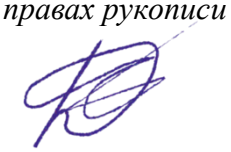
На правах рукописи



КУНЫК ДМИТРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ МУТАЦИЙ НЕСТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ АЛЬФАВИРУСА И ВКЛЮЧЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ И РЕАКТОГЕННОСТЬ САМОАМПЛИФИЦИРУЮЩЕЙСЯ РНК

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Федеральная территория «Сириус» - 2026

Работа выполнена в научном центре трансляционной медицины автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»»

Научный руководитель: **Решетников Василий Владимирович**, кандидат биологических наук

Защита состоится 7 декабря 2026 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета НТУ.1.5.3.27 в АНОО ВО «Университет «Сириус» по адресу 354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АНОО ВО «Университет «Сириус»» https://siriusuniversity.ru/sveden/science/obyavleniya-o-zashchita

Автореферат разослан «6» ноября 2026 г.

Учёный секретарь, диссертационного совета, кандидат биологических наук Шуйский Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

Самоамплифицирующиеся РНК (саРНК) – это молекулы РНК, содержащие последовательности, кодирующие аппарат репликации вирусного происхождения, который обеспечивает процесс репликации РНК и амплификацию субгеномной РНК, кодирующей целевой белок. В настоящее время при создании саРНК преимущественно используется репликативный аппарат альфавирусов семейства *Togaviridae*. Препараты на основе саРНК могут стать альтернативой нереплицирующимся мРНК-препаратам, потенциально решая проблему короткого времени биосинтеза целевого белка, наблюдаемого при использовании нереплицирующихся мРНК. Благодаря внутриклеточной амплификации саРНК может позволить значительно снизить терапевтическую дозу и обеспечить более продолжительный уровень биосинтеза трансгена по сравнению с нереплицирующейся мРНК. Однако внутриклеточная репликация саРНК сопровождается образованием двухцепочечной РНК (дцРНК) и некэпированных транскриптов, которые распознаются TLR3, RIG-I, MDA5, что приводит к чрезмерной активации врожденного иммунного ответа, и может привести к цитотоксическим эффектам и подавлению трансляции РНК. Эти особенности саРНК подчеркивают необходимость дальнейшей оптимизации данной платформы. Тем не менее, в настоящее время уже одобрена для использования на людях вакцина ARCT-154 против SARS-CoV-2 на основе саРНК, что свидетельствует о том, что потенциальные побочные эффекты являются преодолимыми в отношении безопасности применения платформы саРНК-препаратов.

К ключевым направлениям оптимизации саРНК-платформы относятся инженерия неструктурных белков репликативного аппарата альфавирусов с целью снижения цитотоксичности и повышения эффективности образования субгеномной РНК, снижение активации врожденного иммунного ответа с помощью вирусных ингибиторов для предотвращения остановки трансляции целевого белка и совершенствование регуляторных элементов, контролирующих трансляцию субгеномной РНК. В литературе описаны отдельные мутации в генах неструктурных белков nsP2 и nsP3, влияющие на цитотоксический эффект и уровень интерферонового ответа, а также показана возможность использования вирусных белков-антагонистов врожденного иммунного ответа (NS1, p4a, белок L) для повышения биосинтеза целевого белка. Однако количество исследований, одновременно оценивающих влияние различных типов модификаций на кинетику биосинтеза целевого белка, соотношение форм РНК и индукцию генов врожденного иммунного ответа, остается ограниченным. В частности, недостаточно изучена роль мутаций в С-концевом домене nsP2 в регуляции образования субгеномной РНК, отсутствуют сравнительные данные о действии ингибиторов NS1 и p4a в контексте саРНК, не исследовано влияние инженерии 5'-нетранслируемой области субгеномной РНК на трансляционную эффективность.

Таким образом, несмотря на растущее число исследований, посвящённых функциональным свойствам саРНК и её взаимодействию с иммунной системой,

создание безопасной и клинически применимой терапевтической платформы на основе саРНК для дальнейшей разработки саРНК-препаратов требует систематического подхода к оптимизации всех ключевых компонентов: репликативного аппарата, иммуномодулирующих элементов и регуляторных последовательностей.

Целью настоящей работы является оптимизация платформы самоамплифицирующейся РНК путем повышения эффективности биосинтеза целевых белков и снижения реактогенности для создания препаратов на основе саРНК. *Для достижения цели были поставлены следующие* ***задачи***:

1. Сравнить уровень и продолжительность биосинтеза целевого белка при использовании саРНК и мРНК в моделях *in vitro* и *in vivo*, а также стабильность саРНК и мРНК в месте введения в модели *in vivo* для выявления потенциальных путей оптимизации препаратов на основе саРНК.
2. Оценить уровень гуморального иммунного ответа после введения саРНК-препарата, кодирующего гемагглютинин вируса гриппа H1N1, в эксперименте на мышах линии BALB/c с целью определения функциональной активности неоптимизированной платформы на основе саРНК.
3. Исследовать влияние мутаций в генах неструктурных белков nsP2 и nsP3 саРНК на уровень и продолжительность биосинтеза репортерного белка, соотношение форм саРНК и индукцию экспрессии генов врожденного иммунного ответа в культуре клеток линии HEK293T для выявления потенциальных путей оптимизации препаратов на основе саРНК.
4. Исследовать влияние ингибиторов врожденного иммунного ответа, закодированных в последовательности саРНК, на уровень и продолжительность биосинтеза репортерного белка, соотношение форм саРНК и индукцию транскрипции отдельных генов врожденного иммунного ответа в культуре клеток линии HEK293T для снижения выраженности врожденного иммунного ответа.
5. Исследовать влияние нуклеотидной последовательности 5’-нетранслируемой области субгеномной РНК на уровень и продолжительность биосинтеза репортерного белка, соотношение форм саРНК на клеточной линии HEK293T с целью повышения эффективности препаратов на основе саРНК.

Научная новизна работы. В данной работе впервые проведен комплексный количественный анализ соотношения форм РНК (геномные формы РНК/субгеномная РНК) в процессе биогенеза саРНК с мутациями, приводящими к аминокислотным заменам S773P и G763R в белке nsP2, позволивший выявить, что замена S773P смещает баланс в сторону образования субгеномной РНК и обеспечивает повышение количества целевого белка. Установлено, что аминокислотная замена S773P в белке nsP2, в отличие от ранее описанной замены P773S, приводит к стабильному и длительному повышению количества целевого белка, но при этом ассоциирована с активацией экспрессии генов *RIGI, MDA5* и *IFIT1*, что может свидетельствовать о повышенной нежелательной реактогенности.

Кроме того, впервые проведено прямое сравнительное исследование влияния ингибиторов NS1 и p4a на уровень и продолжительность биосинтеза репортерного белка, соотношение форм РНК в контексте саРНК. Показано, что добавление последовательности *ORF4a* кодирующей белок p4a в кассету саРНК обеспечивает стабильное повышение уровня репортерного белка с логнормальным распределением по клеткам, тогда как добавление последовательности *NS1* вызывает стохастический мультимодальный паттерн по количеству репортерного белка в клетках.

Впервые продемонстрировано, что замена нативного 5'-нетранслируемого региона субгеномной РНК на синтетическую последовательность, выбранную биоинформатически, позволяет увеличить количество eGFP в клетках HEK293T и сохранить повышенный уровень репортерного белка в течение 7 дней, при этом не влияя на абсолютное количество субгеномных транскриптов, что указывает на повышение трансляционной эффективности.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы.

Проведенное исследование расширяет представление о молекулярных механизмах, определяющих эффективность биогенеза саРНК. Полученные данные о роли мутаций С-концевого домена nsP2 в регуляции образования субгеномной РНК вносят вклад в фундаментальное понимание функционирования репликативного аппарата альфавирусов.

Практическая значимость определяется тем, что исследованные в работе стратегии оптимизации саРНК (аминокислотная замена S773P в nsP2 белке, использование ингибитора p4a, синтетический 5'-НТО) могут быть непосредственно использованы при разработке новых профилактических и терапевтических мРНК-препаратов. Полученные оптимизированные варианты саРНК обеспечивают более высокий уровень биосинтеза целевого белка по сравнению с неоптимизированной саРНК и могут служить основой для создания более эффективных и безопасных РНК-препаратов на основе саРНК.

