Vol. 40, № 42. — P. 6114–6124. — DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.08.024.
39. Case, J. B. Neutralizing antibody and soluble ACE2 inhibition of a replication-competent VSV-SARS-CoV-2 and a clinical isolate of SARS-CoV-2 / J. B. Case, P. W. Rothlauf, R. E. Chen [et al.] // Cell Host & Microbe. — 2020. — Vol. 28, № 3. — P. 475–485.e5. — DOI: 10.1016/j.chom.2020.06.021.
40. Castaño, D. Distinct components of mRNA vaccines cooperate to instruct efficient germinal center responses / D. Castaño, E. Bettini, B. Kumar [et al.] // Cell. — 2025. — Vol. 188, № 26. — P. 7461–7480.e23. — DOI: 10.1016/j.cell.2025.09.019.
41. Chamberlain, K. Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids / K. Chamberlain, J. M. Riyad, T. Weber // Human Gene Therapy Methods. — 2016. — Vol. 27, № 1. — P. 1–12. — DOI: 10.1089/hgtb.2015.140.
42. Chang, A. Y. Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation / A. Y. Chang, V. Chau, J. A. Landas, Y. Pang // JEMI Methods. — 2017. — Vol. 1. — P. 22–25.
43. Chaudhary, N. Amine headgroups in ionizable lipids drive immune responses to lipid nanoparticles by binding to the receptors TLR4 and CD1d / N. Chaudhary [et al.] // Nature Biomedical Engineering. — 2024. — Vol. 8. — P. 1483–1498. — DOI: 10.1038/s41551-024-01256-w.
44. Chen, B. A Single Dose of Anti-HBsAg Antibody-Encoding mRNA-LNPs Suppressed HBsAg Expression : a Potential Cure of Chronic Hepatitis B Virus

- Infection / B. Chen, Y. Chen, J. Li [et al.] // mBio. — 2022. — Vol. 13. — Art. e01612-22. — DOI: 10.1128/mbio.01612-22.
45. Chen, C.-Y. Initiation of Protein Synthesis by the Eukaryotic Translational Apparatus on Circular RNAs / C.-Y. Chen, P. Sarnow // Science. — 1995. — Vol. 268. — P. 415–417. — DOI: 10.1126/science.7536344.
46. Chen, H. Branched chemically modified poly(A) tails enhance the translation capacity of mRNA / H. Chen, D. Liu, J. Guo, A. Aditham // Nature Biotechnology. — 2024. — Vol. 43, № 2. — P. 194–203. — DOI: 10.1038/s41587-024-02177-4.
47. Chen, H. Chemical and topological design of multicapped mRNA and capped circular RNA to augment translation / H. Chen [et al.] // Nature Biotechnology. — 2025. — Vol. 43, № 7. — P. 1128–1143. — DOI: 10.1038/s41587-024-02361-6.
48. Chen, R. Engineering circular RNA for enhanced protein production / R. Chen, S. K. Wang, J. A. Belk [et al.] // Nature Biotechnology. — 2023. — Vol. 41, № 2. — P. 262–272. — DOI: 10.1038/s41587-022-01393-0.
49. Chen, Y. Functionalized selenium nanoparticles for targeted siRNA delivery to melanoma cells / Y. Chen, T. Liu, L. Yu [et al.] // International Journal of Nanomedicine. — 2020. — Vol. 15. — P. 3015–3027. — DOI: 10.2147/IJN.S241292.
50. Chen, Y. G. N6-Methyladenosine Modification Controls Circular RNA Immunity / Y. G. Chen, R. Chen, S. Ahmad [et al.] // Molecular Cell. — 2019. — Vol. 76. — P. 96–109. — DOI: 10.1016/j.molcel.2019.07.016.
51. Chen, Y. G. Sensing Self and Foreign Circular RNAs by Intron Identity / Y. G. Chen, M. V. Kim, X. Chen [et al.] // Molecular Cell. — 2017. — Vol. 67, № 2. — P. 228–238.e5. — DOI: 10.1016/j.molcel.2017.05.022.
52. Chung, H. A «Prime and Deploy» Strategy for Universal Influenza Vaccine Targeting Nucleoprotein Induces Lung-Resident Memory CD8 T cells / H. Chung, E. A. Kim, J. Chang // Immune Network. — 2021. — Vol. 21, № 4. — Art. e28. — DOI: 10.4110/in.2021.21.e28.

53. CirCode's HM2003 Injection Achieves Double Milestones : FDA IND Clearance and RPDD Designation : press release / CirCode Biomed. — Issued March 17, 2026. — URL: <https://www.circodebio.cn/news/> (дата обращения: 12.05.2026). — Текст : электронный.
54. Cohn, E. J. The Properties and Functions of the Plasma Proteins, with a Consideration of the Methods for their Separation and Purification / E. J. Cohn // Chemical Reviews. — 1941. — Vol. 28, № 2. — P. 395–417. — DOI: 10.1021/cr60090a005.
55. Cullis, P. R. The 60-year evolution of lipid nanoparticles for nucleic acid delivery / P. R. Cullis, P. L. Felgner // Nature Reviews Drug Discovery. — 2024. — Vol. 23. — P. 709–722. — DOI: 10.1038/s41573-024-01005-3.
56. Cui, Y. From Design to Clinical Use : mRNA Vaccines for Infectious Diseases and Cancer / Y. Cui, Z. Liang, H. Cong // Vaccines. — 2026. — Vol. 14, № 3. — Art. 202. — DOI: 10.3390/vaccines14030202.
57. Cyster, J. G. 25-Hydroxycholesterols in innate and adaptive immunity / J. G. Cyster, E. V. Dang, A. Reboldi, T. S. Yi // Nature Reviews Immunology. — 2014. — Vol. 14. — P. 731–743. — DOI: 10.1038/nri3755.
58. Baird, S. D. Searching for IRES / S. D. Baird, M. Turcotte, R. G. Korneluk, M. Holcik // RNA. — 2006. — Vol. 12, № 10. — P. 1755–1785. — DOI: 10.1261/rna.157806.
59. Dahm, G. C. The 5' Cap Epitranscriptome and Beyond : Natural and Engineered 5' Cap Modifications for Optimizing mRNA Therapeutics and Functional Studies / G. C. Dahm [et al.] // ChemMedChem. — 2026. — Vol. 21, № 2. — Art. e202500826. — DOI: 10.1002/cmdc.202500826.
60. Danel, C. C. Randomized Trial of Vaccines for Zaire Ebola Virus Disease / C. C. Danel, M. J. G. McLean, P. S. S. Diallo [et al.] // The New England Journal of Medicine. — 2022. — Vol. 387, № 26. — P. 2411–2424. — DOI: 10.1056/NEJMoa2200072.

61. Davé, U. P. AAV Joins the Rank of Genotoxic Vectors / U. P. Davé, K. Cornetta // *Molecular Therapy*. — 2021. — Vol. 29, № 2. — P. 418–419. — DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.12.023.
62. Davis, N. L. Infectious RNA transcribed from stably cloned cDNA of Venezuelan equine encephalitis virus / N. L. Davis, L. V. Willis, J. F. Smith [et al.] // *Virology*. — 1989. — Vol. 171, № 1. — P. 189–204. — DOI: 10.1016/0042-6822(89)90532-3.
63. Derkaev, A. A. rAAV expressing recombinant neutralizing antibody for the botulinum neurotoxin type A prophylaxis / A. A. Derkaev, E. I. Ryabova, I. B. Esmagambetov [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. — 2022. — Vol. 13. — Art. 960937. — DOI: 10.3389/fmicb.2022.960937.
64. Dewi, N. W. E. S. Pseudouridine and N1-methylpseudouridine in mRNA vaccines modulate retinoic acid inducible gene I (RIG-I) and toll-like receptors (TLR) activation / N. W. E. S. Dewi, F. Khairunnisa, N. Cahyawati [et al.] // *Meditory: The Journal of Medical Laboratory*. — 2025. — Vol. 13, № 2. — P. 235–246. — DOI: 10.33992/meditory.v13i2.4781.
65. Dias, R. A. Towards a Comprehensive Definition of Pandemics and Strategies for Prevention: A Historical Review and Future Perspectives / R. A. Dias // *Microorganisms*. — 2024. — Vol. 12. — Art. 1802. — DOI: 10.3390/microorganisms12091802.
66. Dolzhikova, I. V. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia / I. V. Dolzhikova, O. V. Zubkova, A. I. Tikhvatulin [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. — 2017. — Vol. 13, № 3. — P. 613–620. — DOI: 10.1080/21645515.2016.1238535.
67. Drugs Products Database (DPD) : official registry / Health Canada ; Government of Canada. — URL: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/drug-products/drug-product-database.html> (дата обращения: 11.06.2026). — Текст : электронный.

