



УДК 577.214.5

ПЛАТФОРМА мРНК-ВАКЦИН: ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ И ДОСТАВКИ мРНК

© 2023 г. В. Р. Литвинова*, #, А. П. Рудомётов*, Л. И. Карпенко*, А. А. Ильичёв*

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
Россия, 630559 Новосибирская область, р.п. Кольцово

Поступила в редакцию 02.09.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 21.09.2022 г.

Вакцинация — наиболее эффективный метод предотвращения инфекционных заболеваний. Один из новых подходов к созданию вакцин — это вакцины на основе мРНК, которые обладают рядом весьма полезных преимуществ по сравнению с другими типами вакцин. Поскольку мРНК кодирует только целевой антиген, отсутствует потенциальный риск инфицирования, как это может произойти в случае аттенуированного или инактивированного патогена. Принцип действия мРНК-вакцин заключается в том, что их генетическая информация реализуется только в цитозоле клетки, благодаря этому крайне мала вероятность интеграции мРНК в геном организма-хозяина. мРНК-вакцины способны индуцировать специфический клеточный и гуморальный иммунные ответы, но не вызывают антивекторный иммунный ответ. Платформа мРНК-вакцин позволяет легко проводить замену целевого гена, не изменяя технологию производства, что важно для решения проблемы временного разрыва между началом эпидемии и производством вакцины. В обзоре рассмотрены история мРНК-вакцин, технология их получения, способы повышения стабильности мРНК, описание модификаций кэпа, поли(А)-хвоста, кодирующей и не кодирующей частей мРНК, очистка целевой мРНК-вакцины от побочных продуктов, а также различные способы доставки.

Ключевые слова: РНК, мРНК-вакцины, химически модифицированные нуклеотиды, нетранслируемые 5'- и 3'-области, способы доставки мРНК

DOI: 10.31857/S01323423202015X, EDN: PGBVWC

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	135
ИСТОРИЯ мРНК-ВАКЦИН.....	135
ТИПЫ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ РНК.....	136
СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ мРНК.....	137

Сокращения: 3'-UTR — 3'-нетранслируемая область гена; 5'-UTR — 5'-нетранслируемая область гена; ARCA — анти-реверсивный аналог кэпа; CBP — кэп-связывающие белки; COVID-19 — коронавирусная инфекция 2019 года; CPP — пептиды, проникающие в клетки; IVT — транскрибированный *in vitro*; LNP — липидные наночастицы; ORF — открытая рамка считывания; PAMAM — полиамидамин; PEI — поли-этиленмин; PGS — конъюгат полиглюкин–спермидин (спермидин — N1-(3-аминопропил)бутан-1,4-диамин); PRR — рецепторы распознавания образов; PABP — поли(А)-связывающие белки; RIG-I — белок I, индуцируемый ретиновой кислотой; SARS-CoV-2 — коронавирус-2 тяжелого острого респираторного синдрома; TLR — Toll-подобные рецепторы; дцРНК — двухцепочечная РНК; ОФ ВЭЖХ — обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ПЭГ — полиэтиленгликоль (поли(оксиэтилен)); саРНК — самоамплифицирующаяся РНК.

Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-47-10, 22-29; эл. почта: viktoriya_litvinova_1999@mail.ru).

Структура кэпа.....	137
Последовательность поли(А) на 3'-конце мРНК — поли(А)-хвост.....	140
Некодирующие области в составе мРНК.....	141
Оптимизация кодирующей последовательности в составе мРНК.....	142
Модифицированные нуклеозиды в составе мРНК.....	142
ОЧИСТКА мРНК-IVT ОТ дцРНК.....	143
ДОСТАВКА мРНК <i>in vivo</i>	144
Липидные наночастицы.....	144
Поликатионные полимеры.....	147
Физические способы доставки.....	148
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	149

ВВЕДЕНИЕ

Вакцинация — наиболее эффективный метод предотвращения инфекционных заболеваний.

Один из новых подходов к созданию вакцин — это вакцины на основе мРНК. мРНК-вакцины имеют ряд весьма полезных преимуществ по сравнению с другими типами вакцин. Во-первых, мРНК-вакцины отличаются безопасностью: мРНК кодирует только целевой антиген, вследствие этого отсутствует потенциальный риск инфицирования, как это может произойти в случае применения аттенуированных и инактивированных вакцин, и уменьшается нагрузка на иммунную систему. Во-вторых, принцип действия мРНК-вакцин заключается в том, что их генетическая информация реализуется только в цитозоле клетки, ядерная локализация не требуется, поэтому вероятность интеграции мРНК в геном организма-хозяина крайне низка. Кроме того, мРНК-вакцины, как и ДНК-вакцины, способны индуцировать клеточный и гуморальный иммунные ответы. И наконец, мРНК — минимальный генетический вектор, поэтому иммунизация не вызывает антивекторного иммунного ответа, и мРНК-вакцины можно вводить повторно. Также мРНК легко выводится из организма, а ее период полужизни *in vivo* можно регулировать с помощью различных модификаций структурных элементов мРНК и способов доставки в клетки [1].

Производство вакцин на основе мРНК при развитой инфраструктуре — это быстрое, недорогое, масштабируемое и однотипное производство. Платформа мРНК-вакцин позволяет легко проводить замену целевого гена, не изменяя технологию производства. Вышеперечисленные преимущества мРНК-вакцин позволяют решить весьма важную проблему вакцинопрофилактики ряда вирусных заболеваний, а именно проблему временного разрыва между началом эпидемии и производством вакцины.

Обзор посвящен технологии получения мРНК-вакцин, в том числе истории мРНК-вакцин, способам повышения стабильности мРНК, описанию модификаций кэпа, поли(А)-хвоста, кодирующей и не кодирующей частей мРНК, очистке целевой мРНК-вакцины от побочных продуктов, а также различным способам доставки.

ИСТОРИЯ мРНК-ВАКЦИН

Первые статьи по получению биологически активной мРНК были опубликованы в 1984 г. Кригом, Мелтоном, Маниатисом и Грином, которые использовали T7 РНК-полимеразу для получения биологически активной мРНК — метод, который по своей сути используется и сегодня. В их число входит статья Крига с соавт., которые ввели полученную мРНК в яйцеклетки лягушек и

показали, что она работает точно так же, как природная мРНК [2]. В 1987 г. Мелтон обнаружил, что мРНК можно использовать как для активации, так и для подавления синтеза белка. И Мелтон, и Криг рассматривали синтетическую мРНК главным образом как исследовательский инструмент для изучения функций и активности генов, т.е. не рассматривали мРНК как платформу для вакцин.

В 1990 г. Вулф с соавт. показали возможность экспрессии синтетической мРНК в организме животных [3]. В своей работе авторы вводили мРНК репортерных генов хлорамфениколацетилтрансферазы, люциферазы и β -галактозидазы мышам и показали образование соответствующих белковых продуктов в организме животных. Последующее исследование, проведенное в 1992 г., продемонстрировало, что введение в гипоталамус мРНК, кодирующей вазопрессин, вызывает физиологический эффект у крыс [4]. После того, как была продемонстрирована способность синтетических мРНК обеспечивать синтез белка в организме, начали появляться публикации об их изучении в качестве средств профилактики и терапии. Однако исследователи столкнулись с рядом проблем — физической нестабильностью мРНК, ее иммуностимулирующими свойствами и трудностями прохождения через клеточную мембрану [5]. Поэтому многие ученые сконцентрировали основное внимание на работе с ДНК ввиду ее высокой природной стабильности и простого получения *in vitro*. В то же время у ДНК-вакцин имеется ряд недостатков, таких как низкая иммуногенность при введении в организм и опасность интеграции в геном клетки-хозяина. мРНК-вакцины этих недостатков лишены, поэтому работы с мРНК также продолжались [6, 7].

В 2000 г. вышла публикация Хорра с соавт., которые сообщили, что прямые инъекции мРНК могут вызывать иммунный ответ у мышей [8]. В этом же году Хорром была основана компания CureVac, где прошли первые испытания мРНК на людях. Главный научный сотрудник компании Стив Пасколо был первым субъектом исследования: он ввел себе мРНК [9].

Неоценимый вклад в развитие мРНК-вакцин как платформы внесла Каталин Карико. В 1999 г. вышла публикация в соавторстве с Дрю Вайсманом, в которой описывалась работа по созданию вакцины против ВИЧ-1 на основе мРНК. К сожалению, синтезированные мРНК при введении мышам вызвали массивные воспалительные реакции [10]. Вскоре авторы выяснили природу этого явления. Оказалось, что синтетическая мРНК активировала ряд клеточных рецепторов, извест-

ных как Toll-подобные рецепторы, которые первыми реагируют на проникновение РНК патогена [11]. В 2005 г. Карико с соавт. сообщили, что включение в состав мРНК аналога уридина — псевдоуридина — не позволяло иммунной системе организма идентифицировать экспериментальную мРНК как чужеродную [12].

Немногие ученые в то время понимали терапевтическую ценность этих модифицированных нуклеотидов, но вскоре научный мир осознал их потенциал [13]. В 2008 г. крупные фармацевтические компании Novartis и Shire создали подразделения по исследованию мРНК: первая сосредоточилась на вакцинах, вторая — на средствах терапии. В это же время к разработкам по созданию на основе мРНК-технологий подключились такие компании, как BioNTech и Moderna. К 2019 г. Moderna разработала девять кандидатных мРНК-вакцин от инфекционных заболеваний, вызываемых такими вирусами, как коронавирус, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, цитомегаловирус, вирусы гриппа, Эпштейна—Барр, иммунодефицита человека, Зика, Нипах. Примерно такой же спектр вакцин разрабатывался немецкой компанией BioNTech. Ни одна из разрабатываемых вакцин не была лицензирована [14].

Прорыв с внедрением вакцин на основе мРНК произошел в начале 2020 г. после возникновения пандемии COVID-19. Так, американские разработчики мРНК-вакцины против коронавируса-2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) — компания Moderna Inc. совместно с Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID) — создали прототип вакцины mRNA-1273 в беспрецедентно короткие сроки. Потребовалось всего 63 дня от выбора вирусной последовательности для создания вакцины до проведения первой фазы клинических испытаний. Примерно в этих же временных рамках BioNTech в партнерстве с фармацевтической компанией Pfizer также создали мРНК-вакцину от COVID-19 [15].

В результате исследований, проведенных за последние десятилетия, стабильность мРНК и эффективность ее доставки были значительно улучшены. Комбинируя различные модификации структурных элементов мРНК и способы ее доставки в клетки, можно значительно повысить иммуногенность молекул мРНК, что сделало такой подход перспективным для создания вакцин.

ТИПЫ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ РНК

В настоящее время существует два типа РНК-вакцин: на основе нереплицирующейся мРНК и на основе самоамплифицирующейся РНК.

Нереплицирующаяся мРНК-вакцина представляет собой молекулу мРНК, которую получают путем транскрипции *in vitro* с использованием в качестве матрицы плазмидной ДНК, кодирующей целевой иммуноген. Синтезированная мРНК помимо кодирующей последовательности содержит кэп на 5'-конце, нетранслируемые области (UTR) и последовательность поли-А (поли(А)-хвост) на 3'-конце, необходимые для эффективной трансляции, защиты мРНК от экзонуклеаз и правильного сплайсинга транскрипта. Именно на основе нереплицирующихся мРНК были созданы первые разрешенные для человека вакцины против SARS-CoV-2 [16, 17]. Однако проблемы, связанные с нестабильностью мРНК и неэффективностью ее доставки, еще не полностью решены.