Методология и методы исследования. В работе были использованы современные молекулярно-биологические методы исследования. В рамках работы проводились эксперименты на культуре клеток эмбриональной почки человека HEK293T. Для получения целевых плазмидных конструкций были использованы методы генетической инженерии. Для количественной оценки уровня биосинтеза целевого белка использовались методы спектрофотометрии и проточной цитометрии. Для исследования уровня гуморального ответа проводили иммунизацию мышей линии BALB/c и исследовали уровни нейтрализующих антител методом реакции торможения гемагглютинации. Исследование индукции транскрипции генов врожденного иммунного ответа, а также соотношения форм саРНК в процессе репликации проводилось методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Обработку и анализ полученных данных осуществляли с использованием специализированного программного обеспечения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Мутация, приводящая к аминокислотной замене S773P в последовательности nsP2 белка, закодированного в составе саРНК, повышает уровень репортерного белка за счет повышения уровня субгеномной РНК, но при этом усиливает транскрипцию генов врожденного иммунного ответа *RIGI, MDA5* и *IFIT1*.
2. Ингибитор врожденного иммунного ответа p4a MERS-CoV, закодированный в последовательности саРНК, приводит к повышению уровня целевого белка и снижению активации транскрипции генов врожденного иммунного ответа *MDA5* и *IFIT1*, нивелируя тем самым недостатки использования аминокислотной замены S773P.
3. Синтетическая последовательность 5’-НТО, закодированная после субгеномного промотора, приводит к повышению уровня целевого белка и не влияет на соотношение форм саРНК

Степень достоверности и апробация результатов работы.

Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивается использованием комплекса современных молекулярно-биологических, клеточных и иммунологических методов, соответствующих поставленным цели и задачам исследования. Обоснованность полученных результатов подтверждается применением адекватных экспериментальных моделей, наличием необходимых контрольных групп, проведением независимых повторов экспериментов, а также использованием соответствующих методов статистической обработки и анализа полученных данных. Выводы диссертационной работы сформулированы на основании совокупности полученных экспериментальных результатов и согласуются с современными научными представлениями о механизмах функционирования самоамплифицирующейся РНК и взаимодействия РНК с системами врождённого иммунитета.

Результаты данной работы были представлены на Всероссийской конференции «Инженерная биология и биофармацевтика», приуроченной к 100-летию со дня рождения академика Д.Г. Кнорре (Новосибирск, Россия, 2026). Для достижения достоверности результатов диссертационного исследования были использованы современные молекулярно–биологические методы, а также научно обоснованные выводы с наличием научных публикаций в высокорейтинговых журналах

Личное участие автора. Все основные научные результаты были получены автором как самостоятельно, так и совместно с сотрудниками Научного центра трансляционной медицины Университета «Сириус»: проведена разработка плазмидных конструкций, использованных в исследовании. Проведены все этапы получения и аналитической характеристики саРНК и мРНК препаратов.

Осуществлена отработка протоколов трансфекции саРНК на клеточной линии HEK293T. Проведена проточная цитометрия после трансфекции саРНК и мРНК клеток HEK293T.

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам Научного Центра Трансляционной Медицины Васильевой О. О. и к.х.н. Скворцову И.А. за помощь в

формуляции РНК в липидные наночастицы; сотрудникам Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи к.б.н. Мазуниной Е. П. и к.б.н. Джаруллаевой А. Ш. за помощь в проведении исследования по оценке биолюминесценции на мышах и иммуногенности саРНК-вакцины. Кроме того, автор выражает благодарность к.м.н. Шевыреву Д.В. за обучение и помощь при проведении проточной цитометрии, а также за обучение обработке данных проточной цитометрии в программе FlowJo10.10.

Структура и объем работы

Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы, приложение. Материалы диссертации изложены на 155 страницах машинописного текста, содержат 25 рисунков и 10 таблиц. Список литературы включает 200 литературных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. саРНК и мРНК различаются по динамике уровня биосинтеза репортерного белка

На первом этапе исследования была оценена эффективность биосинтеза репортерного белка, закодированного в последовательности саРНК, в зависимости от количества РНК, используемого для трансфекции. В отличие от самореплицирующейся РНК, экспрессия трансгена с нереплицирующейся мРНК в значительной степени определяется количеством функциональных молекул РНК, их стабильностью и особенностями регуляторных последовательностей. При этом увеличение количества мРНК, как правило, приводит к соответствующему повышению уровня целевого белка в пределах диапазона эффективных доз. Напротив, для саРНК была выявлена нелинейная зависимость между количеством РНК, используемым при трансфекции, и уровнем репортерного белка (Рисунок 1).

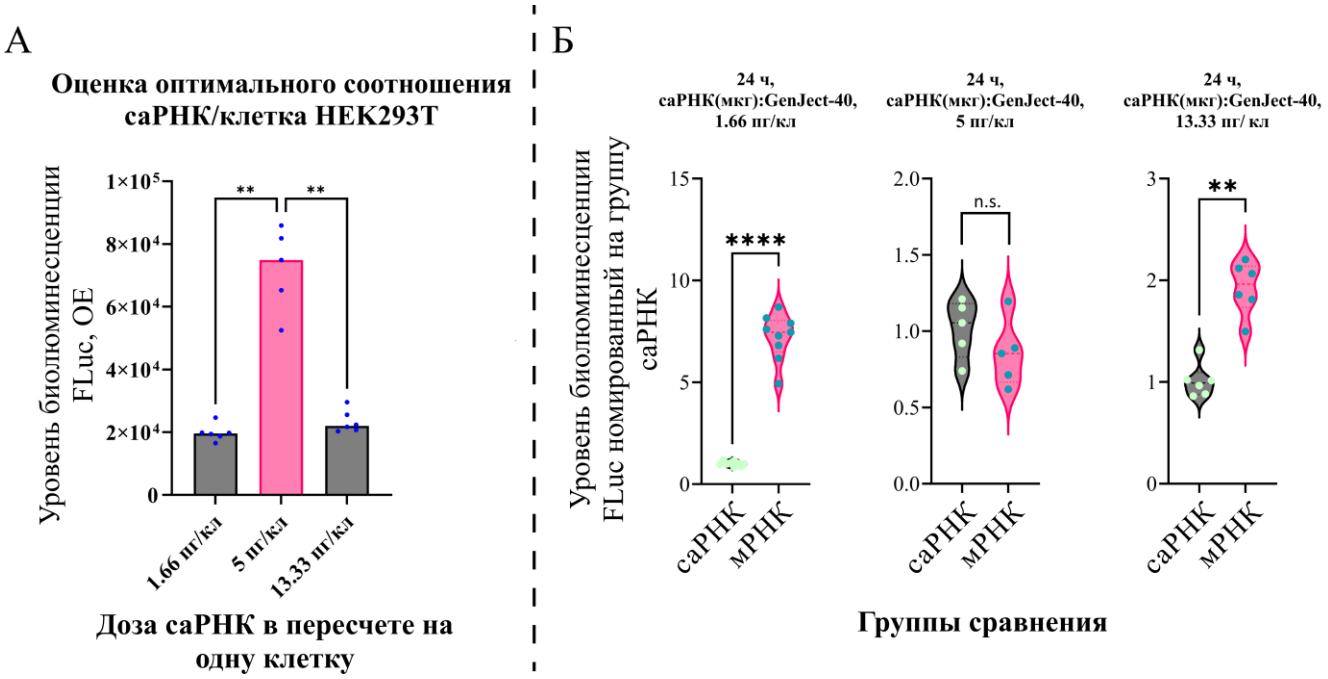


Рисунок 1 – А: Влияние дозы саРНК на эффективность экспрессии репортерного белка FLuc через 24 часа после трансфекции клеток линии HEK293T (** - *p*-value <0,01 по сравнению с группой 5 пг/кл (критерий Т3 Даннетта)); Б: сравнение интенсивности биолюминесценции FLuc через 24 часа после трансфекции клеток линии HEK293T препаратами саРНК в дозах 1,66 пг/кл, 5,0 пг/кл и 13,33 пг/кл и мРНК в дозе 5,0 пг/кл (U-тест Манна-Уитни, ** - *p*-value <0.01, **** - *p*-value <0.0001). Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

Одним из возможных объяснений данного явления может быть активация врожденного иммунного ответа в результате репликации саРНК. После попадания в цитоплазму саРНК служит матрицей для синтеза антисмысловой РНК, вследствие чего может формироваться дцРНК интермедиат (Blakney et al., 2021). Образование дцРНК приводит к активации внутриклеточных рецепторов RIG-I и MDA5, с последующей индукцией врожденного иммунного ответа и ингибированию биогенеза саРНК. Таким образом, увеличение дозы саРНК повышает не только количество доступных для репликации молекул РНК, но и влияет на выраженность иммунного ответа, что может объяснять наблюдаемую нелинейность зависимости «доза–экспрессия».

При рассмотрении уровня биосинтеза репортерного белка, в случае мРНК характерно достижение максимального уровня флуоресценции репортерного белка eGFP на ранних сроках с последующим снижением экспрессии. Снижение экспрессии целевого белка по матрице нереплицирующейся РНК происходит по степенному закону (рисунок 2А и 2Б), что позволяет однозначно рассчитывать период времени, за который уровень флуоресценции снижается в 2 раза ($T_{1/2}$). Так для нереплицирующейся РНК значение $T_{1/2}$ составило 25,5 часов, что может объясняться деградацией исходных молекул РНК.