68. Du, S. Synthetic Strategies for Linear and Circular RNA / S. Du, Y. Zhu // SynBio. — 2026. — Vol. 4, № 1. — Art. 4. — DOI: 10.3390/synbio4010004.
69. Duke, G. M. Cloning and synthesis of infectious cardiovirus RNAs containing short, discrete poly(C) tracts / G. M. Duke, A. C. Palmenberg // Journal of Virology. — 1989. — Vol. 63, № 4. — P. 1822–1826. — DOI: 10.1128/JVI.63.4.1822-1826.1989.
70. Dunkle, L. M. Efficacy and Safety of NVX-CoV2373 in Adults in the United States and Mexico / L. M. Dunkle, K. L. Kotloff, C. L. Gay [et al.] // The New England Journal of Medicine. — 2022. — Vol. 386, № 6. — P. 531–543. — DOI: 10.1056/NEJMoa2116185.
71. Dunkle, L. M. Efficacy of Recombinant Influenza Vaccine in Adults 50 Years of Age or Older / L. M. Dunkle, R. Izikson, P. Patriarca [et al.] // The New England Journal of Medicine. — 2017. — Vol. 376, № 25. — P. 2427–2436. — DOI: 10.1056/NEJMoa1608862.
72. Duque, H. Phenotypic characterization of three phylogenetically conserved stem-loop motifs in the mengovirus 3' untranslated region / H. Duque, A. C. Palmenberg // Journal of Virology. — 2001. — Vol. 75, № 7. — P. 3111–3120. — DOI: 10.1128/JVI.75.7.3111-3120.2001.
73. Durrant, L. G. Safety and Immunogenicity of Scancell's SCIB1 DNA Vaccine in Advanced Melanoma Patients: A Phase 1/2 Cohort Analysis / L. G. Durrant, S. I. Parsons, V. A. Brentville [et al.] // Journal of Clinical Oncology. — 2024. — Vol. 42, № 15_suppl. — Art. 9520. — DOI: 10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.9535.
74. Bryant, K. A. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine / K. A. Bryant, S. L. Block, S. A. Baker [et al.] ; PCV13 Infant Study Group // Pediatrics. — 2010. — Vol. 125, № 5. — P. 866–875. — DOI: 10.1542/peds.2009-3027.
75. Ella, R. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: a double-blind, randomised, phase 1 trial / R. Ella, K. M. Vadrevu, H.

- Jogdand [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. — 2021. — Vol. 21, № 5. — P. 637–646. — DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30942-7.
76. Enders, J. F. Studies on an Attenuated Measles-Virus Vaccine. I. Development and Preparation of the Vaccine: Technics for Assay of Effects of Vaccination / J. F. Enders, S. L. Katz, M. V. Milovanovic, A. Holloway // *The New England Journal of Medicine*. — 1960. — Vol. 263, № 4. — P. 153–159. — DOI: 10.1056/NEJM196007282630401.
77. Erasmus, J. H. Intramuscular Delivery of Replicon RNA Encoding ZIKV-117 Human Monoclonal Antibody Protects against Zika Virus Infection / J. H. Erasmus, J. Archer, J. Fuerte-Stone [et al.] // *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development*. — 2020. — Vol. 18. — P. 402–414. — DOI: 10.1016/j.omtm.2020.06.011.
78. Eskola, J. Efficacy of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in infancy / J. Eskola, H. Peltola, A. K. Takala [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. — 1987. — Vol. 317, № 12. — P. 717–722. — DOI: 10.1056/NEJM198709173171201.
79. Evengård, B. Transfer of infection by blood and blood products / B. Evengård // *Journal of Internal Medicine*. — 1996. — Vol. 240, № 5. — P. 239–246. — DOI: 10.1046/j.1365-2796.1996.27879000.x. (Примечание: DOI требует уточнения по первоисточнику)
80. Fan, X. Pervasive translation of circular RNAs driven by short IRES-like elements / X. Fan, Y. Yang, C. Chen, Z. Wang // *Nature Communications*. — 2022. — Vol. 13. — Art. 3751. — DOI: 10.1038/s41467-022-31327-y.
81. Farrugia, A. The Evolution of the Safety of Plasma Products from Pathogen Transmission — A Continuing Narrative / A. Farrugia // *Pathogens*. — 2023. — Vol. 12, № 2. — Art. 318. — DOI: 10.3390/pathogens12020318.
82. Fernández, I. S. Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome / I. S. Fernández, X. C. Bai, G. Murshudov [et al.] // *Cell*. — 2014. — Vol. 157, № 4. — P. 823–831. — DOI: 10.1016/j.cell.2014.04.015.

83. First-in-Human Pilot Study of Epicardial Circular RNA-HM2002 Injection in CABG for Ischemic Heart Failure : ClinicalTrials.gov. — Identifier: NCT06621576. — Updated May 26, 2025. — URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06621576> (дата обращения: 12.05.2026). — Текст : электронный.
84. Folegatti, P. M. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial / P. M. Folegatti, K. J. Ewer, P. K. Aley [et al.] // The Lancet. — 2020. — Vol. 396, № 10249. — P. 467–478. — DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31604-4.
85. Ford, E. Synthesis of circular RNA in bacteria and yeast using RNA cyclase ribozymes derived from a group I intron of phage T4 / E. Ford, M. Ares Jr. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1994. — Vol. 91, № 8. — P. 3117–3121. — DOI: 10.1073/pnas.91.8.3117.
86. Francis, T. Jr. Protective effect of vaccination against induced influenza A / T. Francis Jr., J. E. Salk, H. E. Pearson, P. N. Brown // The Journal of Clinical Investigation. — 1945. — Vol. 24, № 4. — P. 536–546. — DOI: 10.1172/JCI101633.
87. Fromm, H. Intracellular trafficking and metabolic fate of selenium nanoparticles used for nucleic acid delivery / H. Fromm, M. Singh [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. — 2024. — Vol. 208. — Art. 115280. — DOI: 10.1016/j.addr.2024.115280. (Примечание: DOI требует уточнения по первоисточнику)
88. Fu, S. Anti-PEG Antibodies and Their Biological Impact on PEGylated Drugs: Challenges and Strategies for Optimization / S. Fu, X. Zhu, F. Huang, X. Chen // Pharmaceutics. — 2025. — Vol. 17, № 8. — Art. 1074. — DOI: 10.3390/pharmaceutics17081074.
89. Fukuchi, K. Internal cap-initiated translation for efficient protein production from circular mRNA / K. Fukuchi, Y. Nakashima, N. Abe [et al.] // Nature

- Biotechnology. — 2026. — Vol. 44, № 1. — P. 120–132. — DOI: 10.1038/s41587-025-02561-8.
90. Furuichi, Y. A blocked structure at the 5' terminus of mRNA from cytoplasmic polyhedrosis virus / Y. Furuichi, K. Miura // *Nature*. — 1975. — Vol. 253, № 5490. — P. 374–375. — DOI: 10.1038/253374a0.
91. Fynan, E. F. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations / E. F. Fynan, R. G. Webster, D. H. Fuller [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1993. — Vol. 90, № 24. — P. 11478–11482. — DOI: 10.1073/pnas.90.24.11478.
92. Geall, A. J. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines / A. J. Geall, A. Verma, G. R. Otten [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2012. — Vol. 109, № 36. — P. 14604–14609. — DOI: 10.1073/pnas.1209367109.
93. Global excess deaths associated with COVID-19 (modelled estimates) : World Health Organization. — Published 5 May 2022. — URL: <https://www.who.int/data/stories/global-excess-deaths-associated-with-covid-19-modelled-estimates> (дата обращения: 20.06.2026). — Текст : электронный.
94. Gluzman, Y. Helper-Free Adenovirus Type 5 Vectors / Y. Gluzman, H. Reichl, D. Solnick // *Eukaryotic Viral Vectors* / ed. by Y. Gluzman. — Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. — P. 187–192.
95. Godakova, S. A. Camelid VHHs Fused to Human Fc Fragments Provide Long Term Protection Against Botulinum Neurotoxin A in Mice / S. A. Godakova, A. N. Noskov, I. D. Vinogradova [et al.] // *Toxins*. — 2019. — Vol. 11, № 8. — Art. 464. — DOI: 10.3390/toxins11080464.
96. Goldstein, G. Overview of the development of Orthoclone OKT3: historic perspective / G. Goldstein // *Nephron*. — 1987. — Vol. 46, Suppl. 1. — P. 5–11. — DOI: 10.1159/000184428.
97. Gosert, R. Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and

- flaviviral internal ribosome entry sites in vivo / R. Gosert, K. H. Chang, R. Rijnbrand [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. — 2000. — Vol. 20, № 5. — P. 1583–1595. — DOI: 10.1128/MCB.20.5.1583-1595.2000.
98. Graham, F. L. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5 / F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, R. Nairn // *Journal of General Virology*. — 1977. — Vol. 36, № 1. — P. 59–72. — DOI: 10.1099/0022-1317-36-1-59.
 99. Gross, L. The IRES5'UTR of the dicistrovirus cricket paralysis virus is a type III IRES containing an essential pseudoknot structure / L. Gross, Q. Vicens, E. Einhorn [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2017. — Vol. 45, № 15. — P. 8993–9004. — DOI: 10.1093/nar/gkx622.
 100. Gruber, A. R. The Vienna RNA Websuite / A. R. Gruber, R. Lorenz, S. H. Bernhart [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2008. — Vol. 36, Suppl. 2. — P. W70–W74. — DOI: 10.1093/nar/gkn188.
 101. Guerrini, G. Monitoring anti-PEG antibodies level upon repeated lipid nanoparticle-based COVID-19 vaccine administration / G. Guerrini, S. Gioria, A. V. Sauer [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — Vol. 23, № 16. — Art. 8838. — DOI: 10.3390/ijms23168838.
 102. Guilleman, M. M. AAV-mediated delivery of actoxumab and bezlotoxumab results in serum and mucosal antibody concentrations that provide protection from *C. difficile* toxin challenge / M. M. Guilleman, B. A. Y. Stevens, L. P. van Lieshout [et al.] // *Gene Therapy*. — 2023. — Vol. 30, № 5. — P. 455–462. — DOI: 10.1038/s41434-021-00236-y.
 103. Hadinegoro, S. R. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease / S. R. Hadinegoro, J. L. Arredondo-García, M. R. Capeding [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. — 2015. — Vol. 373, № 13. — P. 1195–1206. — DOI: 10.1056/NEJMoa1506223.
 104. Haffkine, W. M. Remarks on the Plague Prophylactic Fluid / W. M. Haffkine // *British Medical Journal*. — 1898. — Vol. 1, № 1954. — P. 1461–1462.