Самоамплифицирующиеся РНК (саРНК) представляют собой репликоны, которые включают в себя ген целевого иммуногена, а также элементы генома вируса, обеспечивающие репликацию целевой РНК. Как правило, вирусы, несущие ДНК или РНК, после проникновения в клетку могут копировать ДНК в цитозоле и проникать в ядро. При этом было показано, что для некоторых вирусов характерны репликация и экспрессия в цитозоле [18]. Получаемые репликоны не способны образовывать инфекционные вирусные частицы после инфицирования клетки-хозяина, однако РНК, кодирующая целевой иммуноген, способна к амплификации [19]. Таким образом, увеличивается продукция кодируемого иммуногена по сравнению с нереплицирующимися мРНК. Благодаря устойчивому продуцированию кодируемого иммуногена саРНК при более низкой дозе демонстрируют такой же уровень иммуногенности, как и нереплицирующиеся мРНК. Большинство саРНК получают из одноцепочечных альфа-вирусов с положительной цепью, таких как вирус венозного энцефалита лошадей, вирус Синдбис и вирус леса Семлики [20, 21]. Следует отметить ряд проблем, связанных с использованием вирусных векторов для вакцин. К ним относится иммуногенность самого вектора, которая может вызывать нежелательный иммунный ответ и помешать последующим бустерным введениям вакцины при использовании того же вирусного репликона. Как и в случае с живыми аттенуированными вакцинами, способные к

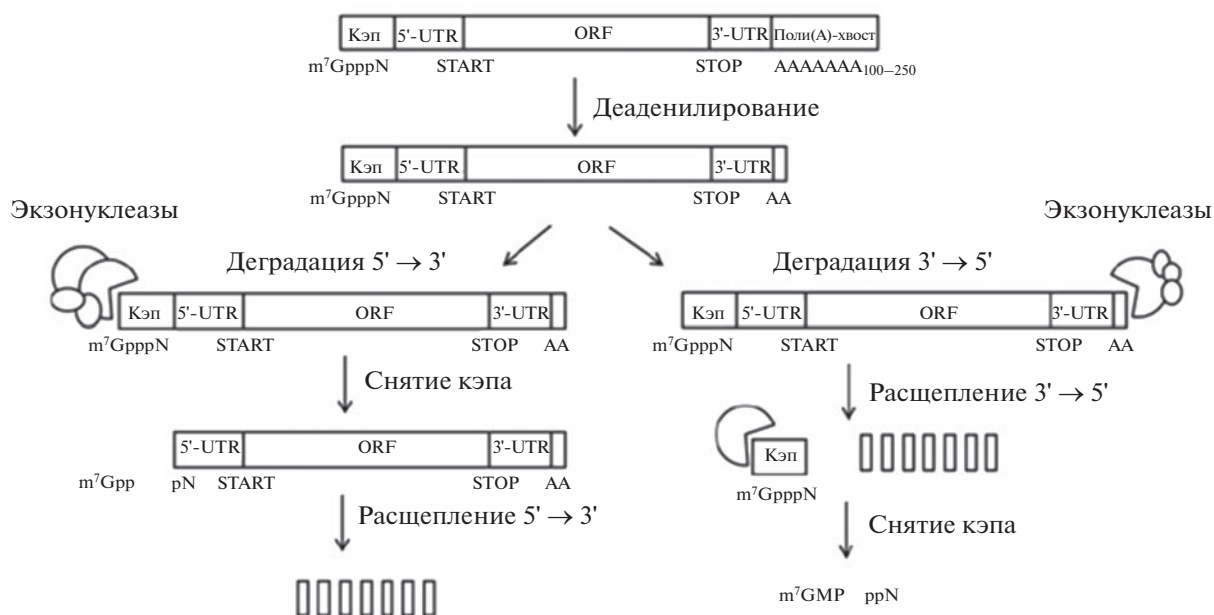


Рис. 1. Схема деградации мРНК. Деградация мРНК происходит в цитоплазме в рибонуклеиновых комплексах, называемых Р-тельцами, которые содержат 5'-3'-экзонуклеазы, декэпирующие и деаденилирующие ферменты. Как только поли(А)-хвост укорачивается до 12 остатков и менее, происходит деградация мРНК путем расщепления кэпа вместе с расщеплением 5' → 3' или 3' → 5' [21]. Также в деградации мРНК могут принимать участие эндонуклеазы (не показаны на рисунке).

репликации альфа-вирусные векторы могут представлять угрозу реактивации вируса [22–24].

В данном обзоре мы рассмотрим особенности получения и доставки нереплицирующихся мРНК-вакцин.

СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ мРНК

Известно, что зрелая мРНК эукариот состоит из пяти значимых частей, которые включают в себя кэп на 5'-конце (m^7GpppN (N – любой нуклеотид)), 5'-нетранслируемую область (5'-UTR), открытую рамку считывания (ORF), 3'-нетранслируемую область (3'-UTR) и 3'-хвост из 100–250 адениловых остатков (поли(А)-хвост), длина которого варьирует в различных типах клеток организма [25]. Основная причина нестабильности мРНК по сравнению с ДНК – наличие гидроксильной группы у 2'-углеродного атома рибозы, что способствует гидролитической деградации молекул РНК. Система врожденного иммунитета способна распознавать чужеродную РНК, тем самым запуская механизмы ее деградации. Основной путь деградации мРНК в клетках эукариот представлен на рис. 1.

Таким образом, в классическом варианте экзогенная мРНК нестабильна и низкоиммуногенна, поэтому для мРНК-вакцин применяют раз-

личные модификации каждого элемента мРНК. На рис. 2 схематично показаны основные структурные элементы мРНК, полученной *in vitro* (IVT), которые могут подвергаться модификациям. Известно, что определенные химические модификации могут увеличивать эффективность трансляции мРНК в клетках. Например, для получения мРНК *in vitro* часто используют модифицированные аналоги 5'-кэпа, такие как антиреверсивный аналог кэпа (ARCA) и CleanCap[®], которые обеспечивают правильное присоединение кэпа. Модификации каждого из данных элементов более подробно рассматриваются ниже [5].

Структура кэпа

Нативная мРНК эукариот обладает 5'-кэп-структурой (рис. 3). Кэп представляет собой структуру m^7GpppN , содержащую модифицированный нуклеозид N7-метилгуанозин (m^7G) и связанную 5'-5'-трифосфатным мостиком с первым транскрибированным нуклеотидом. Кэп играет важную роль в нормальном функционировании мРНК, в том числе в стабилизации мРНК в процессах трансляции, сплайсинга, полиаденилирования и ядерного экспорта, а также в защите мРНК от экзонуклеаз. Кэпирование происходит в ядре, когда транскрибируются первые 20–30 нуклеотидов мРНК в результате трех последова-

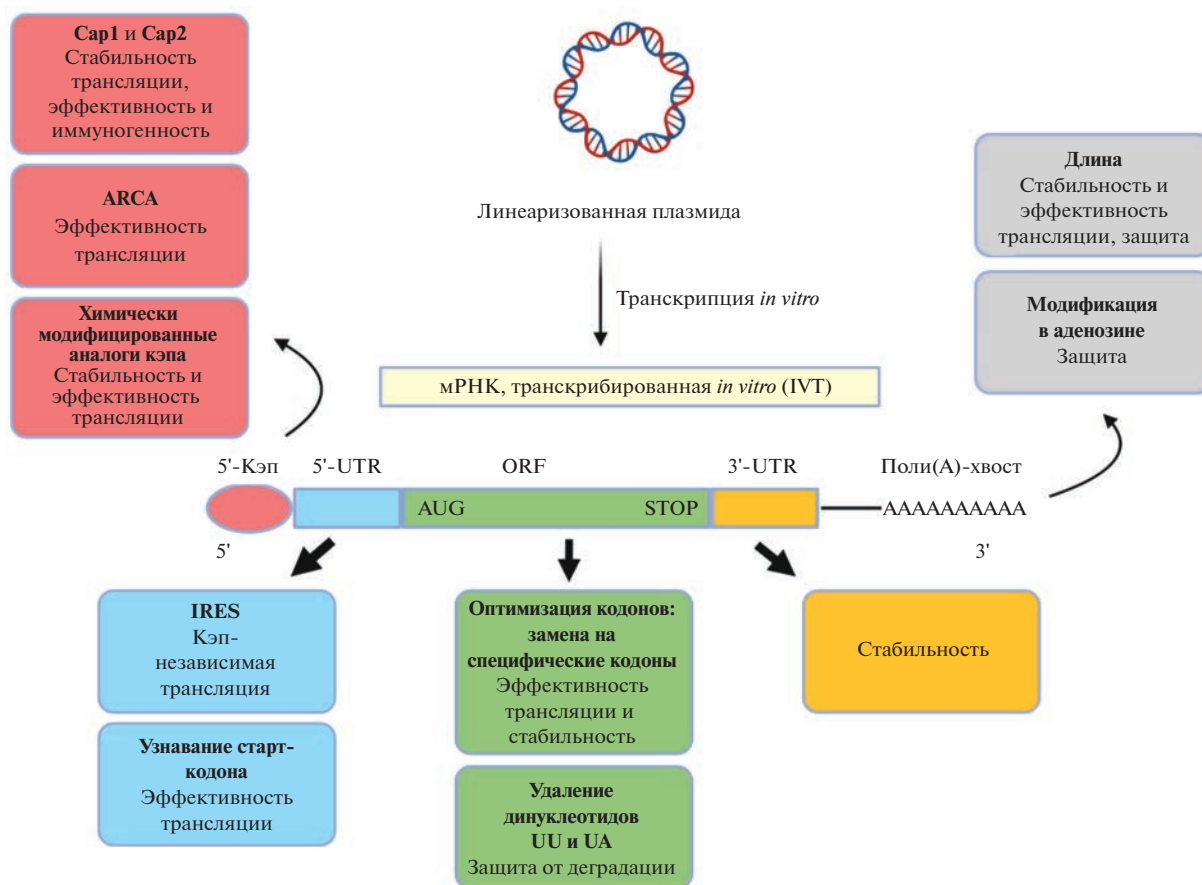


Рис. 2. Схема получения модифицированных мРНК, транскрибированных *in vitro* (IVT). 5'-UTR – 5'-нетранслируемая область, 3'-UTR – 3'-нетранслируемая область, ORF – открытая рамка считывания, ARCA – антиреверсивный аналог кэпа, IRES – участок внутренней посадки рибосомы, AUG – старт-кодон, STOP – стоп-кодон [5].

N7-Метилгуанозин (m7GpppN)

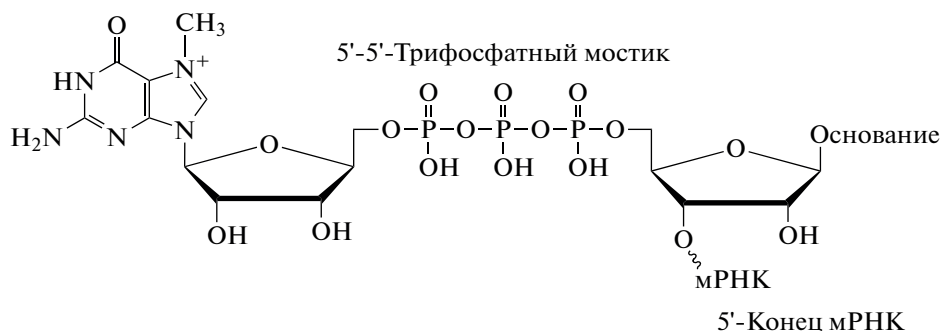


Рис. 3. Структура кэпа (сар0). Кэп – это рибонуклеотид N7-метилгуанозин, соединенный 5'-5'-трифосфатным мостиком с первым нуклеотидным остатком транскрипта.