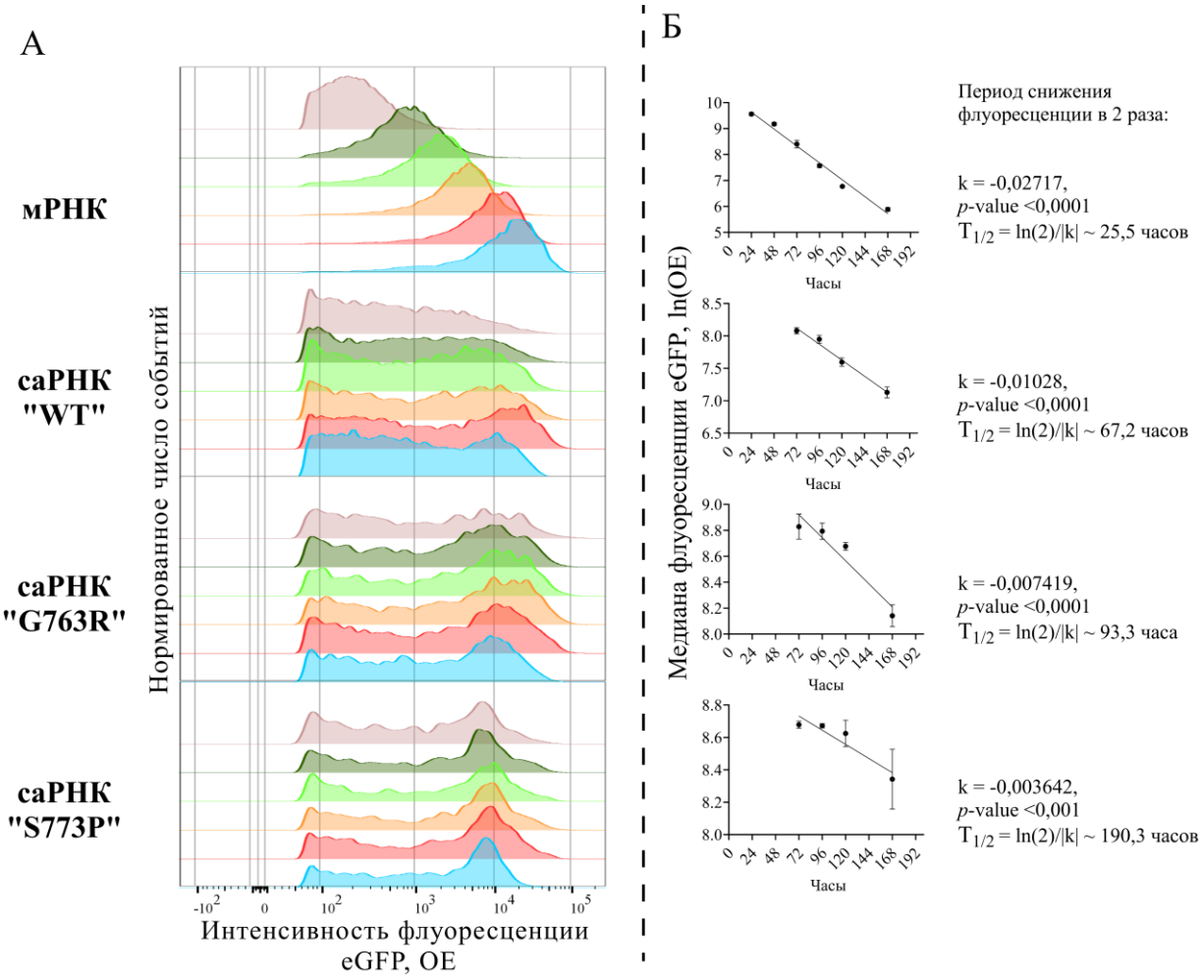


Рисунок 2 – Сравнение кинетики уровня флуоресценции eGFP после трансфекции клеток линии HEK293T вариантами саРНК с мутациями, приводящими к аминокислотным заменам G763R и S773P в последовательности белка nsP2. А: гистограммы распределения интенсивности флуоресценции eGFP субпопуляций клеток линии HEK293T через 24, 48, 72, 96, 120 и 168 часов после трансфекции. Цвета: синий – 24 часа; красный – 48 часов; оранжевый – 72 часа; светло-зеленый – 96 часов; темно-зеленый – 120 часов; пепельно-розовый – 168 часов. Б: изменение медианы флуоресценции eGFP; k – коэффициент наклона кривой; $T_{1/2}$ - период снижения интенсивности флуоресценции в 2 раза.

В отличие предсказуемой кинетики биосинтеза целевого белка при использовании нереплицирующейся РНК, репликация саРНК позволяет компенсировать деградацию исходных молекул за счет биосинтеза новых копий РНК, вследствие чего кинетика экспрессии имеет более сложный и нелинейный характер, описываемый скорее по логистическому закону. В нашем исследовании в первые 24 часа после трансфекции уровень интенсивности флуоресценции репортерного белка при использовании саРНК был ниже по сравнению с нереплицирующейся мРНК. Однако начиная с 48 часов наблюдалось изменение данной тенденции: уровень интенсивности флуоресценции в группе мРНК постепенно снижался, тогда как при использовании саРНК продолжал увеличиваться. Аналогичная динамика была выявлена и в экспериментах *in vivo*, однако преимущество саРНК становилось выраженным только к 7 дню наблюдения (Рисунок 3). Наблюдаемая нами динамика в целом согласуется с

опубликованными данными, в которых также был показан сходный характер изменения уровня биосинтеза целевого белка при использовании самореплицирующейся и нереплицирующейся РНК.

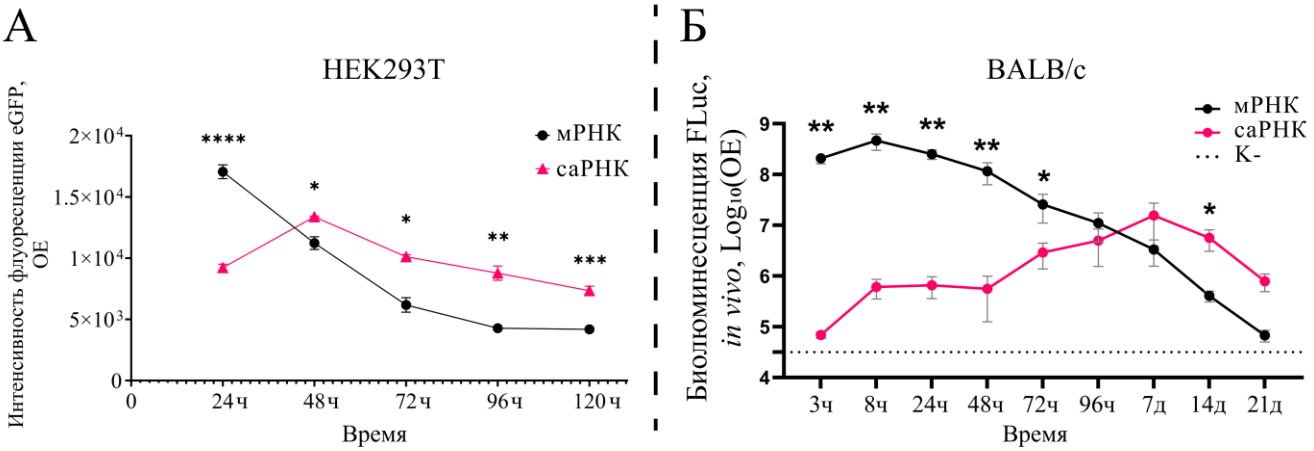


Рисунок 3 – Паттерн кинетики зарегистрированного спектрофотометрического сигнала во времени в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. А: динамика изменения флуоресцентного сигнала eGFP после трансфекции клеток HEK293T через 24, 48, 72, 96, 120, 168 часов. U-тест Манна-Уитни, * - *p*-value <0,05, ** - *p*-value <0,01, *** - *p*-value <0,001, **** - *p*-value <0,0001Б: динамика изменения биолюминесцентного сигнала FLuc после введения саРНК препарата мышам линии BALB/c через 3, 8, 24, 48, 72, 96, 168, 336 и 504 часа; U-тест Манна-Уитни, * - *p*-value <0,05, ** - *p*-value <0,01. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

2. Иммунизация вакциной на основе саРНК, кодирующей гемагглютинин H1N1, обеспечила формирование специфических антител на уровне, не уступающем классической мРНК-вакцине

Для оценки иммуногенности саРНК платформы мышей линии BALB/c иммунизировали двухкратно с интервалом 21 день препаратами саРНК, мРНК (2 мкг), коммерческой инактивированной сплит-вакциной «Ультрикс Квадри» (0,2 человеческой дозы, 3 мкг гемагглютинина на штамм) и плацебо (PBS с 20% сахарозы). Через 20 дней после первой иммунизации в сыворотке крови животных с помощью метода реакции торможения гемагглютинации были обнаружены детектируемые титры антител как в группе мышей иммунизированных саРНК, так и мРНК препаратами.