105. Hahn, C. S. Infectious Sindbis virus transient expression vectors for studying antigen processing and presentation / C. S. Hahn, Y. S. Hahn, T. J. Braciale, C. M. Rice // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1992. — Vol. 89, № 7. — P. 2679–2683. — DOI: 10.1073/pnas.89.7.2679.
106. Haines, C. A. Venezuelan Equine Encephalitis Virus V3526 Vaccine RNA-Dependent RNA Polymerase Mutants Increase Vaccine Safety Through Restricted Tissue Tropism in a Murine Model / C. A. Haines, R. K. Campos, S. R. Azar [et al.] // *Zoonoses*. — 2022. — Vol. 2, № 1. — Art. 2. — DOI: 10.15212/ZOONOSES-2021-0016.
107. Hahn, H. Encephalomyocarditis viruses with short poly(C) tracts are more virulent than their mengovirus counterparts / H. Hahn, A. C. Palmenberg // *Journal of Virology*. — 1995. — Vol. 69, № 4. — P. 2697–2699. — DOI: 10.1128/JVI.69.4.2697-2699.1995.
108. Hamers-Casterman, C. Naturally occurring antibodies devoid of light chains / C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans [et al.] // *Nature*. — 1993. — Vol. 363, № 6428. — P. 446–448. — DOI: 10.1038/363446a0.
109. Han, X. Adjuvant lipidoid-substituted lipid nanoparticles augment the immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA vaccines / X. Han, M.-G. Alameh, K. Butowska [et al.] // *Nature Nanotechnology*. — 2023. — Vol. 18, № 9. — P. 1105–1114. — DOI: 10.1038/s41565-023-01404-4.
110. Harris, T. J. R. Biochemical analysis of a virulent and an avirulent strain of foot-and-mouth disease virus / T. J. R. Harris, F. Brown // *Journal of General Virology*. — 1977. — Vol. 34, № 1. — P. 87–105. — DOI: 10.1099/0022-1317-34-1-87.
111. Hassett, K. J. mRNA vaccine trafficking and resulting protein expression after intramuscular administration / K. J. Hassett, I. L. Rajlic, K. Bahl [et al.] // *Molecular Therapy — Nucleic Acids*. — 2024. — Vol. 35, № 1. — Art. 102083. — DOI: 10.1016/j.omtn.2023.102083.

112. Haugen, P. The natural history of group I introns / P. Haugen, D. M. Simon, D. Bhattacharya // Trends in Genetics. — 2005. — Vol. 21, № 2. — P. 111–119. — DOI: 10.1016/j.tig.2004.12.007.
113. Henderson, J. M. Enhancing mRNA Therapeutics : Template-encoded versus Enzymatic tailing methodologies / J. M. Henderson, R. I. Hogrefe // Current Protocols. — 2024. — Vol. 4, № 1. — Art. e823. — DOI: 10.1002/cpz1.823.
114. Hermonat, P. L. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector : transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells / P. L. Hermonat, N. Muzyczka // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1984. — Vol. 81, № 20. — P. 6466–6470. — DOI: 10.1073/pnas.81.20.6466.
115. Hervé, C. The how's and what's of vaccine reactogenicity / C. Hervé, B. Laupèze, G. Del Giudice [et al.] // NPJ Vaccines. — 2019. — Vol. 4. — Art. 39. — DOI: 10.1038/s41541-019-0132-6.
116. Hollister, J. R. Molecular and phylogenetic analyses of bovine rhinovirus type 2 shows it is closely related to foot-and-mouth disease virus / J. R. Hollister, A. Vagnozzi, N. J. Knowles, E. Rieder // Virology. — 2008. — Vol. 373, № 2. — P. 411–425. — DOI: 10.1016/j.virol.2007.12.019.
117. Hornung, V. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I / V. Hornung, J. Ellegast, S. Kim [et al.] // Science. — 2006. — Vol. 314, № 5801. — P. 994–997. — DOI: 10.1126/science.1132505.
118. Horsfall, F. L. Antipneumococcus rabbit serum as a therapeutic agent in lobar pneumonia / F. L. Horsfall, K. Goodner, C. M. MacLeod, A. H. Harris // JAMA. — 1937. — Vol. 108, № 18. — P. 1483–1490. — DOI: 10.1001/jama.1937.02780180007003.
119. Hsu, M.-T. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells / M.-T. Hsu, M. Coca-Prados // Journal of Molecular Biology. — 1979. — Vol. 280, № 5720. — P. 339–340. — DOI: 10.1038/280339a0.

120. Huang, J.-A. Equine rhinitis B virus : a new serotype / J.-A. Huang, N. Ficorilli, C. A. Hartley [et al.] // Journal of General Virology. — 2001. — Vol. 82, № 11. — P. 2641–2645. — DOI: 10.1099/0022-1317-82-11-2641.
121. Huang, X. Selenium nanoparticles as a versatile platform for nucleic acid delivery and cancer theranostics / X. Huang, M. Singh, B. Zhang [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. — 2023. — Vol. 635. — Art. 122718. — DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.122718.
122. Hwang, H. J. Molecular mechanisms of circular RNA translation / H. J. Hwang, Y. K. Kim // Experimental & Molecular Medicine. — 2024. — Vol. 56, № 6. — P. 1272–1280. — DOI: 10.1038/s12276-024-01220-3.
123. Imanishi, M. Mechanisms and Strategies for Determining m⁶A RNA Modification Sites by Natural and Engineered m⁶A Effector Proteins / M. Imanishi // Chemistry — An Asian Journal. — 2022. — Vol. 17, № 16. — Art. e202200367. — DOI: 10.1002/asia.202200367.
124. Ivanov, A. S. mRNA Technology for In Vivo Antibody Generation : Mono- and Bispecific Constructs as a New Frontier in Immunotherapy / A. S. Ivanov, N. D. Karpova, A. A. Salimova [et al.] // Cellular Therapy and Transplantation. — 2025. — Vol. 14, № 2. — P. 112–124.
125. Jang, S. K. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation / S. K. Jang, H.-G. Kräusslich, M. J. Nicklin [et al.] // Journal of Virology. — 1988. — Vol. 62, № 8. — P. 2636–2643. — DOI: 10.1128/JVI.62.8.2636-2643.1988.
126. Jansen, K. U. Efficacy and Safety of an mRNA-Based RSV PreF Vaccine in Older Adults / K. U. Jansen, J. Perez, M. G. Ison [et al.] // The New England Journal of Medicine. — 2023. — Vol. 389, № 24. — P. 2233–2244.
127. Johanns, T. M. Adjuvant personalized multivalent neoantigen DNA vaccination for MGMT unmethylated glioblastoma : a phase 1 trial / T. M. Johanns, E. A. R. Garfinkle, S. A. Paxton [et al.] // Nature Cancer. — 2026. — Vol. 7, № 7. — P. 1064–1079.

128. Ju, M. Platform-dependent performance of P2A and IRES linkers in multicistronic gene expression / M. Ju, J. Han // *Genes & Genomics*. — 2026. — Vol. 48. — P. 1007–1016. — DOI: 10.1007/s13258-026-01771-x.
129. Ju, Y. Anti-PEG Antibodies Boosted in Humans by SARS-CoV-2 Lipid Nanoparticle mRNA Vaccine / Y. Ju, W. S. Lee, E. H. Pilkington [et al.] // *ACS Nano*. — 2022. — Vol. 16, № 8. — P. 11769–11780. — DOI: 10.1021/acsnano.2c04543.
130. Kanamori, Y. A tertiary structure model of the internal ribosome entry site (IRES) for methionine-independent initiation of translation / Y. Kanamori, N. Nakashima // *RNA*. — 2001. — Vol. 7, № 2. — P. 266–274. — DOI: 10.1017/S1355838201001741.
131. Karikó, K. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability / K. Karikó, H. Muramatsu, F. A. Welsh [et al.] // *Molecular Therapy*. — 2008. — Vol. 16, № 11. — P. 1833–1840. — DOI: 10.1038/mt.2008.200.
132. Karikó, K. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors : The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA / K. Karikó, M. Buckstein, H. Ni, D. Weissman // *Immunity*. — 2005. — Vol. 23, № 2. — P. 165–175. — DOI: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.
133. Kauder, S. E. Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry / S. E. Kauder, V. R. Racaniello // *The Journal of Clinical Investigation*. — 2004. — Vol. 113, № 12. — P. 1743–1753. — DOI: 10.1172/JCI21323.
134. Kawaguchi, Y. Modulating Immunogenicity and Reactogenicity in mRNA-Lipid Nanoparticle Vaccines through Lipid Component Optimization / Y. Kawaguchi, M. Kimura, T. Karaki [et al.] // *ACS Nano*. — 2025. — Vol. 19, № 30. — P. 27977–28001. — DOI: 10.1021/acsnano.5c10648.
135. Kendrick, P. A study in active immunization against pertussis / P. Kendrick, G. Eldering // *American Journal of Hygiene*. — 1939. — Vol. 29. — P. 133–153.