тельных ферментативных реакций – отщепление фосфатной группы от 5'-концевого нуклеотида транскрипта РНК-трифосфатазой, далее перенос

остатка гуанозинмонофосфата (GMP) на фосфатную группу 5'-концевого нуклеотида гуанил-трансферазой и метилирование остатка гуанина в

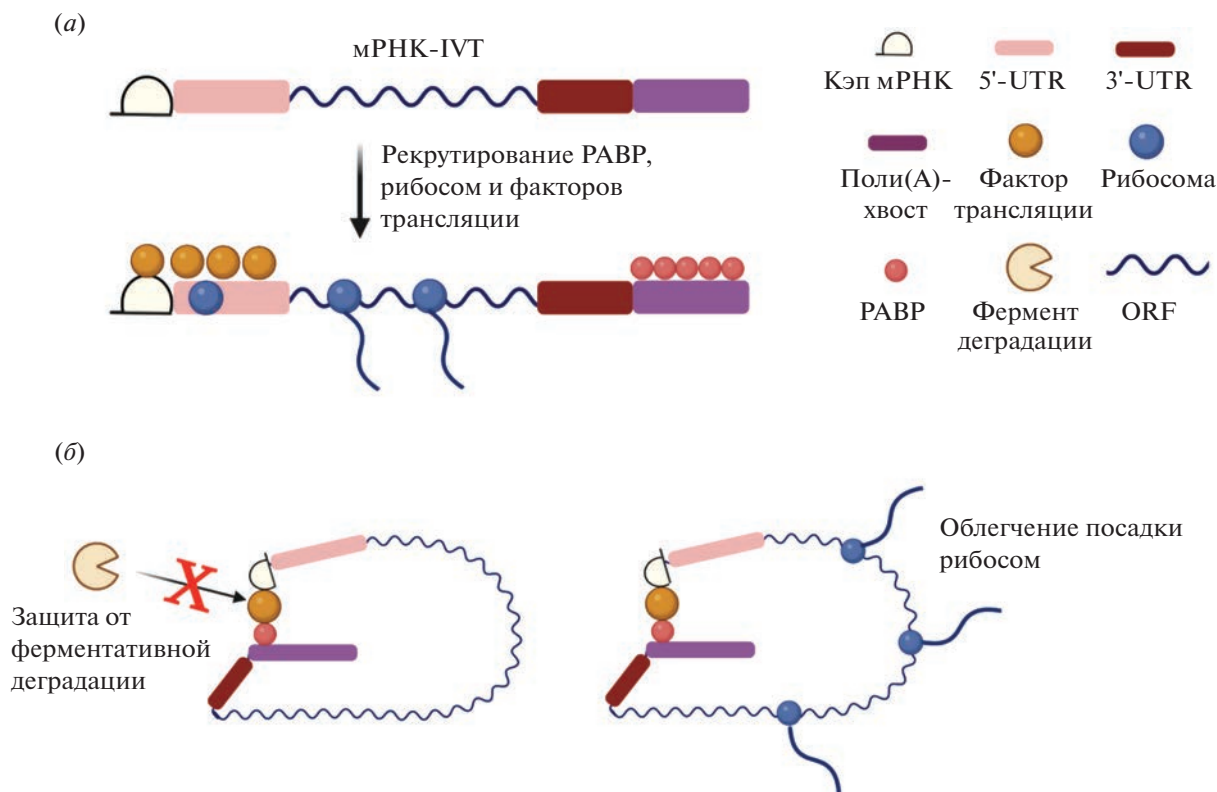


Рис. 4. Модель замкнутой петли мРНК. (а) – мРНК, транскрибируемая *in vitro* (мРНК-IVT), может рекрутировать факторы инициации трансляции, которые связываются с 5'-кэпом и 5'-нетранслируемой областью (5'-UTR), обеспечивая вход в рибосомы и трансляцию, а также рекрутировать поли(А)-связывающий белок (РАВР) в поли(А)-хвосте; (б) – в модели замкнутой петли сильное взаимодействие между факторами трансляции с обеих сторон мРНК индуцирует образование стабильной петли, которая защищает транскрипты от ферментов, разрушающих РНК, и облегчает повторный вход в рибосомы, тем самым усиливая трансляцию [22].

составе гуанозинтрифосфата (GTP) с образованием N7-метилгуанозина гуанил-N7-метилтрансферазой.

Кэп-структура участвует в трансляции мРНК посредством рекрутирования факторов инициации трансляции (например, 4E (eIF4E), критически важного для инициации трансляции), а также посредством формирования модели замкнутой петли мРНК (рис. 4). Кроме того, кэп взаимодействует с кэп-связывающими белками (СВР), необходимыми для ядерного экспорта мРНК [26].

Помимо сар0 в последние годы были идентифицированы две новые структуры 5'-кэпа, сар1 и сар2, и ферменты, участвующие в их синтезе. В этих случаях m7G-специфическая 2'-O-метилтрансфераза (2'-O-МТаза) метилирует второй или третий рибонуклеотид в положении 2'-O-рибоз, генерируя структуры сар1 или сар2 соответственно. Было показано, что сар1 маскирует мРНК от цитозольных сенсоров RIG-I и MDA5, которые вызывают активацию сигнального пути интерферона типа I, что приводит к деградации мРНК.

Таким образом, мРНК с сар1 меньше подвержена воздействию врожденного иммунного ответа. Соответственно, трансляция мРНК с сар1 и наработка целевого белка в организме происходят более эффективно, чем в случае мРНК с сар0 [27].

Важно заметить, что иммунная система организма распознает некэпированную РНК как чужеродную, т.к. наличие кэпа отличает клеточную мРНК от вирусной [5]. Неправильно кэпированные или некэпированные (5'-ppp или 5'-pp) мРНК распознаются рецепторами распознавания образов (PRR), такими как RIG-I и IFIT, которые запускают синтез интерферонов типа I, что, в конечном счете, приводит к деградации РНК. Поэтому для того, чтобы соответствовать химической структуре мРНК эукариот, синтетические транскрипты РНК должны быть кэпированы. В случае вакцины важно достичь максимальной эффективности кэпирования мРНК (в том числе с помощью очистки конечного продукта), чтобы избежать гиперактивации врожденного иммунитета за счет оставшихся некэпированных или неправильно кэпированных продук-

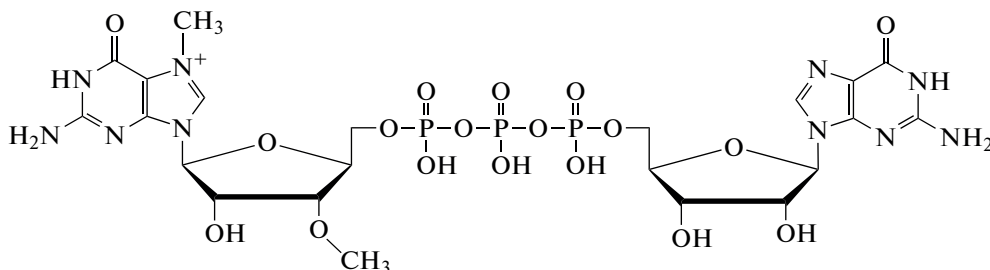


Рис. 5. Структура антиреверсивного аналога кэпа (ARCA).

тов [28]. Кэпирование может быть проведено или после завершения транскрипции — посттранскрипционно (например, с помощью рекомбинантного фермента из вируса осповакцины) или во время транскрипции — котранскрипционно (при введении в общую реакционную смесь аналогов кэпа, таких как ARCA и CleanCap®).

С практической точки зрения при котранскрипционном кэпировании снижается количество этапов при получении мРНК и уменьшается количество ферментов, используемых в работе. Эти факторы имеют решающее значение для снижения стоимости производства мРНК [29]. При этом котранскрипционное кэпирование также имеет ряд ограничений. С одной стороны, не все полученные молекулы мРНК кэпируются из-за конкуренции между аналогом кэпа и гуанозинтрифосфатом (GTP), который выступает инициаторным нуклеотидом. Как следствие, некэпированные РНК могут вызывать нежелательный иммунный ответ. Стратегия снижения такого иммунного ответа заключается в удалении трифосфатов с 5'-конца некэпированной РНК-IVT с помощью фосфатазы. С другой стороны, существует риск встройки аналогов кэпа в обратной ориентации, что препятствует связыванию мРНК с кэп-связывающими белками (СВР) и последующей трансляции [30].

Для решения этих проблем и повышения эффективности трансляции мРНК, транскрибируемой *in vitro*, можно вводить химические модификации (например, присоединение метильных групп) в 3'- или 2'-положение аналогов кэпа. Данные модификации предотвращают появление обратной ориентации кэпа и повышают качество получаемой мРНК. Так, был предложен антиреверсивный аналог кэпа (ARCA), который содержит модифицированную кэп-структуру, представляющую собой динуклеотид $m^{7,3'-O}GpppG$ (рис. 5) [31]. ARCA содержит метильную группу, присоединенную к 3'-ОН нуклеотида m^7G , с по-

мощью которой в ходе синтеза РНК обеспечивается правильное присоединение кэпа [5].

Кроме того, сообщалось, что введение дополнительных модификаций кэпа и удлиненные 5'-5'-фосфатные мостики в ARCA также повышают эффективность трансляции и стабильность мРНК. Принцип действия ARCA представлен на рис. 6 [32].

К настоящему времени структура ARCA была усовершенствована, и был разработан антиреверсивный аналог кэпа второго поколения CleanCap®, с помощью которого можно включить в состав мРНК структуру cap1. Его использование приводит к большим выходам кэпированной мРНК (до 95%) по сравнению с использованием аналогов кэпа первого поколения ARCA. Структура аналога кэпа второго поколения CleanCap® представлена на рис. 7 [29]. CleanCap® используется при получении мРНК-вакцин BNT162b1 и BNT162b2 компании BioNTech/Pfizer [33, 34].

Последовательность поли(А) на 3'-конце мРНК — поли(А)-хвост

Поли(А)-хвост — один из ключевых элементов эффективной трансляции и повышения стабильности мРНК [35]. В клетках млекопитающих наиболее активно транслируемые мРНК содержат 100–250 остатков аденозина [36]. Минимальная длина, при которой начинается трансляция экзогенной мРНК, составляет 20 остатков аденозина [37]. Участие поли(А)-хвоста в процессе трансляции состоит в том, что он связывается с многочисленными полиаденозил-связывающими белками (РАВР), которые в свою очередь связываются с эукариотическим фактором инициации трансляции 4G (eIF4G). Как было сказано выше, образуется кольцевая структура с замкнутой петлей кэп-eIF4E-eIF4G-РАВР-поли(А), которая облегчает присоединение рибосом и защищает мРНК от нуклеазной дегградации [38].