Через 20 дней после второй иммунизации наблюдалось существенное повышение титров антител, ингибирующих гемагглютинацию, как против гомологичного штамма A/Wisconsin/588/2019, так и против гетерологичного штамма A/Victoria/4897/2022, в группах экспериментальных РНК-препаратов по сравнению с показателями после первой иммунизации. В целом, полученные данные свидетельствуют о сопоставимом гуморальном иммунном ответе, наблюдаемом при использовании как мРНК-, так и саРНК-вакцин, при этом обе платформы превосходят коммерческую инактивированную вакцину по способности индуцировать образование специфических антител как к гомологичному, так и к гетерологичному антигену. Однако, в связи с тем, что абсолютные значения титров после иммунизации саРНК при сопоставимой дозе

были ниже это свидетельствует о необходимости дальнейшей оптимизации платформы.

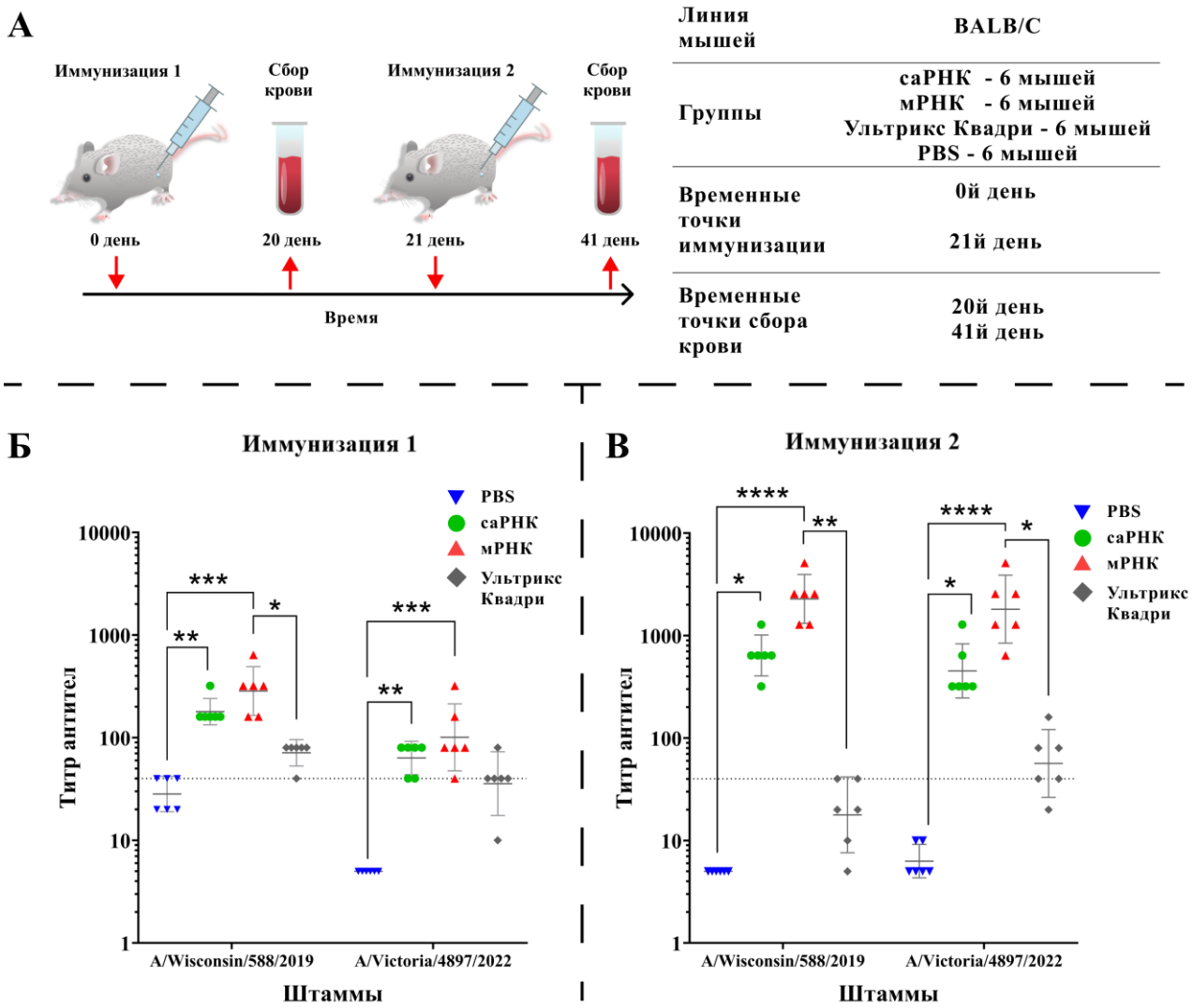


Рисунок 4 - Оценка гуморального иммунного ответа после иммунизации мышей РНК-препаратами мРНК и саРНК. А. Схема эксперимента. Проводили 2 последовательные иммунизации через 21 день. Сбор биоматериала осуществлялся через 20 дней после первой и второй иммунизации. Б. График среднегеометрического титра антител групп мышей, иммунизированных PBS, мРНК, саРНК и «Ультрикс Квадри» через 20 дней после первой иммунизации. В. График среднегеометрического титра антител групп мышей, иммунизированных PBS, мРНК, саРНК и «Ультрикс Квадри» через 21 день после второй иммунизации (* – *p*-value <0,05; * * – *p*-value <0,01; * * * – *p*-value <0,001; * * * * – *p*-value <0,0001; тест Данна). Данные представлены как среднее геометрическое значение ± 95% доверительный интервал.

3. Аминокислотные замены в неструктурном белке nsP2 меняют паттерн биосинтеза целевого белка и соотношение форм саРНК

Так как платформа саРНК хоть и подтвердила свою функциональность, тем не менее, исследование эффективности биосинтеза белка, а также результаты по

иммунизации не выявили значительных преимуществ, перед платформой мРНК, кроме параметра длительности биосинтеза белка. Для того чтобы повысить биосинтез репортерного белка были выбраны мутации, приводящие к аминокислотным заменам Q739L, G763R, S773P в С-концевом домене белка nsP2 репликона саРНК. Из всех протестированных вариантов замена S773P вызвала наибольший интерес. Данный сайт замены в nsP2 белке был описан в работе Петраковой с соавторами, где изучалась аттенуация вируса VEEV. Так было показано, что замена P773S ведет к персистенции вируса и к снижению цитотоксического эффекта (Petrakova et al., 2005). С другой стороны, известно, что С-концевой домен напрямую регулирует образование субгеномной РНК, а также протеолитическое расщепление nsP1234 полипротеина. Здесь мы решили провести обратную замену S773P, что привело к стабильному повышению эффективности биосинтеза репортерного белка (Рисунок 5Б). Как показал анализ методом количественной ПЦР в реальном времени замена S773P сместила баланс в сторону образования субгеномной РНК (Рисунок 5А).