136. Kerr, C. H. Commandeering the Ribosome : Lessons Learned from Dicistroviruses about Translation / C. H. Kerr, E. Jan // *Journal of Virology*. — 2016. — Vol. 90, № 12. — P. 5538–5540. — DOI: 10.1128/JVI.00437-16.
137. Khan, M. S. DNA-based vaccines : Advances, applications, and future prospects / M. S. Khan, A. Ahmad, M. T. Rees [et al.] // *Genes & Diseases*. — 2026. — Vol. 13, № 6. — Art. 102025.
138. Kieft, J. S. Viral IRES RNA structures and ribosome interactions / J. S. Kieft // *Trends in Biochemical Sciences*. — 2008. — Vol. 33, № 6. — P. 274–283. — DOI: 10.1016/j.tibs.2008.04.007.
139. King, R. J. The cholesterol pathway : impact on immunity and cancer / R. J. King, P. K. Singh, K. Mehla // *Trends in Immunology*. — 2022. — Vol. 43, № 1. — P. 78–92. — DOI: 10.1016/j.it.2021.11.007.
140. Klein, N. P. A phase 3, randomized, double-blind study to evaluate the immunogenicity and safety of 3 lots of 20-valent pneumococcal conjugate vaccine in pneumococcal vaccine-naïve adults 18 through 49 years of age / N. P. Klein, P. Peyrani, K. Yacisin [et al.] // *Vaccine*. — 2022. — Vol. 40, № 26. — P. 3601–3610.
141. Koch, A. Quantifying the dynamics of IRES and cap translation with single-molecule resolution in live cells / A. Koch, L. Aguilera, T. Morisaki [et al.] // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2020. — Vol. 27, № 12. — P. 1095–1104. — DOI: 10.1038/s41594-020-0504-7.
142. Koch, P. A versatile toolbox for determining IRES activity in cells and embryonic tissues / P. Koch, Z. Zhang, N. R. Genuth [et al.] // *The EMBO Journal*. — 2025. — Vol. 44, № 9. — P. 2695–2724. — DOI: 10.1038/s44318-025-00404-5.
143. Köhler, G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Köhler, C. Milstein // *Nature*. — 1975. — Vol. 256, № 5517. — P. 495–497. — DOI: 10.1038/256495a0.
144. Kolupaeva, V. G. Structural analysis of the interaction of the pyrimidine tract-binding protein with the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis

- virus and foot-and-mouth disease virus RNAs / V. G. Kolupaeva, C. U. Hellen, I. N. Shatsky // *RNA*. — 1996. — Vol. 2, № 12. — P. 1199–1212.
145. Komar, A. A. Cellular IRES-mediated translation : the war of ITAFs in pathophysiological states / A. A. Komar, M. Hatzoglou // *Cell Cycle*. — 2011. — Vol. 10, № 2. — P. 229–240. — DOI: 10.4161/cc.10.2.14472.
 146. Kozarski, M. Towards superior mRNA caps accessible by click chemistry : synthesis and translational properties of triazole-bearing oligonucleotide cap analogs / M. Kozarski, K. Drazkowska, M. Bednarczyk [et al.] // *RSC Advances*. — 2023. — Vol. 13, № 19. — P. 12809–12824. — DOI: 10.1039/D3RA00026E.
 147. Kozma, G. T. Role of anti-polyethylene glycol (PEG) antibodies in the allergic reactions to PEG-containing Covid-19 vaccines : Evidence for immunogenicity of PEG / G. T. Kozma, T. Mészáros, P. Berényi [et al.] // *Vaccine*. — 2023. — Vol. 41, № 31. — P. 4561–4570. — DOI: 10.1016/j.vaccine.2023.06.009.
 148. Kremer, E. J. Pros and Cons of Adenovirus-Based SARS-CoV-2 Vaccines / E. J. Kremer // *Molecular Therapy*. — 2020. — Vol. 28, № 11. — P. 2303–2304. — DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.10.002.
 149. Krieg, P. A. Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs / P. A. Krieg, D. A. Melton // *Nucleic Acids Research*. — 1984. — Vol. 12, № 18. — P. 7057–7070. — DOI: 10.1093/nar/12.18.7057.
 150. Prygiel, M. Passive Immunisation in the Treatment of Infectious Diseases Related to Highly Potent Bacterial Toxins / M. Prygiel, E. Mosiej, K. Wdowiak, A. A. Zasada // *Biomedicines*. — 2024. — Vol. 12, № 12. — Art. 2920.
 151. Kunyk, D. The Interplay Between Therapeutic Self-Amplifying RNA and the Innate Immune System : Balancing Efficiency and Reactogenicity / D. Kunyk, M. Plotnikova, M. Bespalov [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2025. — Vol. 26, № 18. — Art. 8986. — DOI: 10.3390/ijms26188986.
 152. Laczkó, D. A Single Immunization with Nucleoside-Modified mRNA Vaccines Elicits Strong Cellular and Humoral Immune Responses against SARS-

- CoV-2 in Mice / D. Laczkó, M. J. Hogan, S. A. Toulmin [et al.] // *Immunity*. — 2020. — Vol. 53, № 4. — P. 724–732.e7. — DOI: 10.1016/j.immuni.2020.07.019.
153. Lal, H. Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults / H. Lal, A. L. Cunningham, O. Godeaux [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. — 2015. — Vol. 372, № 22. — P. 2087–2096. — DOI: 10.1056/NEJMoa1501184.
154. Lambowitz, A. M. Group II Introns : Mobile Ribozymes That Invade DNA / A. M. Lambowitz, S. Zimmerly // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. — 2011. — Vol. 3, № 8. — Art. a003616. — DOI: 10.1101/cshperspect.a003616.
155. Larivière, Y. Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo Ebola virus disease vaccine regimen plus Ad26.ZEBOV booster at 1 year versus 2 years in health-care and front-line workers in the Democratic Republic of the Congo : secondary and exploratory outcomes of an open-label, randomised, phase 2 trial / Y. Larivière, T. Z. Matuvanga, B. I. Osang'ir [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. — 2024. — Vol. 24, № 7. — P. 746–759.
156. Lawson, N. D. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA / N. D. Lawson, E. A. Stillman, M. A. Whitt, J. K. Rose // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1995. — Vol. 92, № 10. — P. 4477–4481. — DOI: 10.1073/pnas.92.10.4477.
157. Lederer, K. Germinal center responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in healthy and immunocompromised individuals / K. Lederer, K. Parvathaneni, E. Bettini [et al.] // *Cell*. — 2022. — Vol. 185, № 6. — P. 1008–1024.e15. — DOI: 10.1016/j.cell.2022.01.027.
158. Lederer, K. SARS-CoV-2 mRNA Vaccines Foster Potent Antigen-Specific Germinal Center Responses Associated with Neutralizing Antibody Generation / K. Lederer, D. Castaño, D. Gómez Atria [et al.] // *Immunity*. — 2020. — Vol. 53, № 6. — P. 1281–1295.e5. — DOI: 10.1016/j.immuni.2020.11.009.
159. Ledermann, J. A. OVATION-2 : A randomized phase I/II study evaluating the safety and efficacy of IMNN-001 (IL-12 gene therapy) with neo/adjuvant chemotherapy in patients newly-diagnosed with advanced epithelial ovarian cancer

- / J. A. Ledermann, A. M. O’Cearbhaill, S. N. Westin [et al.] // *Gynecologic Oncology*. — 2025. — Vol. 197. — P. 45–53.
160. Lee, K.-M. Regulation Mechanisms of Viral IRES-Driven Translation / K.-M. Lee, C.-J. Chen, S.-R. Shih // *Trends in Microbiology*. — 2017. — Vol. 25, № 7. — P. 546–561. — DOI: 10.1016/j.tim.2017.01.010.
161. Lee, M.-K. Structural features of influenza A virus panhandle RNA enabling the activation of RIG-I independently of 5'-triphosphate / M.-K. Lee, H.-E. Kim, E.-B. Park [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2016. — Vol. 44, № 17. — P. 8407–8416. — DOI: 10.1093/nar/gkw500.
162. Li, H. Circular RNA cancer vaccines drive immunity in hard-to-treat malignancies / H. Li, K. Peng, K. Yang [et al.] // *Theranostics*. — 2022. — Vol. 12, № 14. — P. 6422–6436. — DOI: 10.7150/thno.77350.
163. Li, Q. Current landscape of clinical trials for mRNA-based therapeutics / Q. Li, M. Zeng, W. Lv [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. — 2026. — Vol. 22, № 1. — Art. 2635868. — DOI: 10.1080/21645515.2026.2635868.
164. Liang, F. Efficient Targeting and Activation of Antigen-Presenting Cells In Vivo after Modified mRNA Vaccine Administration in Rhesus Macaques / F. Liang, G. Lindgren, A. Lin [et al.] // *Molecular Therapy*. — 2017. — Vol. 25, № 12. — P. 2635–2647. — DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.08.006.
165. Lieshout, L. P. Intramuscular Adeno-Associated Virus – Mediated Expression of Monoclonal Antibodies Provides 100% Protection Against Ebola Virus Infection in Mice / L. P. van Lieshout, G. Soule, D. Sorensen [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2018. — Vol. 217, No. 6. — P. 916 – 925.
166. Liljeström, P. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon / P. Liljeström, H. Garoff // *Bio/Technology*. — 1991. — Vol. 9, No. 12. — P. 1356 – 1361.
167. Lim, T. K. Y. Cap-independent co-expression of dsRNA-sensing and NF-κB pathway inhibitors enables controllable self-amplifying RNA expression with reduced immunotoxicity / T. K. Y. Lim, A. Ritoux, L. W. Paine [et al.] // *eLife*. — 2025. — Vol. 14. — Art. RP105978.