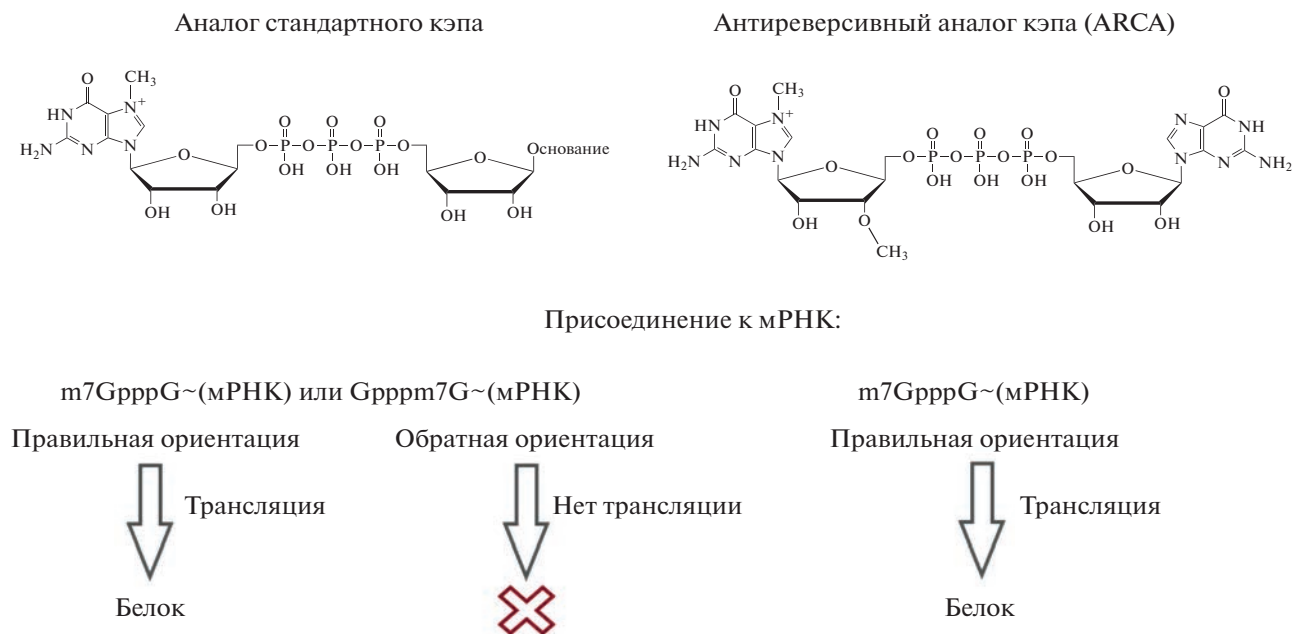


Рис. 6. Схема действия антиреверсивного аналога кэпа (ARCA).

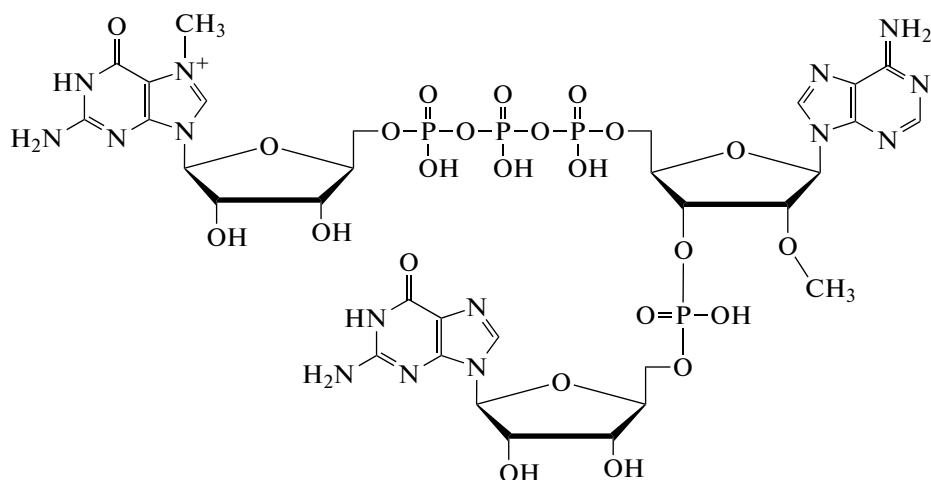


Рис. 7. Структура аналога кэпа второго поколения CleanCap®.

Для мРНК, транскрибируемой *in vitro*, поли(А)-хвост можно получить двумя способами. Первый способ — присоединение остатков аденозина к 3'-концу с помощью ферментативного синтеза с использованием поли(А)-полимеразы, которая позволяет присоединить до 200 остатков аденозина к молекуле мРНК, однако при этом получается гетерогенный продукт. Второй способ — присоединение поли(А)-хвоста с помощью матричного синтеза. В этом случае в ДНК-матрицу закладывается фрагмент с определенным количеством остатков тимидина. Как правило, из-за неустойчивости поли(А)-последовательности в

матрице с помощью матричного синтеза удастся добавить не более 120 остатков аденозина [39].

Некодирующие области в составе мРНК

Кодирующая область фланкирована некодирующими областями (UTR) как с 5'-, так и с 3'-конца. Эти области не кодируют белок, но их последовательности, длина и вторичные структуры важны для регуляции трансляции мРНК. Известно, что 5'-UTR участвует в инициации трансляции, тогда как 3'-UTR влияет на стабильность мРНК и эффективность ее элонгации [5].

Большинство мРНК эукариот содержат сигналы распада в 3'-нетранслируемых областях (3'-UTR), которые влияют на их стабильность. Сообщалось, что различные AU-богатые последовательности в 3'-UTR участвуют в удалении поли(А)-хвоста. Время полужизни мРНК увеличивается, когда AU-богатые последовательности заменяются последовательностями 3'-UTR из стабильной мРНК [39]. Например, наличие специфических последовательностей мРНК α -глобина или β -глобина человека (или двух копий 3'-UTR гена β -глобина человека [40]) в этой области увеличивает стабильность мРНК-IVT и продолжительность продукции белка соответственно.

Консенсусная последовательность Козак, расположенная в 5'-UTR, также играет важную роль в инициации процесса трансляции. Последовательность Козак, определяемая как RCCAUGG , где R представляет собой пурин (A или G), считается предпочтительной последовательностью для инициации трансляции. В этой последовательности некоторые нуклеотиды более важные, в частности позиции -3 и $+4$ относительно аденозина стартового кодона AUG. Для повышения эффективности распознавания стартового кодона AUG нуклеотид G должен находиться в положении $+4$, а нуклеотиды A или G – в положении -3 [5].

Оптимизация кодирующей последовательности в составе мРНК

Кодонный состав области, кодирующей последовательность белка, также может влиять на эффективность трансляции и стабильность мРНК. Открытую рамку считывания (ORF) можно модифицировать на уровне кодонов, регулируя скорость элонгации трансляции, либо путем подбора оптимальной вторичной структуры мРНК [28]. Существуют разные стратегии оптимизации кодонов, например, замена нескольких редких кодонов более частыми, кодирующими ту же аминокислоту. Другая стратегия – оптимизация использования дикодонов, другими словами, использование пар кодонов, которые вместе обеспечивают оптимальную трансляцию. Было показано, что уменьшение количества динуклеотидов UU и UA в ORF защищает мРНК-IVT от действия декэпирующих ферментов [41, 42]. Третья стратегия заключается в использовании последовательности ORF с такими же соотношениями кодонов, как во встречающихся в природе высокоэкспрессируемых генах [5].

Оптимальные кодоны рядом с иницирующим кодоном увеличивают скорость элонгации, что приводит к более высокому уровню трансля-

ции мРНК. Напротив, редкие кодоны обеспечивают низкую скорость элонгации, что способствует скоплению рибосом на молекуле мРНК. Это нарушение элонгации позволяет связывать DEAD-Box РНК-геликазу с транскриптом и ускоряет распад мРНК после 5'-декэпирования. В то же время высокая скорость элонгации не всегда желательна. Иногда она может препятствовать правильной укладке кодируемого белка, как это было показано на оптимизированной по кодонному составу мРНК люциферазы светлячка, которая потеряла 50% своей активности [43]. В таких случаях редкие кодоны могут обеспечить более низкую скорость трансляции и, следовательно, нужную укладку белка, что важно для достижения правильной конформации антигена. Следовательно, в зависимости от целевого антигена необходимо использовать разные стратегии оптимизации кодонного состава целевой мРНК. Оптимизация всех кодонов подходит в случае мРНК-вакцин на основе линейных эпитопов. Напротив, сложные антигены могут требовать медленной скорости трансляции для нормальной укладки белковых доменов и получения правильной конформации эпитопов. В любом случае рекомендуется избегать использования редких кодонов в обеих стратегиях для оптимизации биосинтеза белка [28].

Также оптимизацию часто осуществляют путем перекодирования концевых кодонов с U на C. Все U-нуклеотиды в мРНК-вакцинах чаще всего заменяют на N1-метилпсевдоуридин или псевдоуридин, что более подробно описано в следующем разделе. Эти модифицированные нуклеотиды могут быть комплементарны всем остальным нуклеотидам, что в некоторых случаях может приводить к неканоническому спариванию оснований и нарушению первичной структуры кодируемого белка. Например, GAΨ, кодирующий Asp, может спариваться с антикодоном тРНК^{Glu}, что приводит к несинонимичным заменам. Для кодонов с концевым цитозином такой проблемы нет [44].

Модифицированные нуклеозиды в составе мРНК

При введении мРНК в организм следует учитывать, что она может восприниматься как чужеродная и вызывать нежелательный врожденный иммунный ответ, что приводит к деградации мРНК и воспалительным реакциям. И ДНК, и РНК стимулируют врожденный иммунитет млекопитающих путем взаимодействия с рецепторами распознавания образов (PRR), включая Toll-подобные рецепторы (TLR) и сенсоры цитоплазматиче-

ской РНК, такие как белок I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I). Известно, что остатки уридина активируют TLR7, а богатые GU и AU цепи РНК активируют TLR7 и TLR8 [5]. Было идентифицировано 13 TLR, четыре из которых (TLR3 для двухцепочечной РНК (дцРНК), TLR7 и TLR8 для U-богатой одноцепочечной РНК, TLR9 для мотива ДНК CpG) участвуют в распознавании нуклеиновых кислот. Сообщалось, что препараты мРНК-IVT вызывают сильный TNF- α -ответ в дендритных клетках (DC) [45].

Считается, что использование модифицированных нуклеозидов (рис. 8) для транскрипции *in vitro* приводит к значительному подавлению TLR-опосредованной активации дендритных клеток (DC), однако влияние модифицированных нуклеозидов на TLR-независимый иммунный ответ еще не изучено. Модифицированные нуклеозиды могут повышать эффективность мРНК-вакцины двумя разными способами. Во-первых, они предотвращают образование дцРНК во время транскрипции *in vitro*, во-вторых, предотвращают активацию рецепторов распознавания образов (PRR) при введении мРНК в организм [28]. Поскольку многие модифицированные нуклеозиды, такие как псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин, 2-тиоуридин, 5-метилцитидин, 6-метиладенозин, инозин, и 2'-O-метилированные нуклеозиды на 5'-концевом экзоне присутствуют в РНК млекопитающих, эти нуклеозиды могут использоваться для снижения нежелательной иммунной реакции на вводимую мРНК [46]. В одобренных вакцинах mRNA-1273 (Moderna) и BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) используется N1-метилпсевдоуридин [16, 17].