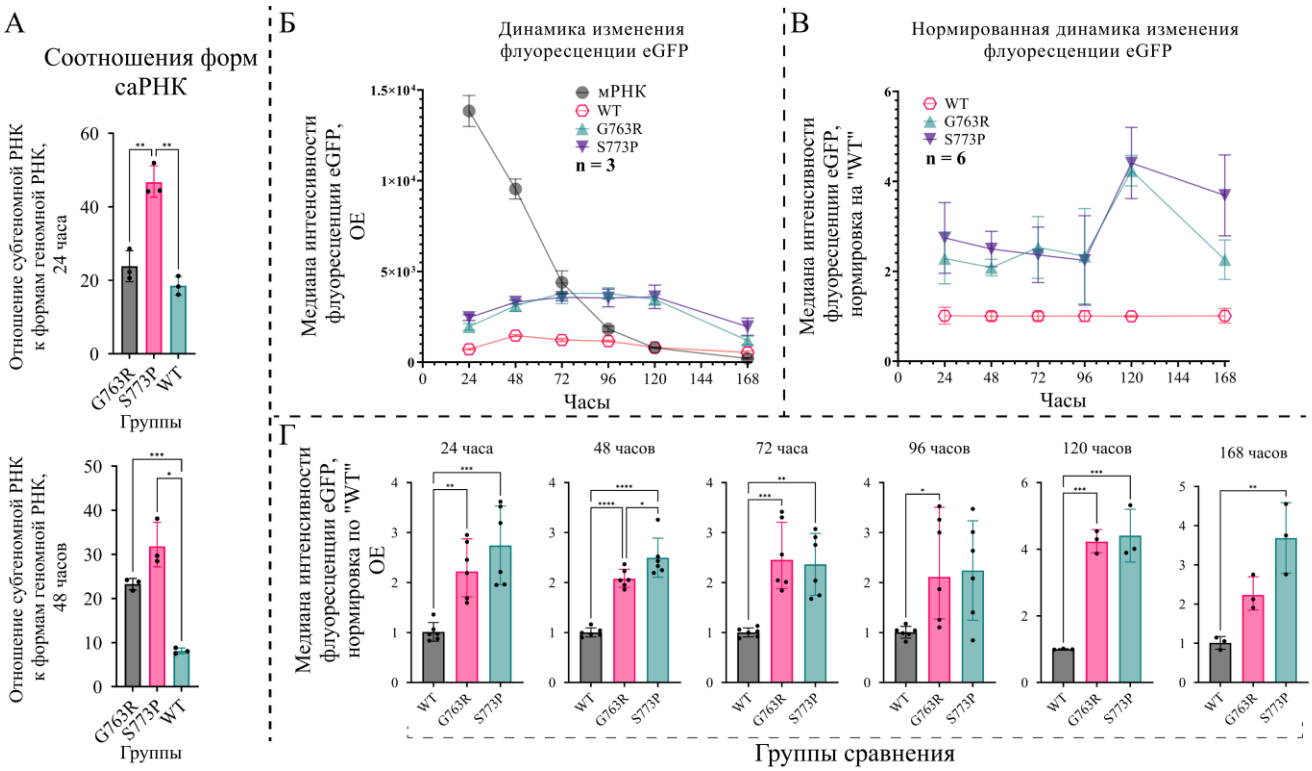


Рисунок 5 – А: сравнение соотношений форм саРНК по абсолютному числу копий после трансфекции клеток линии HEK293T вариантами саРНК «WT», «G763R» и «S773P». Диаграммы отражают соотношения числа копий (субгеномная РНК/(смысловая+антисмысловая геномная РНК) через 24 и 48 часов. Данные представлены как абсолютное число копий (среднее значение ± стандартное отклонение). Критерий Даннетта Т3; * - *p*-value <0,05; ** - *p*-value <0,01; *** - *p*-value <0,001; Б: динамика изменения значений медианы интенсивности флуоресценции субпопуляций GFP-положительных событий. В: динамика изменения флуоресцентного сигнала eGFP в группах «G763R», «S773P» относительно уровня флуоресценции в группе «WT» в соответствующей временной точке. Г: диаграммы, демонстрирующие сравнение нормированных значений медианы интенсивности флуоресценции eGFP в группах «G763R», «S773P» по отношению к группе «WT» в соответствующей временной точке. Регистрация интенсивности флуоресценции субпопуляций проводилась через 24, 48, 72, 96, 120 и 168 часов после

трансфекции клеток HEK293T вариантами саРНК «G763R», «S773P», «WT» и мРНК. Критерий Даннетта Т3; * - *p*-value <0,05; ** - *p*-value <0,01; *** - *p*-value <0,001; **** - *p*-value <0,0001. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

Одновременное использование замен Q739L и G763R было описано в другой работе, где показано, что они приводят к повышению образования субгеномной РНК (Lin and Zhang, 2023). В нашей работе вариант Q739L в последовательности nsP2 в составе с саРНК приводил к снижению биосинтеза целевого белка. Поэтому, в рамках нашей работы, данный вариант был исключен из дальнейших исследований. Замена G763R в последовательности nsP2 в составе с саРНК хотя и повышала максимальное значение экспрессии репортерного белка в некоторых единичных клетках, однако эти эффекты не были однородными по всей популяции трансфицированных клеток (Рисунок 2). Сравнение соотношений форм РНК показало, что только через 48 часов наблюдался достоверный положительный эффект мутации G763R на уровень субгеномной РНК (Рисунок 5). Можно предположить, что данные мутации влияют на этап протеолитического расщепления белка nsP1234 и nsP123.

Повышение образования субгеномной РНК, ассоциированное с заменой S773P, приводило к увеличению биосинтеза репортерного белка, но вместе с тем нами было обнаружено повышение уровня транскрипции генов *RIGI, MDA5* и *IFIT1* (Рисунок 6). С учетом того, что суммарное количество антисмысловой и смысловой геномных форм саРНК в контрольной группе и в группах саРНК, содержащих мутации было сходным, повышение образования субгеномной РНК, вероятно, являлось фактором иммуногенности саРНК «S773P» и «G763R». Сама по себе субгеномная РНК не должна являться фактором реактогенности. Однако, мы предполагаем, что повышение количества некэпированных субгеномных РНК может приводить к нежелательной активации систем врожденного иммунитета. Известно, что неструктурный белок nsP1 осуществляет процесс кэпирования как субгеномной, так и геномной РНК (Ahola and Kääriäinen, 1995; Vasiljeva et al., 2000). В процессе кэпирования форм саРНК образуется структура кэп-0 (Ahola and Kääriäinen, 1995), которая распознается рецепторами врожденного иммунного ответа RIG-I и MDA5 как «чужое», стимулируя транскрипцию интерферон-стимулированных генов (Tsukamoto et al., 2024). Более того, было показано, что в результате кэпирования форм саРНК, опосредованного белком nsP1, остается фракция некэпированных молекул РНК, что повышает вероятность распознавания паттерн распознающими рецепторами с последующей активацией врожденного иммунного ответа (LaPointe et al., 2020). Эти данные подчеркивают специфику саРНК – повышение эффективности репликации и образования субгеномной РНК может приводить к нежелательному иммунному ответу и снижению эффективности биосинтеза целевого белка

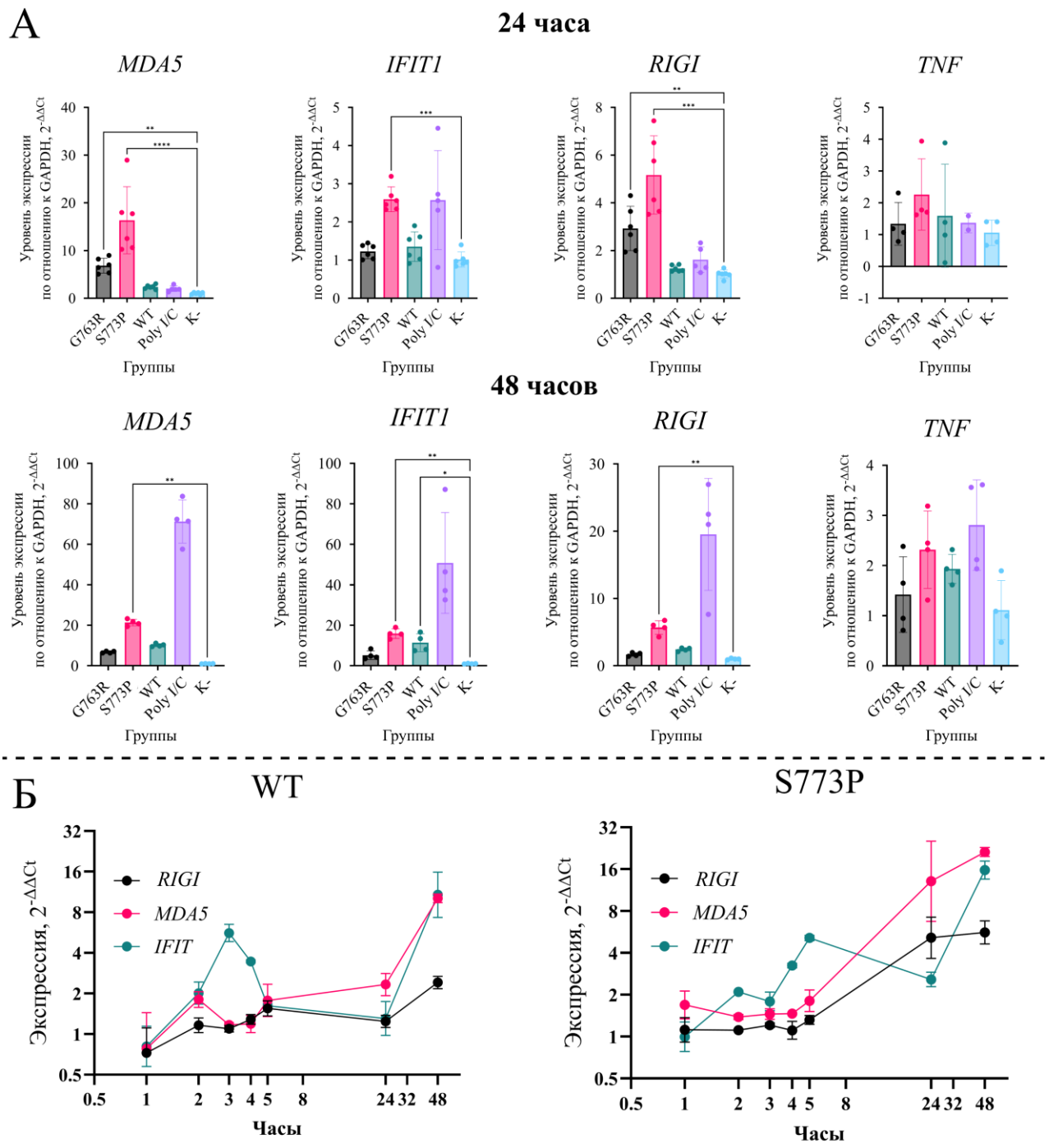


Рисунок 6 – Экспрессия *IFIT1*, *MDA5*, *RIGI* и *TNF* после трансфекции клеток различными вариантами саРНК. А: диаграммы, отражающие уровень экспрессии генов врожденного иммунного ответа через 24 и 48 часов после трансфекции вариантами саРНК «WT», «G763R» и «S773P», поли-I/C. K- группа интактных клеток. Критерий Данна; * - *p*-value <0,05; ** - *p*-value <0,01; *** - *p*-value <0,001. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение; Б: Динамика индукции транскрипции генов *IFIT1*, *MDA5*, *RIGI* через 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48 часов после трансфекции «WT» и «S773P». Уровень экспрессии представлен в единицах логарифмической шкалы.