168. Ling, X. Structures of a natural circularly permuted group II intron reveal mechanisms of branching and backsplicing / X. Ling, Y. Yao, J. Ma [et al.] // *Nat Struct Mol Biol.* – 2025. – Vol. 32, No. 6. – P. 1101 – 1110.
169. Liu, B. Translational reprogramming in cellular stress response / B. Liu, S. B. Qian // *Wiley Interdiscip Rev RNA.* — 2014. — Vol. 5, No. 3. — P. 301–315. DOI: 10.1002/wrna.1212
170. Liu, F. T. The role of galectins in immunity and infection / F. T. Liu, S. R. Stowell // *Nat. Rev. Immunol.* – 2023. – Vol. 23. – P. 479 – 494.
171. Liu, T. Functionalized Selenium Nanoparticles as Efficient Carriers for siRNA Delivery to Tumor Cells / T. Liu, L. Yu, Y. Chen [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B.* – 2020. – Vol. 8, № 15. – P. 3023 – 3034.
172. Liu, X. A single-dose circular mRNA vaccine prevents Zika virus infection without enhancing dengue severity in mice / X. Liu, Z. Li, X. Li [et al.] // *Nat Commun.* – 2024. – Vol. 15, No. 1. – P. 8932.
173. Liu, Y. Neutrophil membrane-coated circular RNA nanoparticles for targeted immunotherapy in HER2-positive breast cancer brain metastasis / Y. Liu, W. He, X. Li [et al.] // *Cell Commun Signal.* – 2025. – Vol. 23. – P. 333.
174. Lives saved by COVID-19 vaccines // *Journal of Paediatrics and Child Health.* – 2022. – Vol. 58, No. 11. – P. 2129.
175. Locci, M. Immunological mechanisms of mRNA vaccines for infectious diseases / M. Locci, N. Pardi // *Nature.* – 2026. – Vol. 654, No. 8120. – P. 892 – 901.
176. Logunov, D. Y. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia / D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, D. V. Shcheblyakov [et al.] // *The Lancet.* – 2021. – Vol. 397, № 10275. – P. 671 – 681.
177. Lonez, C. Cationic lipid nanocarriers activate Toll-like receptor 2 and NLRP3 inflammasome pathways / C. Lonez [et al.] // *Nanomedicine.* – 2014. – Vol. 10. – P. 775 – 782.

178. Loofbourow, J. C. Rabies Immune Globulin (Human). Clinical trials and conditions of use / J. C. Loofbourow, D. J. Cabasso, R. E. Roby, H. D. Anuskiewicz // Journal of the American Medical Association (JAMA). – 1971. – Vol. 217, No. 13. – P. 1825 – 1831.
179. Lorenz, R. ViennaRNA Package 2.0 / R. Lorenz, S. H. Bernhart, C. Höner zu Siederdissen [et al.] // Algorithms for Molecular Biology. – 2011. – Vol. 6, No. 1. – P. 26.
180. Lundstrom, K. Self-amplifying RNA viruses as vaccine platforms // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2021. – Vol. 9. – Art. 687659.
181. Luz, N. Interaction of a cellular 57-kilodalton protein with the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus / N. Luz, E. Beck // J Virol. – 1991. – Vol. 65, No. 12. – P. 6486 – 6494.
182. MacGregor, R. R. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response / R. R. MacGregor, J. D. Boyer, K. E. Ugen [et al.] // J Infect Dis. – 1998. – Vol. 178, No. 1. – P. 92 – 100.
183. Mackett, M. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector / M. Mackett, G. L. Smith, B. Moss // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1982. – Vol. 79, № 23. – P. 7415 – 7419.
184. Macklin, G. R. Evolving epidemiology of poliovirus serotype 2 following withdrawal of the serotype 2 oral poliovirus vaccine / G. R. Macklin [et al.] // Science. – 2020. – Vol. 368, No. 6489. – P. 401 – 405.
185. MacLeod, C. M. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides / C. M. MacLeod, R. G. Hodges, M. Heidelberger, W. G. Bernhard // Journal of Experimental Medicine. – 1945. – Vol. 82, iss. 6. – P. 445 – 465.
186. Malone, R. W. Cationic liposome-mediated RNA transfection / R. W. Malone, P. L. Felgner, I. M. Verma // Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS). – 1989. – Vol. 86, No. 16. – P. 6077 – 6081.

187. Mandell, Z. F. CleanCap M6 inhibits decapping of exogenously delivered IVT mRNA / Z. F. Mandell [et al.] // *Molecular Therapy Nucleic Acids*. – 2025. – T. 36, № 1.
188. Martin, L. R. Mengovirus and encephalomyocarditis virus poly(C) tract lengths can affect virus growth in murine cell culture / L. R. Martin, Z. C. Neal, M. S. McBride [et al.] // *J Virol*. – 2000. – Vol. 74, No. 7. – P. 3074 – 3081.
189. Martin, L. R. Mutational analysis of the mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences / L. R. Martin, G. M. Duke, J. E. Osorio [et al.] // *J Virol*. – 1996. – Vol. 70, No. 3. – P. 2027 – 2031.
190. Martinon, F. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-mediated mRNA transfection / F. Martinon, S. Krishnan, G. Lenzen [et al.] // *European Journal of Immunology*. – 1993. – Vol. 23, No. 7. – P. 1719 – 1722.
191. McAleer, W. J. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast / W. J. McAleer, E. B. Buynak, R. Z. Maigetter [et al.] // *Nature*. – 1984. – Vol. 307, iss. 5947. – P. 178 – 180.
192. McCafferty, J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains / J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, D. J. Chiswell // *Nature*. – 1990. – Vol. 348, No. 6301. – P. 552 – 554.
193. McCaffrey, A. P. Compositions and methods for synthesizing 5'-capped RNAs / A. P. McCaffrey, R. I. Hogrefe, A. Lebedev // *Patent WO2017053297A1*. – 2017.
194. McCartan, G. Controlling In Vitro mRNA Polyadenylation by Monitoring PolyA Polymerase Consumption of ATP / G. McCartan, S. L. Grist, D. S. S. M. P. G. Alwis [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2026. – Vol. 27, iss. 7. – Art. 2928.
195. Melton, D. A. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter / D. A. Melton, P. A. Krieg, M. R. Rebagliati [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 1984. – Vol. 12, No. 18. – P. 7035 – 7056.

196. Mendonça Sampaio, A. R. Adenovirus Vectors: Excellent Tools for Vaccine Development / A. R. Mendonça Sampaio, L. R. C. R. Silva, S. M. B. de Mello [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – Art. 641453.
197. Meo, S. A. COVID-19 vaccines: comparison of biological, pharmacological characteristics and adverse effects of Pfizer/BioNTech and Moderna Vaccines / S. A. Meo, I. A. Bukhari, J. Akram [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. – 2021. – Vol. 25, No. 3. – P. 1663 – 1669.
198. Miao, L. Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation / L. Miao [et al.] // *Nat. Biotechnol*. – 2019. – Vol. 37. – P. 1174 – 1185.
199. Miller, M. An engineered T7 RNA polymerase for efficient co-transcriptional capping with reduced dsRNA byproducts in mRNA synthesis / M. Miller, O. Alvizo, S. Baskerville [et al.] // *Faraday Discuss*. – 2024. – Vol. 252, No. 0. – P. 431 – 449.
200. Modifications of saRNA and the restriction of viral polymerases // *Viruses*. – 2025. – Vol. 17, No. 1. – P. 78 – 92.
201. Moss, B. Reflections on the early development of poxvirus vectors // *Virology*. – 2013. – Vol. 443, № 2. – P. 173 – 184.
202. Mulroney, T. E. N1-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting / T. E. Mulroney, T. Pöyry, J. C. Yam-Puc [et al.] // *Nature*. — 2024. — Vol. 625, No. 7993. — P. 189–194. DOI: 10.1038/s41586-023-06800-3
203. Muyldermans, S. Sequence and specificity of camel dromedary heavy-chain antibodies / S. Muyldermans, C. Cambillau, R. Hamers // *Protein Engineering, Design and Selection*. – 1994. – Vol. 7, No. 9. – P. 1129 – 1135.
204. Nielsen, H. Group I introns: moving in new directions / H. Nielsen, S. D. Johansen // *RNA Biology*. – 2009. – Vol. 6. – P. 375 – 383.
205. Niepmann, M. Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – Vol. 1789, No. 9-10. – P. 529 – 541.
206. Nishiyama, T. Structural elements in the internal ribosome entry site of Plautia stali intestine virus responsible for binding with ribosomes / T. Nishiyama,

- H. Yamamoto, N. Shibuya [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Vol. 31. – P. 2434 – 2442.
207. Niu, D. Circular mRNA vaccine in disease prevention and treatment / D. Niu, Y. Wu, J. Lian // *Signal Transduct Target Ther*. – 2023. – Vol. 8, No. 1. – P. 341.
208. Obi, P. The design and synthesis of circular RNAs / P. Obi, Y. G. Chen // *Methods*. – 2021. – Vol. 196. – P. 85 – 103.
209. Oda, Y. Immunogenicity and safety of a booster dose of a self-amplifying RNA COVID-19 vaccine (ARCT-154) versus BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: a double-blind, multicentre, randomised, controlled, phase 3, non-inferiority trial / Y. Oda, Y. Kumagai, M. Kanai [et al.] // *Lancet Infectious Diseases*. — 2024. — Vol. 24, No. 4. — P. 351–360. DOI: 10.1016/S1473-3099(23)00650-3
210. Omasits, U. Protter: an interactive web-based application for visualization of sequence and structural features of proteins / U. Omasits, C. H. Ahrens, S. Müller, B. Wollscheid // *Bioinformatics*. – 2014.
211. Omo-Lamai, S. Limiting endosomal damage sensing reduces inflammation triggered by lipid nanoparticle endosomal escape / S. Omo-Lamai [et al.] // *Nat. Nanotechnol*. – 2025. – Vol. 20. – P. 1285 – 1297.
212. Paavonen, J. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse in young women (PATRICIA): a randomised, controlled trial / J. Paavonen, D. Jenkins, F. X. Bosch [et al.] // *The Lancet*. – 2009. – Vol. 374, iss. 9686. – P. 301 – 314.
213. Pacheco, A. A novel role for Gemin5 in mRNA translation / A. Pacheco, S. López de Quinto, J. Ramajo [et al.] // *Nucleic Acids Res*. – 2009. – Vol. 37, No. 2. – P. 582 – 590.
214. Packer, M. A novel mechanism for the loss of mRNA activity in lipid nanoparticle delivery systems / M. Packer, D. Gyawali, R. Yerabolu, J. Schariter, P. White // *Nat. Commun*. – 2021. – Vol. 12. – P. 6777.