В то же время существует другой подход к созданию мРНК-вакцин — без использования модифицированных нуклеозидов. CureVac применила свою технологию получения мРНК для разработки вакцины против SARS-CoV-2, предназначенной для максимальной продукции белка и сбалансированной активации иммунитета. Технология CureVac включает в себя оптимизацию кодирующей части по кодонному составу, нетранслируемых областей в составе мРНК и модификации поли(А)-хвоста: было увеличено GC-содержание в кодирующей части, в состав мРНК включены нетранслируемые области из высокоэкспрессируемых и стабильных мРНК известных генов, вместо классического поли(А)-хвоста использована последовательность “гистоновый ствол—петля”. Так, были разработаны мРНК-вакцины CVnCoV и CV2CoV против SARS-CoV-2. Они состоят из инкапсулированной в липидные наночастицы мРНК, кодирующей полноразмерный S-белок с двумя мутациями пролина (S-2P) [47, 48]. Однако при испытаниях данных вакцин выяснилось, что их эффективность гораздо ниже, чем у мРНК-вакцин с модифицированными нуклеозидами [49].

ОЧИСТКА мРНК-IVT ОТ дцРНК

Одной из причин активации врожденного иммунитета при введении мРНК, полученной *in vitro*, могут быть примеси дцРНК, которые образуются в процессе транскрипции. Было показано, что T7-полимераза часто продуцирует побочные продукты — дцРНК, которые могут активировать цитозольные сенсоры RIG-I и MDA5. дцРНК образуются путем гибридизации смыслового транс-

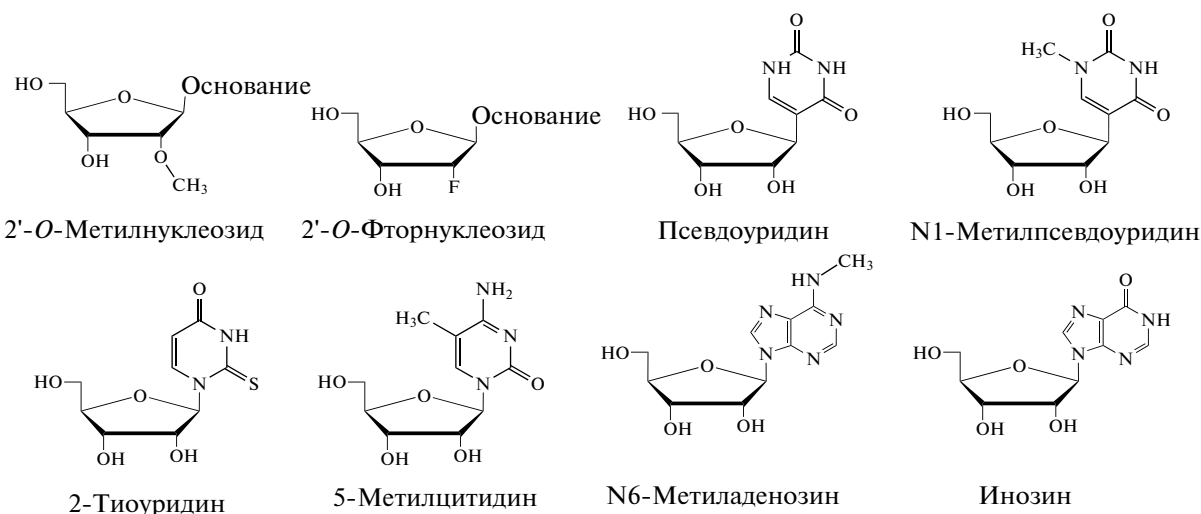


Рис. 8. Структуры модифицированных нуклеозидов.

крипта с его полностью комплементарным антисмысловым транскриптом. Антисмысловая РНК продуцируется путем независимой от промотора инициации транскрипции с 3'-конца (–) ДНК-матрицы [42].

Было показано, что очистка мРНК от примесей дцРНК может привести более чем к 100-кратному увеличению продукции белка в дендритных клетках человека [50].

Очисткой с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) можно удалить из конечного продукта дцРНК, образующуюся в результате транскрипции *in vitro*. Это предотвращает активацию врожденного иммунитета и деградацию мРНК в организме, что, в конечном счете, увеличивает продукцию целевого белка. Однако очистка с использованием ОФ ВЭЖХ имеет очень высокую стоимость, требует сложного оборудования и расходных материалов, характеризуется трудностью масштабирования процесса и необходимостью утилизации опасных отходов [51].

Известен метод очистки, который позволяет избежать проблем, связанных с ОФ ВЭЖХ, и позволяет устранять до 90% дцРНК. Предполагается, что дцРНК селективно связывается с целлюлозой в буфере, содержащем этанол. Этот метод – дешевый, быстрый и масштабируемый, он подходит для очистки большого количества мРНК с использованием быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC) без образования токсичных или опасных отходов. Важно, что после внутри-

венной инъекции мышам наблюдаются сравнимые уровни трансляции мРНК, очищенной с помощью ОФ ВЭЖХ и с помощью целлюлозы [50].

ДОСТАВКА мРНК *in vivo*

Для полноценного функционирования мРНК должна избежать внеклеточной деградации нуклеазами, остаться интактной и проникнуть в клетку. Поскольку поглощение индивидуальных нуклеиновых кислот клетками неэффективно, были предложены различные варианты их доставки с использованием как вирусных, так и невирусных систем доставки.

Для невирусной доставки мРНК используются подходы, которые можно разделить на две группы: 1) доставка мРНК, инкапсулированной в липосомы или в различные поликатионные полимеры; 2) доставка мРНК через клеточную мембрану за счет физических воздействий, с использованием электропорации, генных пушек, ультразвука или инъекции под высоким давлением [52]. Эти методы могут использоваться как *in vivo*, так и *in vitro*.

Липидные наночастицы

Липидные наночастицы (LNP) – одна из наиболее часто используемых систем доставки мРНК. LNP часто состоят из четырех компонентов (рис. 9): 1) ионизируемого катионного липида, который обеспечивает самосборку частиц и способствует эндосомному высвобождению мРНК в цитоплазму; 2) липид-связанного полиэтиленгликоля

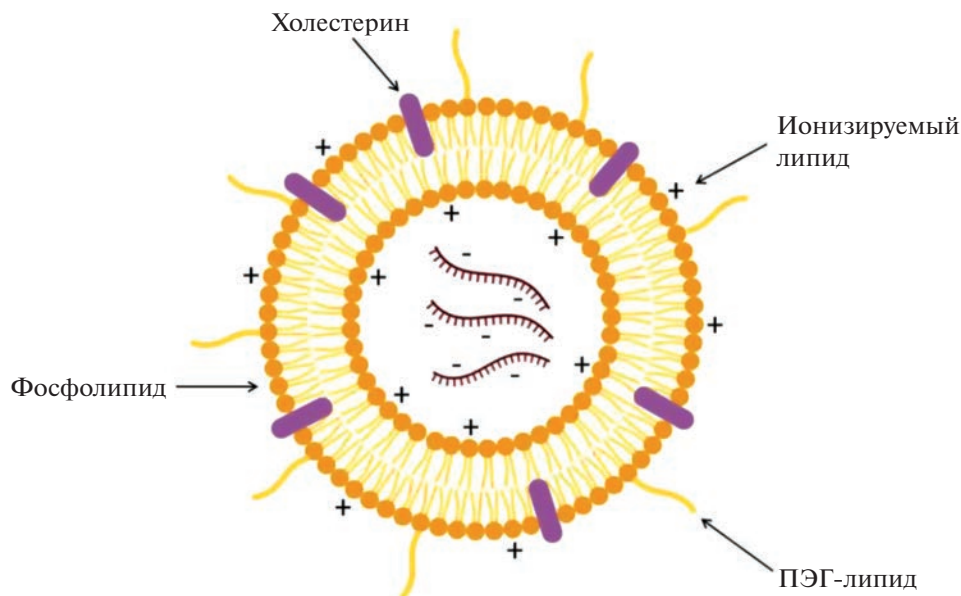


Рис. 9. Структура липидной наночастицы.

(ПЭГ); 3) холестерина, стабилизирующего агента; 4) фосфолипидов, которые поддерживают двухслойную липидную структуру [53, 54]. Уровень и продолжительность трансляции мРНК-LNP-вакцин *in vivo* можно частично контролировать, изменяя способ введения. Было показано, что внутривенное, внутримышечное и подкожное введение комплексов мРНК-LNP вызывает пролонгированную продукцию белка в месте инъекции [55].

Как показано на рис. 10, система доставки мРНК должна взаимодействовать с клеткой-мишенью и проникнуть через цитоплазматическую мембрану в цитоплазму, а после — обеспечить высвобождение мРНК в цитоплазму, чтобы далее она могла достичь рибосом.

Прикрепление компонентов доставки к поверхности клетки может происходить за счет электростатических взаимодействий между компонентами и поверхностью мембраны. Связывание можно улучшить путем включения в системы доставки лигандов, способных взаимодействовать со специфическими рецепторами на клеточной поверхности [56].

Основной механизм проникновения системы доставки мРНК в клетку — эндоцитоз. Он включает множество сложных процессов, которые определяют внутриклеточную локализацию мРНК. мРНК попадают в эндосомы за счет инвагинации клеточной мембраны. Эндосомы созревают и сливаются с лизосомами, где кислая среда и присутствие гидролитических ферментов могут разрушать систему доставки и нуклеиновую кислоту. Следовательно, компоненты доставки должны обеспечивать оптимальный временной промежуток от выхода мРНК из эндосом до деградации нуклеиновой кислоты, т.к. он выступает решающим для успешного действия мРНК [5].

Механизмы высвобождения мРНК из искусственных липидных наночастиц в цитоплазму изучены не полностью. Было показано, что LNP интернализируются по механизму, включающему как клатрин-зависимый эндоцитоз, так и макропиноцитоз [57].