4. Ингибиторы врожденного иммунного ответа закодированные в кассете саРНК повышают уровень биосинтеза целевого белка и снижают уровень реактогенности

В связи с наблюдаемым нами повышенным уровнем транскрипции генов *MDA5*, *IFIT1* и *RIGI* мы оценили влияние ингибиторов врожденного иммунного ответа p4a (ген *ORF4a*, вирус ближневосточного синдрома) и NS1 (вирус гриппа А). Здесь мы сравнили саРНК содержащую мутацию, приводящую к аминокислотной замене S773P в белке nsP2 с вариантами саРНК, содержащими вышеуказанную мутацию, а также кодирующие ингибиторы p4a или NS1 соединенные через последовательность T2A с флуоресцентным белком eGFP. Наши результаты показали, что ингибиторы врожденного иммунного ответа положительно влияют на уровень биосинтеза целевого белка (Рисунок 7). В отличие от групп «WT» и «S773P» варианты саРНК кодирующие белки NS1 и p4a приводили к повышению среднего геометрического значения интенсивности флуоресценции. В группе «ORF4a» наблюдалось мономодальное распределение eGFP-положительных событий в отличие группы «NS1», где было выявлено мультимодальное распределение событий по интенсивности флуоресценции.

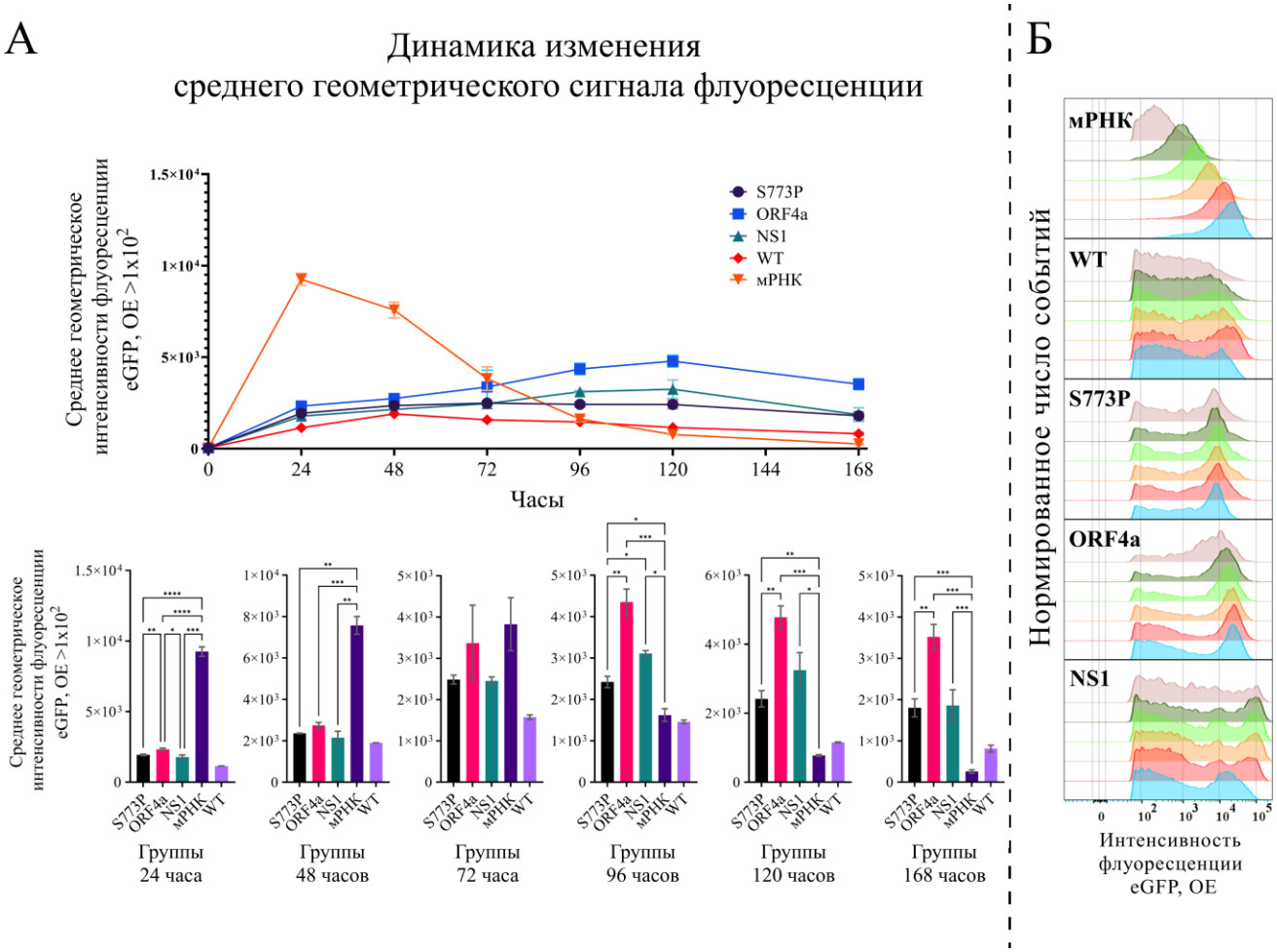


Рисунок 7 – Динамика изменения уровня eGFP после трансфекции клеток HEK293T саРНК с включением последовательностей ингибиторов врожденного иммунного ответа NS1 и p4a. А: динамика изменения среднего геометрического значения интенсивности флуоресценции субпопуляций GFP-положительных событий, превышающих пороговое значение интенсивности

флуоресценции 1x10^2 ОЕ. Регистрация интенсивности флуоресценции субпопуляций проводилась через 24, 48, 72, 96, 120 и 168 часов после трансфекции клеток HEK293T вариантами саРНК. Варианты саРНК: «ORF4a» и «NS1», кодирующие ингибиторы врожденного иммунного ответа p4a и NS1 соответственно; «S773P», «WT» и «мРНК». Критерий Даннетта Т3; * - *p*-value <0,05; ** - *p*-value <0,01; *** - *p*-value <0,001; **** - *p*-value <0,0001. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение; Б: гистограммы распределения GFP положительных событий по уровню флуоресценции. Цвета: синий – 24 часа; красный – 48 часов; оранжевый – 72 часа; светло-зеленый – 96 часов; темно-зеленый – 120 часов; пепельно-розовый – 168 часов.

Известно, что p4a является сильным ингибитором врожденного иммунного ответа. Связываясь с дцРНК p4a, накладывает стерические ограничения на прямое взаимодействие в первую очередь с рецептором дцРНК MDA5 (Niemeyer et al., 2013), протеинкиназой PKR (Y.-H. Li et al., 2019), а также, вероятно, белками семейства OAS. Это приводит к подавлению интерферонового ответа, позволяя саРНК продолжать реплицироваться в клетке. Так в другой работе было показано, что саРНК кодирующая последовательность p4a, проявила дозозависимый паттерн биосинтеза целевого белка, подчиняющегося степенному закону (Blakney et al., 2021). Здесь мы показали, что включение последовательности p4a не приводит к изменению соотношения форм саРНК, однако обеспечивает подавление транскрипции интерферон-стимулированных генов и повышение эффективности биосинтеза белка, что подчеркивает связь между активацией врожденного иммунного ответа и эффективностью биосинтеза белка при использовании платформы саРНК (Рисунок 8).

С другой стороны, белок NS1 в нашем исследовании не оказывал значимого влияния на экспрессию интерферон-стимулированных генов (Рисунок 8). Механизм ингибирования реакции врожденной иммунной системы, опосредованный белком NS1, отличается от механизма действия p4a. Известно, что NS1 вируса гриппа А способен повышать эффективность экспрессии экзогенной мРНК даже при сохранении активации транскрипции интерферон-стимулированных генов (Phua et al., 2017). Авторы связывают этот эффект преимущественно с подавлением последующих этапов противовирусного ответа посредством ингибирования IRF3, PKR и CPSF30. При этом ингибирование IRF3 и PKR непосредственно снижает активность противовирусных механизмов, ограничивающих трансляцию экзогенной РНК, тогда как взаимодействие NS1 с CPSF30 приводит к неспецифическому подавлению экспрессии клеточных генов, включая гены, участвующие в противовирусном ответе. Экспрессия этих генов не была оценена в рамках нашего исследования.