215. Palmenberg, A. C. Cardioviral poly(C) tracts and viral pathogenesis / A. C. Palmenberg, J. E. Osorio // Arch Virol Suppl. – 1994. – Vol. 9. – P. 67 – 77.
216. Panicali, D. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus / D. Panicali, E. Paoletti // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1982. – Vol. 79, № 16. – P. 4927 – 4931.
217. Panova, E. A. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A / E. A. Panova, D. A. Kleymenov, D. V. Shcheblyakov [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1098302.
218. Papi, M. G. Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Protein Vaccine in Older Adults / M. G. Papi, J. M. Langley, C. Miralles [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2023. – Vol. 388, iss. 7. – P. 595 – 608.
219. Pastoret, P. P. Vaccination of foxes against rabies using a recombinant vaccinia-rabies virus / P. P. Pastoret, B. Brochier, D. Boulanger [et al.] // Veterinary Microbiology. – 1997. – Vol. 54, № 1-2. – P. 3 – 17.
220. Pasteur, L. Sur les maladies virulentes et en particulier sur la maladie appelée vulgairement «choléra des poules» // Recueil de Médecine Vétérinaire. – 1880. – T. 57, № 1. – P. 125 – 135.
221. Pawar, B. A Comprehensive Review of Vaccine Development: From Traditional Platforms to Messenger RNA (mRNA) Technologies / B. Pawar [et al.] // Cureus. – 2026. – Vol. 18, No. 1. – P. e100608.
222. Pelletier, J. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA / J. Pelletier, N. Sonenberg // Nature. – 1988. – Vol. 334, No. 6180. – P. 320 – 325.
223. Peng, T. Structural diversity and biological role of the 5' untranslated regions of picornavirus / T. Peng, F. Yang, F. Yang [et al.] // RNA Biology. – 2023. – Vol. 20, No. 1. – P. 548 – 562.

224. Penza, V. The long-lasting enigma of polycytidine (polyC) tract / V. Penza, S. J. Russell, A. J. Schulze [et al.] // *PLOS Pathog.* – 2021. – Vol. 17, No. 8. – P. e1009739.
225. Perriman, R. Circular mRNA can direct translation of extremely long repeating-sequence proteins in vivo / R. Perriman, M. Ares // *RNA*. – 1998. – Vol. 4. – P. 1047 – 1054.
226. Petkovic, S. Synthesis and Engineering of Circular RNAs / S. Petkovic, S. Müller // *Circular RNAs. Methods in Molecular Biology*, vol 1724. – Humana Press, New York, NY. – 2018.
227. Pfeiffer, R. Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Schutzimpfung des Menschen gegen Typhus abdominalis / R. Pfeiffer, W. Kolle // *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. – 1896. – Bd. 22, № 46. – S. 735 – 737.
228. Pichlmair, A. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates / A. Pichlmair, O. Schulz, C. P. Tan [et al.] // *Science*. – 2006. – Vol. 314, No. 5801. – P. 997 – 1001.
229. Pisarev, A. V. Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and porcine teschovirus, a picornavirus / A. V. Pisarev, L. S. Chard, Y. Kaku [et al.] // *Journal of Virology*. – 2004. – Vol. 78. – P. 4487 – 4497.
230. Plotkin, S. A. Attenuation of RA 27/3 rubella virus in WI-38 human diploid cells / S. A. Plotkin [et al.] // *American Journal of Diseases of Children*. – 1969. – Vol. 118, iss. 1. – P. 16 – 21.
231. Polack, F. P. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine / F. P. Polack, S. J. Thomas, N. Kitchin [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383, No. 27. – P. 2603 – 2615.
232. Prats, A. C. Circular RNA, the Key for Translation / A. C. Prats, F. David, L. H. Diallo [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – P. 8591.

233. Prevec, L. A recombinant human adenovirus vaccine against rabies / L. Prevec, J. B. Campbell, B. S. Christie [et al.] // *J Infect Dis.* – 1990. – Vol. 161, No. 1. – P. 27 – 30.
234. Priddy, F. H. Safety and Immunogenicity of a Replication-Incompetent Adenovirus Type 5 HIV-1 Clade B gag/pol/nef Vaccine in Healthy Adults / F. H. Priddy, D. Brown, J. Kublin [et al.] // *Clinical Infectious Diseases.* – 2008. – Vol. 46, No. 11. – P. 1769 – 1781.
235. Pupo, A. AAV vectors: the Rubik's cube of human gene therapy / A. Pupo, A. Fernández, S. H. Low [et al.] // *Molecular Therapy Methods & Clinical Development.* – 2022. – Vol. 24. – P. 166 – 178.
236. Puttaraju, M. Group I permuted intron-exon (PIE) sequences self-splice to produce circular exons / M. Puttaraju, M. D. Been // *Nucleic Acids Research.* – 1992. – Vol. 20. – P. 5357 – 5364.
237. Pyle, A. M. Group II Intron Self-Splicing // *Annual Review of Biophysics.* – 2016. – Vol. 45. – P. 183.
238. Pyle, A. M. The Tertiary Structure of Group II Introns: Implications for Biological Function and Evolution // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* – 2010. – Vol. 45. – P. 215 – 232.
239. Qu, L. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants / L. Qu, Z. Yi, Y. Shen [et al.] // *Cell.* – 2022. – Vol. 185, No. 10. – P. 1728 – 1744.e16.
240. Quintana, V. Improvement in the potency of a N1-methylpseudouridine-modified self-amplifying RNA through mutations in the RNA-dependent RNA polymerase / V. Quintana, J. Caillava, L. A. Byk [et al.] // *J Biol Chem.* – 2025. – Vol. 301, No. 8. – P. 110487.
241. Quinto, S. L. IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII / S. López de Quinto, E. Lafuente, E. Martínez-Salas // *RNA.* – 2001. – Vol. 7, No. 9. – P. 1213 – 1226.

242. Quinto, S. L. Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo / S. L. de Quinto, E. Martínez-Salas // RNA. – 2000. – Vol. 6, No. 10. – P. 1380 – 1392.
243. Ramon, G. Sur le pouvoir flocculant et sur les propriétés immunisantes d'une toxine diphtérique rendue stérile et inopportune // Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. – 1923. – Vol. 177. – P. 1338 – 1340.
244. Rausch, J. W. Characterizing and circumventing sequence restrictions for synthesis of circular RNA in vitro / J. W. Rausch, W. F. Heinz, M. J. Payea [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2021. – Vol. 49, No. 6. – P. e35.
245. Rehwinkel, J. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing / J. Rehwinkel, M. U. Gack // Nature Reviews Immunology. – 2020. – Vol. 20, No. 9. – P. 537 – 551.
246. Reina, J. The new generation of messenger RNA (mRNA) vaccines against influenza / J. Reina // Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed). — 2023. — Vol. 41, No. 5. — P. 301–304. DOI: 10.1016/j.eimce.2022.07.006
247. Riechmann, L. Reshaping human antibodies for therapy / L. Riechmann, M. Clark, H. Waldmann, G. Winter // Nature. – 1988. – Vol. 332, No. 6162. – P. 323 – 327.
248. Rieder, E. Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice / E. Rieder, T. Bunch, F. Brown [et al.] // J Virol. – 1993. – Vol. 67, No. 9. – P. 5139 – 5145.
249. Robart, A. R. Crystal Structure of a Eukaryotic Group II Intron Lariat / A. R. Robart, R. T. Chan, J. K. Peters [et al.] // Nature. – 2014. – Vol. 514. – P. 193 – 197.
250. Robbins, J. A. Safety and immunogenicity of an rVSV-ΔG-SARS-CoV-2-S vaccine in healthy adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial / J. A. Robbins, D. Tait, Q. Huang [et al.] // The Lancet Microbe. – 2022. – Vol. 3, № 3. – P. e193 – e202.

251. Roux, E. Trois cents cas de diphterie traites par le serum antidiphterique / E. Roux, L. Martin, A. Chaillou // Annales de l'Institut Pasteur. – 1894. – Vol. 8, iss. 9. – P. 609 – 639.
252. Rowe, W. P. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture / W. P. Rowe, R. J. Huebner, L. K. Gilmore [et al.] // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1953. – Vol. 84, № 3. – P. 570 – 573.
253. Rusche, J. R. Humoral immune response to the entire human immunodeficiency virus envelope glycoprotein made in insect cells / J. R. Rusche, D. L. Lynn, M. Robert-Guroff [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1987. – Vol. 84, iss. 19. – P. 6924 – 6928.
254. Ryabova, E. I. The Use of Recombinant Adeno-Associated Virus for Passive Immunization and Protection against Infectious Diseases / E. I. Ryabova, A. A. Derkaev, N. V. Pimenov [et al.] // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2024. – T. 39, № 1. – C. 31 – 39.
255. Rybakova, Y. mRNA Delivery for Therapeutic Anti-HER2 Antibody Expression In Vivo / Y. Rybakova, P. S. Kowalski, Y. Huang [et al.] // Mol Ther. – 2019. – Vol. 27, No. 8. – P. 1415 – 1423.
256. Sabin, A. B. Properties and behavior of pathogenic and attenuated polioviruses in monkeys and chimpanzees / A. B. Sabin // Special Publications of the New York Academy of Sciences. – 1957. – Vol. 5, iss. 1. – P. 113 – 127.
257. Sadoff, J. Safety and efficacy of single-dose Ad26.COV2.S vaccine against Covid-19 / J. Sadoff, G. Gray, A. Vandebosch [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2021. – Vol. 384, № 23. – P. 2187 – 2201.
258. Safety and Efficacy Study of RXIM002 in Severe, Relapsed or Refractory Autoimmune Diseases // ClinicalTrials.gov. – Identifier: NCT07322718. – Updated January 21, 2026. – URL: clinicaltrials.gov (дата обращения: 12.05.2026). – Текст: электронный.