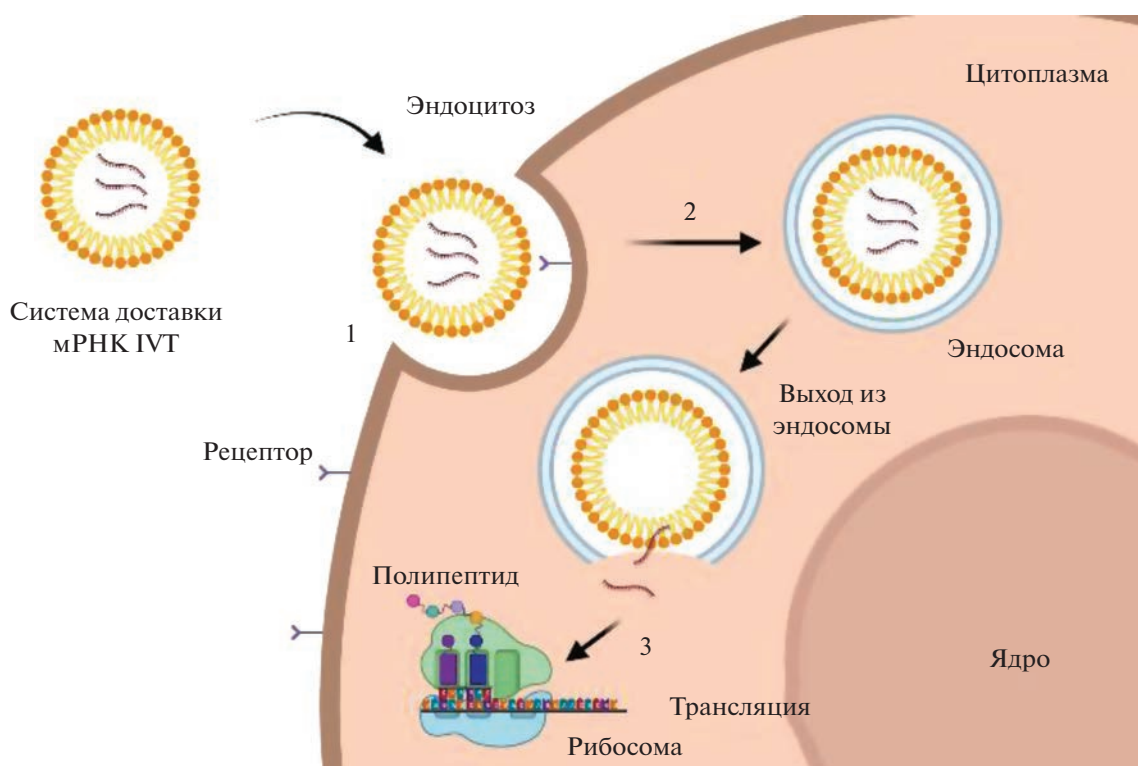


Рис. 10. Внутриклеточные барьеры для доставки мРНК, транскрибированной *in vitro* (IVT): 1 — взаимодействие между системой доставки и клеточной мембраной, 2 — эндоцитоз, 3 — эндосомный выход и высвобождение мРНК для запуска процесса трансляции. Эндоцитоз — механизм интернализации внеклеточных компонентов и фрагментов плазматической мембраны, которая формирует эндоцитозный пузырек. В этом процессе участвуют везикулы, известные как эндосомы, с внутренним pH ~ 5, которые созревают от ранних эндосом к поздним эндосомам перед слиянием с внутриклеточными органеллами — лизосомами. Таким образом, частицы, проникающие в клетки посредством эндоцитоза, захватываются эндосомами и в конечном итоге попадают в лизосомы, где происходят активные процессы ферментативной деградации [5, 46].

В настоящее время существуют одобренные мРНК-вакцины против COVID-19, которые доставляют мРНК, кодирующую S-белок SARS-CoV-2, с помощью LNP. К ним относятся вакцины mRNA-1273 (Moderna) и BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) [58]. Состав LNP этих вакцин представлен в табл. 1. Структурные формулы компонентов, входящих в состав LNP, представлены на рис. 11.

Для доставки кандидатных мРНК-вакцин CVnCoV (CureVac) и ARCoV (Walvax), которые проходят клинические испытания, используются LNP другого состава (табл. 2) [59, 60].

Основная проблема доставки мРНК с помощью липидных наночастиц связана с природой липидов [61]. В частности, положительно заряженные липидные частицы могут связываться с отрицательно заряженными белками и нуклеино-

выми кислотами и прилипать к поверхности клеток, что дестабилизирует плазматическую мембрану и приводит к развитию побочных эффектов у вакцинируемого пациента [62, 63]. Липидные компоненты могут вызывать иммунные реакции организма-хозяина после системного или местного введения; например, ПЭГ-липиды могут стимулировать систему комплемента. Кроме того, антитела против ПЭГ могут привести к быстрому выведению ПЭГилированных наночастиц из организма. Это может изменить биодоступность и биораспределение препарата, инкапсулированного в ПЭГилированные наночастицы, и, таким образом, вызывать побочные эффекты. Также сообщалось, что катионные и ионизируемые липиды стимулируют секрецию провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода.

Таблица 1. Состав липидных наночастиц в вакцинах mRNA-1273 (Moderna) и BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) [58]

Вакцина	mRNA-1273	BNT162b2
Производитель	Moderna	BioNTech/Pfizer
Доза мРНК, мкг	100	30
Компоненты	SM-102 Дистеароилфосфатидилхолин Холестерин DMG-PEG2000	ALC-0315 Дистеароилфосфатидилхолин Холестерин ALC-0159
Ионизируемые катионные липиды : нейтральные липиды : холестерин : ПЭГ-липиды (молярное соотношение, %)	50 : 10 : 38.5 : 1.5	46.3 : 9.4 : 42.7 : 1.6

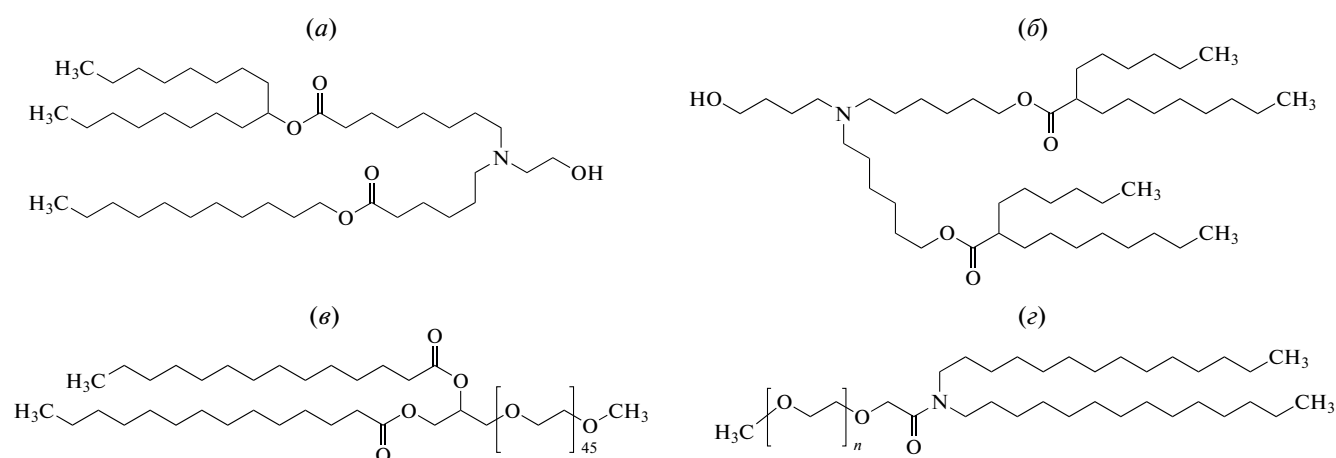


Рис. 11. Структуры компонентов, входящих в состав LNP: (а) – SM-102 – (гептадекан-9-ил-8-((2-гидроксиэтил)(6-оксо-6-(ундецилокси)гексил)амино)октаноат)); (б) – ALC-0315 – ((4-гидроксibuтил)азанедиил)бис(гексан-6,1-ди-ил)бис(2-гексилдеcanoат); (в) – DMG-PEG2000 – 1-монометоксиполиэтиленгликоль-2,3-димиристилглицерин с полиэтиленгликолем средней молекулярной массы 2000; (г) – ALC-0159 – 2-[(полиэтиленгликоль)-2000]-N,N-дитетра-децилацетамид.

Таблица 2. Состав липидных наночастиц в вакцинах CVnCoV (CureVac) и ARCoV (Walvax) [59, 60]

Вакцина	CVnCoV	ARCoV
Производитель	CureVac	Walvax
Доза мРНК, мкг	12	5, 10, 15, 20 и 25
Компоненты	Катионный липид (Acuitas Therapeutics) Фосфолипид Холестерин Конъюгат ПЭГ-липид	Катионный липид (нет данных) Дистеароилфосфатидилхолин Холестерин Конъюгат ПЭГ-липид
Ионизируемые катионные липиды : нейтральные липиды : холестерин : ПЭГ-липиды (молярное соотношение, %)	50 : 10 : 38.5 : 1.5	50 : 10 : 38.5 : 1.5

Хотя иммуногенность этих липидов еще полностью не изучена, система комплемента и Toll-подобные рецепторы могут участвовать в активации врожденного иммунитета. Цитотоксичность липидных материалов также представляет проблему. Сообщалось, что применение липидных наночастиц *in vivo* вызывает повреждение печени и легких у грызунов, что может быть связано с цитотоксичностью и индукцией провоспалительных факторов [64].

Данные проблемы решают с помощью различных модифицированных компонентов липидных наночастиц [65], однако это увеличивает стоимость их производства и усложняет состав. Другая проблема липидных наночастиц заключается в том, что они чувствительны к замораживанию и оттаиванию, хранение и перевозку необходимо осуществлять при -80°C , что затрудняет их использование для массовой вакцинации [66, 67].

Поликатионные полимеры

Полимерные материалы не так широко применяются для доставки нуклеиновых кислот, как липиды. По сравнению с липидами, при использовании полимерных материалов возникает ряд дополнительных проблем, например, трудности биоразложения полимеров с большой молекулярной массой. Тем не менее проводятся исследования, посвященные решению этих проблем. Например, низкомолекулярный поли(иминоэтилен) (PEI), модифицированный цепями жирных кислот, используется для доставки мРНК для снижения токсичности высокомолекулярного PEI. Полимеры поли(гликоамидамина), модифицированные цепями жирных кислот, такие как TarN3C10, который содержит тартратный остов (состоящий из эфиров и солей винной кислоты),

показали свою эффективность в доставке мРНК эритропоэтина у мышей [68].

Полиметакрилаты с боковыми цепями, несущими амин, полиаспартамиды с олигоаминоэтиленовыми боковыми цепями и полиакриловые кислоты, амидированные тетраминоом с чередующимися этилпропилэтиловыми спейсерами, также могут доставлять мРНК в клетки. Были получены данные о саморазлагающихся эфирах, которых авторы называли высвобождаемыми переносчиками с изменяющимся зарядом (CART). Эти полимеры способны высвобождать мРНК после перегруппировки с последующей деградацией при pH 7.4. Известны биоразлагаемые аминополиэферы (APE), способные селективно доставлять мРНК в ткани [69].

Также интересным объектом для исследования служит хитозан – биоразлагаемый биосовместимый полимер, который представляет собой производное хитина, полученное путем удаления ацетатной части хитина. Хитозан имеет химические функциональные группы, которые можно модифицировать для достижения конкретных целей, что делает его полимером с огромным спектром потенциальных применений. Наночастицы на основе хитозана и его производных, обычно обладают положительным поверхностным зарядом и мукоадгезивными свойствами, поэтому они могут прикрепляться к слизистым оболочкам и высвобождать лекарственное средство [70].

Дендримеры, такие как полиамидамин (РАМАМ) или производные полипропиленимина, исследуются для доставки нуклеиновых кислот. Были синтезированы дендримеры РАМАМ, модифицированные цепями жирных кислот, для доставки малых интерферирующих РНК, которые впоследствии были использованы для разра-

ботки внутримышечно доставляемой самореплицирующейся платформы мРНК-вакцин для экспрессии антигенов вируса Эбола, гриппа H1N1, *Toxoplasma gondii* и вируса Зика [71]. Дендримеры РАМАМ могут улучшать растворимость в воде, стабильность, нацеливание и фармакокинетику различных лекарств. Дендримеры благодаря своей многофункциональности могут быть использованы в качестве альтернативной платформы для доставки лекарств следующего поколения [72]. Однако при использовании данной платформы доставки возникает ряд проблем. Поскольку повторяющиеся дендримерные единицы разветвляются в виде древовидной формы, их ферментативное биоразложение может быть затруднено из-за стерических факторов, что приводит к токсичности, связанной с накоплением этих материалов в тканях [73].