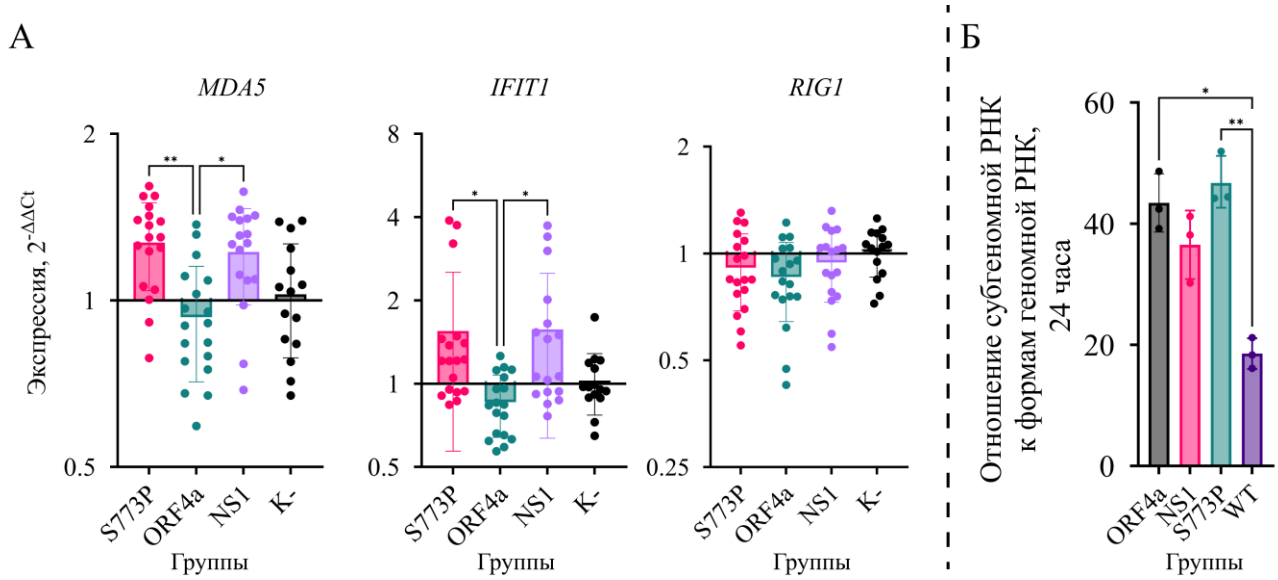


Рисунок 8 – А: Относительная экспрессия генов *MDA5*, *RIGI* и *IFIT1* через 24 часа после трансфекции саРНК клеток линии HEK293T вариантами саРНК «S773P», «ORF4a» и «NS1». Регистрация данных проводилась методом количественной ПЦР. Критерий Данна; * - *p*-value <0,05; ** - *p*-value <0,01; **** - *p*-value <0,0001. Б: Сравнение соотношений форм субгеномная РНК/(смысловая и антисмысловая) геномная РНК по абсолютному числу копий. Критерий Даннетта Т3; *- *p*-value <0,05; *- *p*-value <0,01. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

Стоит также отметить, что в нашем исследовании влияния ингибиторов врожденного иммунного ответа наблюдалось повышение экспрессии *MDA5*, но не *RIGI*. Повышение экспрессии *MDA5* при отсутствии аналогичного увеличения *RIGI* может отражать преимущественное вовлечение MDA5-зависимого пути распознавания интермедиатов репликации саРНК. При этом индукция *MDA5* не обязательно является следствием исключительно IFN-зависимого усиления экспрессии, поскольку для *MDA5* описан IRF3-зависимый, IFN-независимый механизм транскрипционной активации (Yount et al., 2007).

Таким образом, сохранение повышенной транскрипции *MDA5* и *IFIT1* при экспрессии NS1 не обязательно свидетельствует об отсутствии функционального подавления врожденного иммунного ответа. Напротив, NS1 может действовать преимущественно на посттранскрипционном уровне, снижая эффективность реализации уже индуцированного противовирусного ответа. Это принципиально отличает NS1 от p4a, для которого основным механизмом иммунного подавления является связывание дцРНК.

5. Изменённая последовательность 5’НТО субгеномной РНК приводит к повышению уровня биосинтеза целевого белка

Помимо влияния врожденного иммунного ответа на эффективность экспрессии саРНК, существенное значение могут иметь особенности последовательности самой субгеномной РНК. Известно, что 5’НТО эукариотических мРНК участвуют в регуляции эффективности инициации трансляции, определяя взаимодействие РНК с рибосомой и факторами инициации

(Berkhout et al., 2011; Leppek et al., 2018). При этом влияние 5’НТО определяется не только ее первичной последовательностью, но и формируемой вторичной структурой, а также взаимодействием с клеточными РНК-связывающими белками. Поэтому замена нативной вирусной последовательности на оптимизированную синтетическую 5’НТО потенциально может изменять эффективность трансляции субгеномной РНК без необходимости увеличения ее количества.

В нашей работе замена нативной 5’НТО на синтетическую последовательность «Synt1» приводила к устойчивому повышению уровня биосинтеза eGFP по сравнению с исходной конструкцией «S773P» (Рисунок 9). При этом через 24 часа после трансфекции значимых различий в количестве субгеномной РНК между конструкциями обнаружено не было. Таким образом, наблюдаемое увеличение уровня целевого белка не сопровождалось пропорциональным увеличением количества субгеномной РНК, что позволяет связать данный эффект преимущественно с повышением эффективности использования субгеномной РНК для синтеза белка.

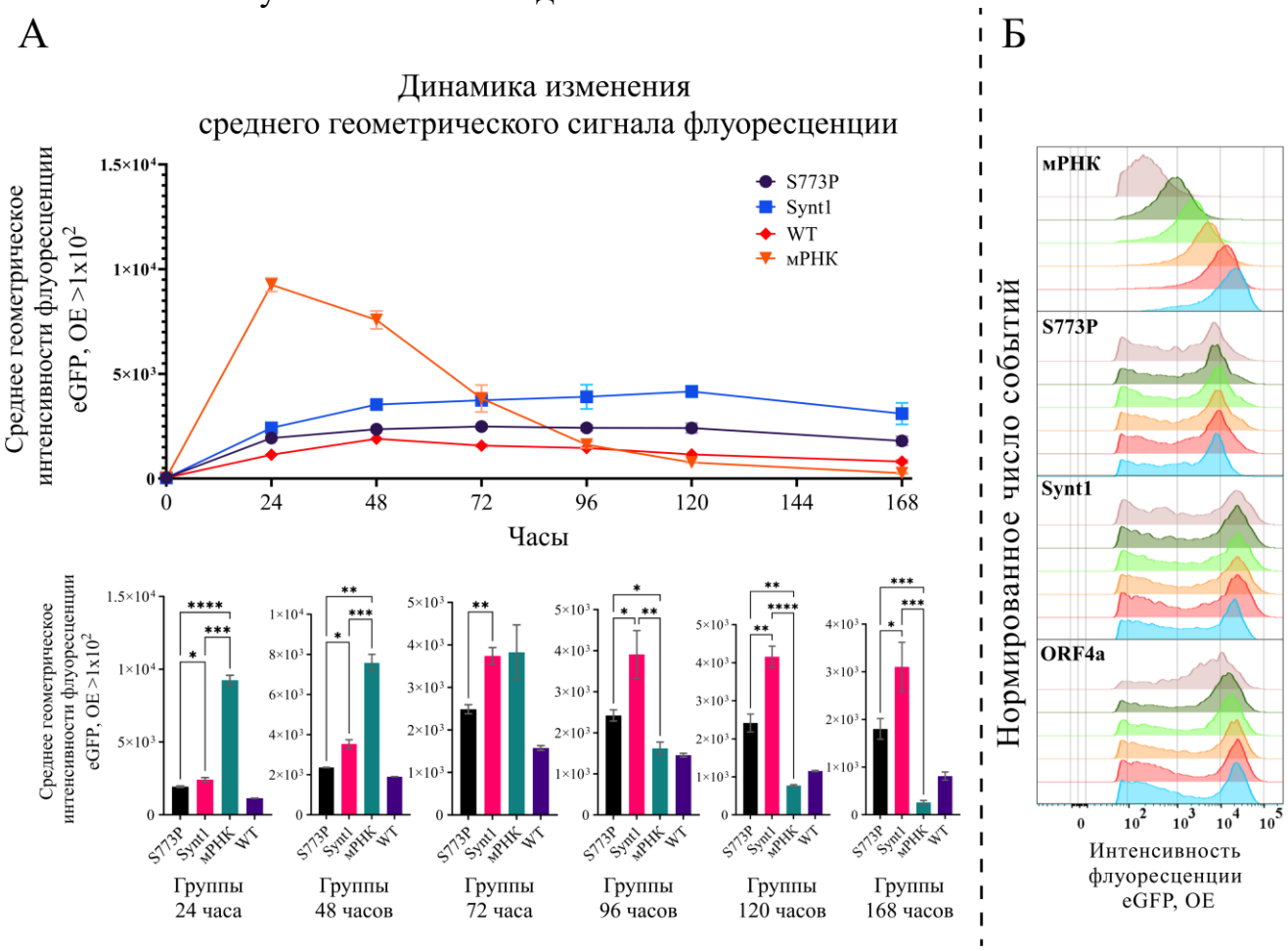


Рисунок 9 – Влияние включения синтетической последовательности 5’ НТО на уровень биосинтеза eGFP в различных временных точках. А: динамика изменения среднего геометрического значения интенсивности флуоресценции субпопуляций GFP-положительных событий, превышающих пороговое значение интенсивности флуоресценции 1x10^2 OE. Регистрация интенсивности флуоресценции субпопуляций проводилась через 24, 48, 72, 96, 120 и 168 часов после трансфекции клеток HEK293T вариантами саРНК. Варианты саРНК: «Synt1» кодирует синтетическую последовательность 5’НТО субгеномной РНК, «S773P», «WT» и

«мРНК». Критерий Даннетта Т3; * - *p*-value <0,05; ** - *p*-value <0,01; *** - *p*-value <0,001; **** - *p*-value <0,0001. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение; Б: гистограммы распределения GFP положительных событий по уровню флуоресценции. Цвета: синий – 24 часа; красный – 48 часов; оранжевый – 72 часа; светло-зеленый – 96 часов; темно-зеленый – 120 часов; пепельно-розовый – 168 часов.