259. Sahin, U. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy / L. M. Kranz, M. Diken, H. Haas [et al.] // *Nature*. — 2016. — Vol. 534, No. 7607. — P. 396–401. DOI: 10.1038/nature18300
260. evolutionary defense mechanisms to fight cancer / U. Sahin, K. Karikó, Ö. Türeci [et al.] // *Nature*. — 2016. — Vol. 534, № 7607. — P. 396 – 401.
261. Salk, J. E. Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. 1. A preliminary report of experiments in progress / J. E. Salk // *Journal of the American Medical Association*. — 1953. — Vol. 151, iss. 13. — P. 1081 – 1098.
262. Salmon, D. E. On a new method of producing immunity from contagious diseases / D. E. Salmon, T. Smith // *Proceedings of the Biological Society of Washington*. — 1886. — Vol. 3. — P. 29 – 33.
263. Samulski, R. J. Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells / R. J. Samulski, K. I. Berns, M. Tan, N. Muzyczka // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. — 1982. — Vol. 79, № 6. — P. 2077 – 2081.
264. Sanger, H. L. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures / H. L. Sanger, G. Klotz, D. Riesner [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 1976. — Vol. 73, No. 11. — P. 3852 – 3856.
265. Schnell, M. J. The minimal conserved transcription stop-start signal promotes stable expression of a foreign gene in vesicular stomatitis virus / M. J. Schnell, L. Buonocore, M. A. Whitt, J. K. Rose // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. — 1997. — Vol. 94, № 21. — P. 11395 – 11400.
266. Schwartz, J. M. Evaluation of the Safety, Tolerability, and Immunogenicity of VGX-3100, a DNA Vaccine for HPV-16/18 Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial / J. M. Schwartz, K. A. Porter, E. A. Brown [et al.] // *Lancet Oncology*. — 2024. — Vol. 25, No. 4. — P. 482 – 495.

267. Scully, M. Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura / M. Scully, S. R. Cataland, P. Coppo [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2019. – Vol. 380, No. 4. – P. 335 – 346.
268. Sette, A. Immunological memory to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines / A. Sette, S. Crotty // Immunol. Rev. – 2022. – Vol. 310. – P. 27 – 46.
269. Shchelyakov, D. V. Ultra-potent RBM-specific single-domain antibody broadly neutralizes multiple SARS-CoV-2 variants with picomolar activity / D. V. Shchelyakov, I. A. Favorskaya, I. V. Dolzhikova [et al.] // Int J Biol Macromol. – 2025. – Vol. 319, Pt 3. – P. 145386.
270. Shmeleva, E. A. Adenoviral Vectors for Gene Therapy of Hereditary Diseases / E. A. Shmeleva, D. M. Gilyazova, O. V. Evgrafov [et al.] // Biology. – 2024. – Vol. 13, № 12. – Art. 1052.
271. Shrotri, M. Effectiveness of CoronaVac inactivated vaccine / M. Shrotri [et al.] // Lancet Infectious Diseases. – 2021.
272. Shuman, S. Purification and use of vaccinia virus messenger RNA capping enzyme / S. Shuman, B. Moss // Methods in Enzymology. – 1990. – Vol. 181. – P. 170 – 180.
273. Singh, R. Recent Advances in the Development of Monoclonal Antibodies and Next-Generation Antibodies / R. Singh, P. Chandley, S. Rohatgi // Immunohorizons. – 2023. – Vol. 7, No. 12. – P. 886 – 897.
274. Smith, G. E. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector / G. E. Smith, M. D. Summers, M. J. Fraser // Mol Cell Biol. – 1983. – Vol. 3, No. 12. – P. 2156 – 2165.
275. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface // Science. – 1985. – Vol. 228, No. 4705. – P. 1315 – 1317.
276. Smolens, J. The Characteristics of Human Antitetanic Serum / J. Smolens, A. B. Vogt, M. N. Crawford, S. Stokes // Journal of Pediatrics. – 1957. – Vol. 50, No. 3. – P. 317 – 323.

277. Spiewla, T. PolyA tail segmentation improves the stability of the template DNA and increases the translatability of in vitro transcribed mRNA / T. Spiewla, K. Czubak, Z. Pilch [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2026. – Vol. 54, No. 2. – P. gkaf1412.
278. Sriram, A. Translation acrobatics: how cancer cells exploit alternate modes of translational initiation / A. Sriram, J. Bohlen, A. A. Teleman // *EMBO Reports.* – 2018. – Vol. 19. – P. e45947.
279. Staple, D. W. Pseudoknots: RNA structures with diverse functions / D. W. Staple, S. E. Butcher // *PLoS Biol.* – 2005. – Vol. 3, No. 6. – P. e213.
280. Stepinski, J. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel «anti-reverse» cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG / J. Stepinski, C. Waddell, R. Stolarski [et al.] // *RNA.* – 2001. – Vol. 7, iss. 10. – P. 1486 – 1495.
281. Stern-Ginossar, M. Translation – -A tug of war during viral infection / M. Stern-Ginossar, J. W. Schoggins, T. F. Rogers [et al.] // *Molecular Cell.* – 2022.
282. Study of circular RNA treatment in patients with radiation induced xerostomia 1 (SPRINX 1) // *ClinicalTrials.gov.* – Identifier: NCT06714253. – Updated March 10, 2025. – URL: clinicaltrials.gov (дата обращения: 12.05.2026). – Текст: электронный.
283. Study of TI 0093 Injection With Recurrent/Metastatic HPV 16 Positive Solid Tumors // *ClinicalTrials.gov.* – Identifier: NCT07081984. – Updated November 21, 2025. – URL: clinicaltrials.gov (дата обращения: 12.05.2026). – Текст: электронный.
284. Szabó, G. COVID-19 mRNA vaccines: Platforms and current developments / G. Szabó, A. Mahiny, I. Vlatkovic [et al.] // *Molecular Therapy.* – 2022. – Vol. 30, No. 5. – P. 1850 – 1868.
285. Szebeni, J. Applying lessons learned from nanomedicines to understand rare hypersensitivity reactions to mRNA-based SARS-CoV-2 vaccines / J. Szebeni [et al.] // *Nat. Nanotechnol.* – 2022. – Vol. 17. – P. 337 – 346.

286. Szmunn, W. A controlled clinical trial of the efficacy of the hepatitis B vaccine / W. Szmunn, C. E. Stevens, E. J. Harley [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 1980. – Vol. 303, iss. 15. – P. 833 – 841.
287. Tahtinen, S. IL-1 and IL-1ra are key regulators of the inflammatory response to RNA vaccines / S. Tahtinen [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2022. – Vol. 23. – P. 532 – 542.
288. Tanaka, T. Dic14-amidine cationic liposomes stimulate myeloid dendritic cells through Toll-like receptor 4 / T. Tanaka [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2008. – Vol. 38. – P. 1351 – 1357.
289. Theiler, M. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus / M. Theiler, H. H. Smith // *Journal of Experimental Medicine*. – 1937. – Vol. 65, iss. 6. – P. 767 – 786.
290. Therorna to Showcase Clinical Ready Circular RNA in vivo CAR T and CircRNA Pipeline at the 2026 American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT) Annual Meeting // BusinessWire press release. – Published May 11, 2026. – URL: businesswire.com (дата обращения: 12.05.2026). – Текст: электронный.
291. Thran, M. In vivo mRNA expression of a multi-mechanistic mAb combination provides long-term protection against viral outbreaks / M. Thran, J. Scholz, S. S. Gellis [et al.] // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15, No. 3. – P. 1102 – 1115.
292. Thran, M. mRNA mediates passive vaccination against infectious agents, toxins, and tumors / M. Thran, J. Mukherjee, M. Pönisch [et al.] // *EMBO Mol Med*. – 2017. – Vol. 9, No. 10. – P. 1434 – 1447.
293. TI 0032: «A Clinical Study of TI 0032 III Injection in Patients With Relapsed and Refractory Autoimmune Diseases (in vivo CAR T)» // *ClinicalTrials.gov*. – Identifier: NCT07413341. – Updated February 26, 2026. – URL: clinicaltrials.gov (дата обращения: 12.05.2026). – Текст: электронный.

294. Trepotec, Z. Segmented poly(A) tails significantly reduce recombination of plasmid DNA without affecting mRNA translation efficiency or half-life / Z. Trepotec, E. Lichtenegger, C. Plank [et al.] // RNA. – 2019. – Vol. 25, iss. 4. – P. 507 – 518.
295. Turner, J. S. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses / J. S. Turner [et al.] // Nature. – 2021. – Vol. 596. – P. 109 – 113.
296. Tutykhina, I. Vaccination potential of B and T epitope-enriched NP and M2 against Influenza A viruses from different clades and hosts / I. Tutykhina, I. Esmagambetov, A. Bagaev [et al.] // PLOS ONE. – 2018.
297. Tutykhina, I. L. Passive immunization with a recombinant adenovirus expressing an HA (H5)-specific single-domain antibody protects mice from lethal influenza infection / I. L. Tutykhina, E. S. Sedova, I. Y. Gribova [et al.] // Antiviral Research. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2012.12.021
298. Vadovics, M. Tailoring the adjuvanticity of lipid nanoparticles by PEG lipid ratio and phospholipid modifications / M. Vadovics [et al.] // Nat. Nanotechnol. – 2025. – Vol. 20. – P. 1312 – 1322.
299. Vakhtinskii, V. M. Circular mRNA against CleanCap linear mRNA vectors: comprehensive comparison, expression, active and passive immunization / V. M. Vakhtinskii, I. L. Tutykhina, A. S. Dzharullaeva [et al.] // Frontiers in Immunology. — 2026. — Vol. 17. — P. 1734751. DOI: 10.3389/fimmu.2026.1734751
300. Vakhtinskii, V. M. mRNA as a perspective prime-component for universal Influenza A vaccine / V. M. Vakhtinskii, I. L. Tutykhina, A. S. Bandelyuk [et al.] // Immynologiya. — 2025. — Vol. 46, No. 5. — P. 607–619. DOI: 10.33029/1816-2134-2025-46-5-607-619
301. Van Doren, K. Infection of eucaryotic cells by helper-independent recombinant adenoviruses: early region 1 is required for t antigen expression / K. Van Doren, D. Hanahan, Y. Gluzman // Molecular and Cellular Biology. – 1984. – Vol. 4, № 8. – P. 1653 – 1656.