Наряду с известными агентами, разрабатываются и другие материалы для доставки мРНК, которые могут обеспечить безопасность и эффективность вакцины, а также облегчить ее хранение и транспортировку. В частности, в ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” был разработан конъюгат полиглюкин–спермидин (PGS) в качестве носителя вакцины мРНК-RBD, кодирующей рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка SARS-CoV-2 [74].

PGS содержит только два компонента, полиглюкин и спермидин, и позволяет лиофилизировать нуклеиновую кислоту и хранить ее в течение длительного времени при положительных температурах. Было продемонстрировано, что ДНК-вакцина, инкапсулированная в PGS, сохраняется без потери специфической активности не менее двух лет при 4°C. Конъюгат PGS — компонент ДНК-вакцины против ВИЧ-1, и его безопасность подтверждена доклиническими исследованиями и клиническими испытаниями фазы I [75, 76].

Важное преимущество — биоразлагаемость компонентов PGS и их безопасность для человека. Полиглюкин (полимер глюкозы с молекулярной массой 40000) нетоксичен для человека и выступает лицензированным плазмозамещающим препаратом гемодинамического действия, восстанавливающим объем циркулирующей крови. Показано, что оболочка из полиглюкина защищает дрожжевую дцРНК от деградации под действием нуклеаз сыворотки [77]. Спермидин — это встречающийся в природе полиамин, обнаруженный во всех живых организмах; он важен для поддержания клеточного гомеостаза и участвует во многих биологических процессах, включая рост и пролиферацию клеток, стабилизацию ДНК и РНК и регуляцию трансляции [78, 79]. Кроме того, низкая стоимость компонентов, возможность

лиофилизации и хранения конъюгата PGS при 4°C обеспечивают дополнительные технологические преимущества при производстве и транспортировке вакцин.

Предполагается, что комплекс мРНК–PGS попадает в антиген-презентирующие клетки путем эндоцитоза благодаря своему размеру, сопоставимому со средним размером вирусных частиц (100–200 нм). Кроме того, упаковка в PGS защищает мРНК от деградации нуклеазами, что в конечном итоге приводит к увеличению иммунного ответа. Исследования показали, что предложенный поликатионный конъюгат полиглюкин–спермидин можно рассматривать как многообещающее и безопасное средство доставки мРНК-вакцин, в частности мРНК-вакцин против SARS-CoV-2 [80].

Физические способы доставки

Для повышения эффективности прямой трансфекции используют различные физические манипуляции [52, 81]. Для прямой доставки нуклеиновых кислот в клетки как *in vivo*, так и *in vitro* могут применяться методы с использованием электропорации, генных пушек, ультразвука или инъекции под высоким давлением. Один из наиболее эффективных методов доставки мРНК — электропорация. Поскольку мРНК не требует ядерной локализации, можно применять мягкие электрические импульсы для снижения клеточной токсичности. Еще одно преимущество электропорации — это прямая доставка мРНК в цитозоль, которая может предотвратить нежелательный иммунный ответ [82].

В настоящее время исследуются и другие способы доставки, кроме представленных выше. Хотя в данной области удалось добиться большого успеха, есть предположение, что наиболее эффективным будет сочетание различных систем доставки мРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

мРНК-вакцины стали перспективной платформой для создания средств профилактики инфекционных заболеваний, поскольку они обладают существенными преимуществами по сравнению с другими типами вакцин. В первую очередь это безопасность: мРНК, в отличие от классических вирусных вакцин, неинфекционны и обладают низкой реактогенностью. мРНК-вакцины способны эффективно активизировать специфический клеточный и гуморальный иммунные ответы, но не вызывают антивекторный иммунный ответ. Существенное преимущество

мРНК-вакцин – быстрое недорогое масштабируемое и однотипное производство, обеспечивающее высокие выходы желаемого продукта в условиях *in vitro*. Платформа мРНК-вакцин позволяет легко проводить замену целевого гена, не изменяя технологию производства, что важно для решения проблемы временного разрыва между началом эпидемии и производством вакцины.

В данном обзоре описаны основные модификации мРНК-вакцин, направленные на повышение эффективности их действия, и особенности доставки. Для повышения стабильности применяя модификации кэпа, поли(А)-хвоста, кодирующей и некодирующей частей мРНК. Кроме того, важный этап – очистка целевой мРНК-вакцины от побочных продуктов (дцРНК). Для доставки мРНК в клетки используют как вирусные, так и невирусные системы доставки. Среди невирусных систем доставки выделяют инкапсуляцию мРНК в липосомы (LNP) и различные поликатионные полимеры, а также доставку мРНК через клеточную мембрану за счет физических воздействий, с использованием электропорации, генных пушек, ультразвука или инъекции под высоким давлением.

Благодаря достижениям в области повышения стабильности и эффективности трансляции мРНК-вакцин, увеличения эффективности доставки мРНК в клетки мРНК-вакцины стали перспективными средствами для широкого применения против вирусных заболеваний, вызванных такими вирусами, как коронавирус, вирусы гриппа, иммунодефицита человека и др.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии “Вектор” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований, выполненных авторами данной работы, с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pardi N., Hogan M.J., Porter F.W., Weissman D. // Nat. Rev. Drug Discov. 2018. V. 17. P. 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
2. Melton D.A., Krieg P.A., Rebagliati M.R., Maniatis T., Zinn K., Green M.R. // Nucleic Acids Res. 1984. V. 12. P. 7035–7056. <https://doi.org/10.1093/nar/12.18.7035>
3. Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L. // Science. 1990. V. 247. P. 1465–1468. <https://doi.org/10.1126/science.1690918>
4. Jirikowski G.F., Sanna P.P., Maciejewski-Lenoir D., Bloom F.E. // Science. 1992. V. 255. P. 996–998. <https://doi.org/10.1126/science.1546298>
5. Gómez-Aguado I., Rodríguez-Castejón J., Vicente-Pascual M., Rodríguez-Gascón A., Solinís M.Á., Pozo-Rodríguez A. // Nanomaterials. 2020. V. 10. P. 364. <https://doi.org/10.3390/nano10020364>
6. Kwon H., Kim M., Seo Y., Moon Y.S., Lee H.J., Lee K., Lee H. // Biomaterials. 2018. V. 156. P. 172–193. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.034>
7. Горяев А.А., Савкина М.В., Обухов Ю.И., Меркулов В.А., Олефир Ю.В. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2019. Т. 19. С. 72–80. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-2-72-80>
8. Hoerr I., Obst R., Rammensee H.-G., Jung G. // Eur. J. Immunol. 2000. V. 30. P. 1–7. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200001\)30:1<1::AID-IMMU1>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200001)30:1<1::AID-IMMU1>3.0.CO;2-%23)
9. Probst J., Weide B., Scheel B., Pichler B.J., Hoerr I., Rammensee H.-G., Pascolo S. // Gene Ther. 2007. V. 14. P. 1175–1180. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302964>
10. Kariko K., Kuo A., Barnathan E.S. // Gene Ther. 1999. V. 6. P. 1092–1100. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300930>
11. Karikó K., Ni H., Capodici J., Lamphier M., Weissman D. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 12542–12550. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310175200>
12. Karikó K., Buckstein M., Ni H., Weissman D. // Immunity. 2005. V. 23. P. 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>
13. Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T., Loh Y.H., Li H., Ebina W., Mandal P.K., Smith Z.D., Meissner A., Daley G.Q., Brack A.S., Collins J.J., Cowan C., Schläeger T.M., Rossi D.J. // Cell Stem Cell. 2010. V. 7. P. 618–630. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>
14. Moderna. Product Pipeline. <https://www.modernatx.com/pipeline>
15. Dolgin E. // Nature. 2021. V. 597. P. 318–324. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02483-w>
16. Corbett K.S., Edwards D.K., Leist S.R., Abiona O.M. // Nature. 2020. V. 586. P. 567–571. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>
17. Vogel A.B., Kanevsky I., Che Y., Swanson K.A., Muik A. // Nature. 2021. V. 592. P. 283–289. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03275-y>

18. Bitzer M., Armeanu S., Lauer U.M., Neubert W.J. // *J. Gene Med.* 2003. V. 5. P. 543–553.
<https://doi.org/10.1002/jgm.426>
19. Bloom K., van den Berg F., Arbuthnot P. // *Gene Ther.* 2021. V. 28. P. 117–129.
<https://doi.org/10.1038/s41434-020-00204-y>
20. Mu Z., Haynes B.F., Cain D.W. // *Vaccines.* 2021. V. 9. P. 134.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9020134>
21. Melo M., Porter E., Zhang Y., Silva M., Li N., Dobosh B., Liguori A., Skog P., Landais E., Menis S., Sok D., Nemaee D., Schief W.R., Weiss R., Irvine D.J. // *Mol. Ther.* 2019. V. 27. P. 2080–2090.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.08.007>
22. Lundstrom K. // *Viruses.* 2021. V. 13. P. 317.
<https://doi.org/10.3390/v13020317>
23. Bulcha J.T., Wang Y., Ma H., Tai P.W.L., Gao G. // *Sig. Transduct Target Ther.* 2021. V. 6. P. 1–24.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
24. Ghosh S., Brown A.M., Jenkins C., Campbell K. // *Appl. Biosaf.* 2020. V. 25. P. 7–18.
<https://doi.org/10.1177/1535676019899502>
25. Youn H., Chung J.K. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015. V. 15. P. 1337–1348.
<https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1057563>
26. Ogino T., Green T.J. // *Viruses.* 2019. V. 11. P. 504.
<https://doi.org/10.3390/v11060504>
27. Ramanathan A., Robb G.B., Chan S.H. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. 7511–7526.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>
28. Linares-Fernández S., Lacroix C., Exposito J.Y., Verrier B. // *Trends Mol. Med.* 2020. V. 26. P. 311–323.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.10.002>
29. Henderson J.M., Ujita A., Hill E., Yousif-Rosales S., Smith C., Ko N., McReynolds T., Cabral C.R., Escamilla-Powers J.R., Houston M.E. // *Curr. Protoc.* 2021. V. 1. P. e39.
<https://doi.org/10.1002/cpz1.39>
30. Pasquinelli A.E., Dahlberg J.E., Lund E. // *RNA.* 1995. V. 1. P. 957–967.
31. Stepinski J., Wandell C., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E. // *RNA.* 2001. V. 7. P. 1486–1495.
<https://doi.org/undefined>
32. Strenkowska M., Kowalska J., Lukaszewicz M., Zuberek J., Su W., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E., Jemielity J. // *New J. Chem.* 2010. V. 34. P. 993–1007.
<https://doi.org/10.1039/b9nj00644c>
33. Sahin U., Muik A., Derhovanessian E., Vogler I., Kranz L.M. // *Nature.* 2020. V. 586. P. 594–599.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2814-7>
34. Pascolo S. // *Viruses.* 2021. V. 13. P. 270.
<https://doi.org/10.3390/v13020270>
35. Chang H., Lim J., Ha M., Kim V.N. // *Mol. Cell.* 2014. V. 53. P. 1044–1052.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.007>
36. Li B., Zhang X., Dong Y. // *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* 2019. V. 11. P. e1530.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1530>
37. Jalkanen A.L., Coleman S.J., Wilusz J. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2014. V. 34. P. 24–32.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.05.018>
38. Newbury S.F. // *Biochem. Soc. Trans.* 2006. V. 34. P. 30–34.
<https://doi.org/10.1042/bst20060030>
39. Klausner R.D., Rouault T.A., Harford J.B. // *Cell.* 1993. V. 72. P. 19–25.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90046-S](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90046-S)
40. Linares-Fernández S., Moreno J., Lambert E. // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2021. V. 26. P. 945–956.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.10.007>
41. Al-Saif M., Khabar K.S.A. // *Mol. Ther.* 2012. V. 20. P. 954–959.
<https://doi.org/10.1038/mt.2012.29>
42. Mauro V.P., Chappell S.A. // *Trends Mol. Med.* 2014. V. 20. P. 604–613.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.09.003>
43. Spencer P.S., Siller E., Anderson J.F., Barral J.M. // *J. Mol. Biol.* 2012. V. 422. P. 328–335.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.06.010>
44. Xia X. // *Vaccines.* 2021. V. 9. P. 734.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9070734>
45. Yamamoto A., Kormann M., Rosenecker J., Rudolph C. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009. V. 71. P. 484–489.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.016>
46. Mu X., Greenwald E., Ahmad S., Hur S. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 5239–5249.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky177>
47. Rauch S., Roth N., Schwendt K., Fotin-Mleczek M., Mueller S.O., Petsch B. // *Vaccines.* 2021. V. 6. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41541-021-00311-w>
48. Gebre M.S., Rauch S., Roth N., Yu J., Chandrashekar A., Mercado N.B., He X., Liu J., McMahan K., Martinot A., Martinez D.R., Giffin V., Hope D., Patel S., Sellers D., Sanborn O., Barrett J., Liu X., Cole A.C., Pessaint L., Valentin D., Flinchbaugh Z., Yalley-Ogunro J., Muench J., Brown R., Cook A., Teow E., Andersen H., Lewis M.G., Boon A.C.M., Baric R.S., Mueller S.O., Petsch B., Barouch D.H. // *Nature.* 2022. V. 601. P. 410–414.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04231-6>
49. CureVac. RNA – Revolution für das Leben.
<https://www.curevac.com/en/2021/06/16/curevac-provides-update-on-phase-2b-3-trial-of-first-generation-covid-19-vaccine-candidate-cvncov/>
50. Kariko K., Muramatsu H., Ludwig J., Weissman D. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. P. e142.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr695>
51. Baidersdörfer M., Boros G., Muramatsu H., Mahiny A., Vlatkovic I., Sahin U., Karikó K. // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2019. V. 15. P. 26–35.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.018>
52. Li S., Ma Z. // *Curr. Gene Ther.* 2001. V. 1. P. 201–226.
<https://doi.org/10.2174/1566523013348814>
53. Guan S., Rosenecker J. // *Gene Ther.* 2017. V. 24. P. 133–143.
<https://doi.org/10.1038/gt.2017.5>

54. Reichmuth A.M., Oberli M.A., Jaklenec A., Langer R., Blankschtein D. // *Ther. Deliv.* 2016. V. 7. P. 319–334. <https://doi.org/10.4155/tde-2016-0006>
55. Bahl K., Senn J.J., Yuzhakov O., Bulychev A., Brito L.A., Hassett K.J., Laska M.E., Smith M., Almarsson Ö., Thompson J., Ribeiro A., Watson M., Zaks T., Ciaramella G. // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. P. 1316–1327. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.035>
56. Varkouhi A.K., Scholte M., Storm G., Haisma H.J. // *J. Control. Release.* 2011. V. 151. P. 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.004>
57. Gilleron J., Querbes W., Zeigerer A., Borodovsky A., Marsico G., Schubert U., Manygoats K., Seifert S., Andree C., Stöter M., Epstein-Barash H., Zhang L., Kotliansky V., Fitzgerald K., Fava E., Bickle M., Kalaidzidis Y., Akinc A., Maier M., Zerial M. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 638–646. <https://doi.org/10.1038/nbt.2612>
58. Li M., Li Y., Li S., Jia L., Wang H., Li M., Deng J., Zhu A., Ma L., Li W., Yu P., Zhu T. // *Eur. J. Med. Chem.* 2022. V. 227. P. 113910. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113910>
59. Schoenmaker L., Witzigmann D., Kulkarni J.A., Verbeke R., Kersten G., Jiskootae W., Crommelin D.J.A. // *Int. J. Pharm.* 2021. V. 601. P. 120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>
60. Chen G.L., Li X.F., Dai X.H., Li N., Cheng M.L., Huang Z. // *The Lancet Microbe.* 2022. V. 3. P. E193–E202. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00280-9](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00280-9)
61. Pardi N., Tuyishime S., Muramatsu H., Kariko K., Mui B.L., Tam Y.K., Madden T.D., Hope M.J., Weissman D. // *J. Control. Release.* 2015. V. 217. P. 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.007>
62. Yi Xue H., Guo P., Wen W.-C., Lun Wong H. // *Curr. Pharm. Des.* 2015. V. 21. P. 3140–3147. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150531164540>
63. Sedic M., Senn J.J., Lynn A., Laska M., Smith M., Platz S.J., Bolen J., Hoge S., Bulychev A., Jacquinet E., Bartlett V., Smith P.F. // *Vet. Pathol.* 2018. V. 55. P. 341–354. <https://doi.org/10.1177/0300985817738095>
64. Hou X., Zaks T., Langer R., Dong Y. // *Nat. Rev. Mater.* 2021. V. 6. P. 1078–1094. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>
65. Zhuang X., Qi Y., Wang M., Yu N., Nan F., Zhang H., Tian M., Li C., Lu H., Jin N. // *Vaccines.* 2020. V. 8. P. 123. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010123>
66. Chang H.I., Yeh M.K. // *Int. J. Nanomed.* 2012. V. 7. P. 49. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26766>
67. Ball R.L., Bajaj P., Whitehead K.A. // *Int. J. Nanomed.* 2017. V. 12. P. 305. <https://doi.org/10.2147/IJN.S123062>
68. Dong Y., Dorkin J.R., Wang W., Chang P.H., Webber M.J., Tang B.C., Yang J., Abutbul-Ionita I., Danino D., DeRosa F., Heartlein M., Langer R., Anderson D.G. // *Nano Lett.* 2016. V. 16. P. 842–848. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02428>
69. Kowalski P.S., Palmiero U.C., Huang Y., Rudra A., Langer R., Anderson D.G. // *Adv. Mater.* 2018. V. 30. P. 1801151. <https://doi.org/10.1002/adma.201801151>
70. Mohammed M.A., Syeda J.T.M., Wasan K.M., Wasan E.K. // *Pharmaceutics.* 2017. V. 9. P. 53. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040053>
71. Moura L.I.F., Malfanti A., Peres C., Matos A.I., Guegain E., Sainz V., Zloh M., Vicent M.J., Florindo H.F. // *Mater. Horiz.* 2019. V. 6. P. 1956–1973. <https://doi.org/10.1039/c9mh00628a>
72. Chauhan A.S. // *Molecules.* 2018. V. 23. P. 938. <https://doi.org/10.3390/molecules23040938>
73. Islam M.A., Xu Y., Tao W., Ubellacker J.M., Lim M. // *Nat. Biomed. Eng.* 2018. V. 2. P. 850–864. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0284-0>
74. Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Volosnikova E.A., Merkuleva I.A., Starostina E.V., Zadorozhny A.M., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Shanshin D.V., Baranov K.O., Volkova N.V., Zaitsev B.N., Orlova L.A., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Danilenko E.D., Bazhan S.I., Shcherbakov D.N., Taranin A.V., Ilyichev A.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 2188. <https://doi.org/10.3390/ijms23042188>
75. Lebedev L.R., Karpenko L.I., Poryvaeva V.A., Azaev M.S., Ryabchikova E.I., Gileva I.P., Ilyichev A.A. // *Mol. Biol.* 2000. V. 34. P. 413–417. <https://doi.org/10.1007/BF02759674>
76. Karpenko L.I., Bazhan S.I., Bogryantseva M.P., Ryndyuk N.N., Ginko Z.I., Kuzubov V.I., Lebedev L.R., Kaplina O.N., Reguzova A.Yu., Ryzhikov A.B., Usova S.V., Oreshkova S.F., Nechaeva E.A., Danilenko E.D., Ilyichev A.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2016. V. 42. P. 170–182. <https://doi.org/10.1134/S1068162016020060>
77. Singh D.V., Singh R., Sodhi S.P.S. // *Vet. Res. Commun.* 2005. V. 29. P. 421–430. <https://doi.org/10.1007/s11259-005-1434-x>
78. Perepelytsya S., Uličný J., Laaksonen A., Mocci F. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. 6084–6097. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz434>
79. Lightfoot H.L., Hall J. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. 11275–11290. <https://doi.org/10.1093/nar/gku837>
80. Karpenko L.I., Rudometov A.P., Sharabrin S.V., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., Bazhan S.I., Volosnikova E.A., Rudometova N.B., Orlova L.A., Pyshnaya I.A., Zaitsev B.N., Volkova N.V., Azaev M.Sh., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Ilyichev A.A. // *Vaccines.* 2021. V. 9. P. 76. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020076>
81. Ponsaerts P., Der Sar S.V., Van Tendeloo V.F.I., Jorens P.G., Berneman Z.N., Singh P.B. // *Cloning Stem Cells.* 2004. V. 6. P. 211–216. <https://doi.org/10.1089/clo.2004.6.211>
82. Campillo-Davo D., De Laere M., Roex G., Versteven M., Flumens D., Berneman Z.N., Van Tendeloo V.F.I., Anguille S., Lion E. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. P. 396. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030396>

mRNA-Vaccine Platform: Features of Obtaining and Delivery of mRNA

V. R. Litvinova^{*, #}, A. P. Rudometov^{*}, L. I. Karpenko^{*}, and A. A. Ilyichev^{*}

[#]Phone: +7 (383) 363-47-10, 22-29; e-mail: viktoriya_litvinova_1999@mail.ru

^{*}State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirskaya oblast, 630559 Russia

Vaccination is the most effective way to prevent infectious diseases. One new approach to vaccine development is mRNA-based vaccines, which have a number of very useful advantages over other types of vaccines. As the mRNA only encodes the target antigen, there is no potential risk of infection, as would be the case with an attenuated or inactivated pathogen. The principle of mRNA vaccines' action is function in the cytosol of the cell; due to this the probability of mRNA integration into the host genome is extremely low. mRNA vaccines are able to induce specific cellular and humoral immune responses, but do not induce an anti-vector immune response. The mRNA vaccine platform makes it easy to replace the target gene without changing the production technology, which is important for solving the problem of a time gap between the start of an epidemic and vaccine production. The review focuses on the history of mRNA vaccines, the technology of their production, methods for increasing the stability of mRNA, description of modifications of the cap, poly(A) tail, coding and noncoding parts of mRNA, purification of the target mRNA vaccine from by-products, and various delivery methods.

Keywords: RNA, mRNA vaccines, chemically modified nucleotides, untranslated 5'- and 3'-regions, mRNA delivery methods