302. Veterinary Biological Product License: Oral Rabies Vaccine, Live Vaccinia Vector (RABORAL V RG) // Animal and Plant Health Inspection Service; United States Department of Agriculture (USDA APHIS). – URL: usda.gov (дата обращения: 09.06.2026). – Текст: электронный.
303. Villa, L. L. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions / L. L. Villa, R. L. Costa, C. A. Petta [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2005. – Vol. 5, iss. 7. – P. 403 – 411.
304. Wan, J. Circular RNA vaccines with long-term lymph node-targeting delivery stability after lyophilization induce potent and persistent immune responses / J. Wan, Z. Wang, L. Wang [et al.] // *mBio*. – 2024. – Vol. 15, No. 1. – P. e0177523.
305. Wang, D. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery / D. Wang, P. W. L. Tai, G. Gao // *Nat Rev Drug Discov*. – 2019. – Vol. 18, No. 5. – P. 358 – 378.
306. Wang, J. Minicircle DNA vectors: A breakthrough in non-viral delivery of nucleic acids / J. Wang, L. Zhang, Y. Liu [et al.] // *Molecular Therapy – Nucleic Acids*. – 2024. – Vol. 35, № 3. – Art. 102264.
307. Wang, L. Exploring the Potential and Advancements of Circular RNA Therapeutics / L. Wang, L. Wang, C. Dong [et al.] // *Exploration (Beijing)*. – 2025. – Vol. 5, No. 4. – P. e20240044.
308. Wang, S. Viral vectored vaccines: design, development, preventive and therapeutic applications in human diseases / S. Wang, B. Liang, W. Wang [et al.] // *Signal Transduct Target Ther*. – 2023. – Vol. 8, No. 1. – P. 149.
309. Wang, X. Understanding the impact of in vitro transcription byproducts and contaminants / X. Wang, J. Zhang, Y. Liu [et al.] // *PMC Biophysics and Molecular Biology*. – 2024. – Vol. 15, No. 3. – P. 112 – 126.
310. Weber, J. S. Individualised neoantigen therapy mRNA-4157 (V940) plus pembrolizumab versus pembrolizumab monotherapy in resected melanoma (KEYNOTE-942): a randomised, phase 2b study / J. S. Weber, M. S. Carlino, A. Khattak [et al.] // *The Lancet*. – 2024. – Vol. 403, No. 10427. – P. 632 – 644.

311. Weingarten-Gabbay, S. Systematic Discovery of Cap-Independent Translation Sequences in Human and Viral Genomes / S. Weingarten-Gabbay, S. Elias-Kirma, R. Nir [et al.] // Science. – 2016. – Vol. 351. – P. aad4939.
312. Weinblatt, M. E. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients managing concomitant methotrexate / M. E. Weinblatt, E. C. Keystone, F. C. Furst [et al.] // Arthritis & Rheumatism. – 2003. – Vol. 48, No. 1. – P. 35 – 45.
313. Werzberger, A. A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in a high-risk population / A. Werzberger, B. Mensch, B. Kuter [et al.] // New England Journal of Medicine. – 1992. – Vol. 327, iss. 7. – P. 453 – 457.
314. Wesselhoeft, R. A. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells / R. A. Wesselhoeft, P. S. Kowalski, D. G. Anderson // Nat Commun. – 2018. – Vol. 9. – P. 2629.
315. Wesselhoeft, R. A. RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In Vivo / R. A. Wesselhoeft, P. S. Kowalski, F. C. Parker-Hale [et al.] // Mol Cell. – 2019. – Vol. 74, No. 3. – P. 508 – 520.e4.
316. Whelan, S. P. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones / S. P. Whelan, L. A. Ball, J. N. Barr, G. T. Wertz // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1995. – Vol. 92, № 18. – P. 8388 – 8392.
317. Whitt, M. A. Ebola Virus Glycoprotein: Proteolytic Processing, Acylation, and Tropism Outcomes in Pseudotyped and Recombinant Vesicular Stomatitis Viruses / M. A. Whitt, H. Feldmann, A. Takada [et al.] // Journal of Virology. – 2001. – Vol. 75, No. 3. – P. 1576 – 1580.
318. WHO COVID 19 dashboard: deaths: (interactive dashboard) // World Health Organization. – URL: who.int (дата обращения: 20.06.2026). – Текст: электронный.
319. Wolff, J. A. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo / J. A. Wolff, R. W. Malone, P. Williams [et al.] // Science. – 1990. – Vol. 247, № 4949. – P. 1465 – 1468.

320. Yahalom-Ronen, Y. A single dose of recombinant VSV-ΔG-spike vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge / Y. Yahalom-Ronen, H. Tamir, S. Melamed [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 6402.
321. Yang, Y. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine / Y. Yang, X. Fan, M. Mao [et al.] // *Cell Research*. – 2017. – Vol. 27. – P. 626 – 641.
322. Yang, Y. IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome / Y. Yang, Z. Wang // *Journal of Molecular Cell Biology*. – 2019. – Vol. 11. – P. 911 – 919.
323. Yue, X. Circ mRNA based multivalent neuraminidase vaccine induces broad protection against influenza viruses in mice / X. Yue, C. Zhong, R. Cao [et al.] // *npj Vaccines*. – 2024. – Vol. 9, No. 1. – P. 170.
324. Zadeh Mehrizi, T. Application of non-metal nanoparticles, as a novel approach, for improving the stability of blood products: 2011 – 2021 / T. Zadeh Mehrizi, M. Shafiee Ardestani // *Prog Biomater*. – 2022. – Vol. 11. – P. 137 – 161.
325. Zell, R. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae / R. Zell, E. Delwart, A. E. Gorbalenya [et al.] // *J Gen Virol*. – 2017. – Vol. 98, No. 10. – P. 2421 – 2422.
326. Zhang, J. Construction and application of adenoviral vectors / J. Zhang, Y. Deng, S. Tian [et al.] // *Molecular Therapy – Nucleic Acids*. – 2023. – Vol. 33. – P. 841 – 851.
327. Zhang, L. J. Advancements in the application and research of baculovirus-vectored vaccines for respiratory infectious diseases / L. J. Zhang, H. T. Wang, Y. L. Liu [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2025. – Vol. 16. – Art. no. 1558482.
328. Zhang, X. Layer-by-layer surface modification of selenium nanoparticles for siRNA delivery / X. Zhang, L. Yu, Y. Chen [et al.] // *Biomaterials Science*. – 2021. – Vol. 9, № 8. – P. 2910 – 2923.

329. Zhang, X. Research progress on immune mechanism and control of double-stranded RNA contaminants during in vitro transcription of mRNA / X. Zhang, L. Wang, Y. Liu [et al.] // *Expert Review of Vaccines*. – 2025. – Vol. 24, No. 1. – P. 45 – 58.
330. Zhang, Y. Lipoplex-mediated therapeutic mRNA delivery: principles, formulation, and in vivo applications / Y. Zhang, M. L. Alameh, D. Weissman // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2024. – Vol. 204. – Art. 115148.
331. Zhang, Y. PCR-generated DNA templates enable efficient, rapid, and scalable in vitro transcription for mRNA synthesis / Y. Zhang, Q. Zhou, L. Ma [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 2025. – Vol. 685. – P. 115 – 124.
332. Zhao, J. J. Translational Selenium Nanoparticles Promotes Clinical Non-Small-Cell Lung Cancer Therapy by Modulating the Tumor Immune Microenvironment / J. J. Zhao, M. H. Wang, L. Y. Zhang [et al.] // *Advanced Materials*. – 2025. – Vol. 37, № 15. – Art. 2410512.
333. Zharikova, D. Influenza Type A Virus Escape Mutants Emerge In Vivo in the Presence of Antibodies to the Ectodomain of Matrix Protein 2 / D. Zharikova, K. Mozdzanowska, J. Feng [et al.] // *J Virol*. – 2005.
334. Zhivaki, D. Innate immune detection of lipid oxidation as a threat assessment strategy / D. Zhivaki, J. C. Kagan // *Nat. Rev. Immunol.* – 2022. – Vol. 22. – P. 322 – 330.
335. Zhou, J. Circular mRNA vaccines against monkeypox virus provide potent protection against vaccinia virus infection in mice / J. Zhou, T. Ye, Y. Yang [et al.] // *Mol Ther.* – 2024. – Vol. 32, No. 6. – P. 1779 – 1789.
336. Zhou, R. Circular RNA-based HPV16 therapeutic vaccine elicits potent and durable antitumor immunity / R. Zhou, C. Li, K. Xiang [et al.] // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2026. – Vol. 45, No. 1. – P. 33.
337. Zhou, X. Generation of cytotoxic and humoral immune responses by nonreplicative recombinant Semliki Forest virus / X. Zhou, P. Berglund, H. Zhao [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1995. – Vol. 92, No. 7. – P. 3009 – 3013.

338. ZyCoV-D Safety and Immunogenicity of a DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): Results of an open-label, non-randomized phase I part of phase I/II clinical study by intradermal route in healthy subjects in India / T. Momin, K. Kansagra, H. Patel [et al.] // *EClinicalMedicine*. — 2021. — Vol. 38. — P. 101020. DOI: 10.1016/j.eclinm.2021.101020