Подобный эффект согласуется с ранее полученными нами результатами для мРНК, где использование последовательности «Synt1» также приводило к повышению биосинтеза репортерного белка (Mazunina et al., 2026). Это позволяет предположить, что выявленные свойства данной 5’НТО не зависят исключительно от репликационного контекста саРНК и могут быть связаны с присущими самой последовательности особенностями регуляции трансляции. Вместе с тем в случае саРНК интерпретация данного эффекта является более сложной, поскольку 5’НТО субгеномной РНК расположена непосредственно после субгеномного промотора и, следовательно, потенциально может влиять не только на последующую трансляцию, но и на формирование самой субгеномной РНК.

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что эффективность трансляции по матрице саРНК может определяться не только эффективностью ее репликации и интенсивностью врожденного иммунного ответа, но и свойствами последовательности 5’НТО субгеномной РНК. Введение синтетической 5’НТО позволило увеличить уровень биосинтеза целевого белка без достоверного увеличения количества субгеномной РНК, что предполагает повышение эффективности трансляции данной формы саРНК. Это дополняет результаты, полученные при использовании ингибиторов врожденного иммунного ответа и мутаций в последовательности кодирующей nsP2 белок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения диссертационной работы была разработана и охарактеризована платформа саРНК на основе вируса венесуэльского лошадиного энцефалита для создания РНК-препаратов. Проведено систематическое исследование ключевых факторов, определяющих уровень и продолжительность биосинтеза целевого белка, включая роль аминокислотных замен в неструктурных белках nsP2 и nsP3, влияние вирусных ингибиторов врожденного иммунного ответа NS1 и p4a, и оптимизацию 5’НТО субгеномной РНК.

Показано, что платформа саРНК, в отличие от классической нереплицирующейся мРНК, характеризуется нелинейной дозовой зависимостью и отсроченным, но пролонгированным профилем биосинтеза белка как *in vitro*, так и *in vivo*. В экспериментах на мышах BALB/c продемонстрирована способность саРНК обеспечивать длительный уровень биосинтеза репортерного белка в течение 21 дня, что обеспечивается репликацией саРНК и накоплением субгеномных транскриптов. В рамках оценки иммуногенности саРНК-вакцины, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа H1N1, установлено, что двукратная иммунизация

обеспечивает формирование гуморального иммунного ответа, сопоставимого по уровню с ответом на мРНК-вакцину.

Ключевым результатом работы является исследование эффектов мутации, приводящих к аминокислотным заменам S773P в С-концевом домене неструктурного белка nsP2 репликона VEEV. Впервые показано, что данная замена приводит к стабильному и длительному повышению уровня биосинтеза целевого белка за счет смещения баланса репликации в сторону образования субгеномной РНК, что подтверждено количественным анализом соотношения форм РНК методом количественной ПЦР в реальном времени. При этом аминокислотная замена S773P ассоциирована с селективной активацией транскрипции генов *RIGI, MDA5* и *IFIT1*, что может свидетельствовать о повышении реактогенности этого варианта саРНК вследствие образования некэпированных молекул субгеномной РНК в клетке.

Впервые проведено прямое сравнительное исследование влияния ингибиторов врожденного иммунного ответа - белка p4a коронавируса MERS-CoV и белка NS1 вируса гриппа А - на биосинтез репортерного белка и биогенез саРНК. Установлено, что использование p4a обеспечивает стабильное повышение уровня биосинтеза белка, описываемого логнормальным распределением по клеточной популяции, сопровождающееся снижением экспрессии *MDA5* и *IFIT1*, тогда как использование NS1 обеспечивает гетерогенный мультимодальный уровень репортерного белка в клетках и не подавляет транскрипцию интерферон-стимулируемых генов, действуя, вероятно, на посттранскрипционном уровне.

Впервые продемонстрировано, что замена нативного 5'-нетранслируемого региона субгеномной РНК на синтетическую последовательность «Synt1» позволяет увеличить интенсивность флуоресценции eGFP в клетках HEK293T в 2 раза и сохранять повышенный уровень биосинтеза целевого белка в течение 7 дней. При этом значимых различий в абсолютном количестве субгеномных транскриптов между конструкциями выявлено не было, что может указывать на повышение трансляционной эффективности субгеномной РНК, а не на усиление ее синтеза.

Таким образом, в работе применен комплексный подход к оптимизации саРНК-платформы, одновременно затрагивающий репликативный аппарат, иммуномодулирующие элементы и регуляторные последовательности. Полученные результаты расширяют фундаментальные представления о молекулярных механизмах биогенеза саРНК и взаимодействии ее интермедиатов с системой врожденного иммунного ответа. Разработанные оптимизационные стратегии могут служить основой для создания нового поколения высокоэффективных и безопасных РНК-препаратов для профилактики инфекционных заболеваний, терапии генетических и онкологических заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. В отличие от нереплицирующейся мРНК, платформа саРНК на основе репликона вируса венесуэльского энцефалита обеспечила отсроченный, но

пролонгированный профиль биосинтеза белка и как *in vitro*, так и *in vivo*, а также персистенции целевых транскриптов в месте введения.

2. Иммунизация вакциной на основе саРНК, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа H1N1, привела к формированию гуморального иммунного ответа, сопоставимого по уровню с наблюдаемым после использования мРНК-вакцины на основе классической РНК.
3. Модификация саРНК, приводящая к аминокислотной замене S773P в С-концевом домене неструктурного белка nsP2, привела к стабильному повышению уровня целевого белка за счет смещения баланса репликации саРНК в сторону образования субгеномной РНК, а также сопровождалось активацией транскрипции генов *RIGI*, *MDA5* и *IFIT1*.
4. Включение последовательностей ингибиторов врожденного иммунного ответа в кассету саРНК привело к разнонаправленным молекулярным эффектам: p4a вируса MERS-CoV обеспечил стабильное повышение уровня биосинтеза репортерного белка с логнормальным распределением и снижением транскрипции *MDA5* и *IFIT1*, тогда как NS1 вируса гриппа А индуцировал стохастический мультимодальный паттерн уровня репортерного белка в клетках без подавления экспрессии интерферон-стимулированных генов.
5. Замена нативной 5'-нетранслируемой области субгеномной РНК на синтетическую последовательность «Synt1» привела к повышению уровня биосинтеза белка, не оказывая при этом значимого влияния на абсолютное количество синтезируемых субгеномных транскриптов.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации.

По теме научного исследования было опубликовано 3 научных работы в журналах индексируемыми базами данных Web of Science и Scopus и рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ:

1. Kunyk DA, Mazunina EP, Mukasheva EA, Ignatieva AV, Kirillova ES, Kurchenko OM, Ivanov RA, Gushchin VA, Reshetnikov VV. Assessment of the immunogenicity of classic and self-amplifying RNA-based antiviral therapeutics for influenza. Bulletin of RSMU. 2026; (3): 98–104. DOI: 10.24075/brsmu.2026.028 **Перевод:** Куныk Д.А., Мазунина Е.П., Мукашева Е.А., Игнатьева А.В., Кириллова Е.С., Курченко О.М., Иванов Р.А., Гущин В.А., Решетников В.В. Оценка иммуногенности препаратов против вируса гриппа на основе классических и самоамплифицирующихся РНК. Вестник РГМУ. 2026; (3): 105–. DOI: 10.24075/vrgmu.2026.028
2. Kunyk, D., Vasileva, O., Bespalov, M., Dzharullaeva, A., Mazunina, E., Chubarova, A., Seliverstov, M., Smirnykh, D., Shevyrev, D., Shtraus, S., Kozlova, A., Subcheva, E., Kleymenov, D., Bykonia, E., Baranov, M. V., Logunov, D. Y., Gushchin, V. A., Ivanov, R., Reshetnikov, V., Skvortsov, I. A. Dual Ionizable Lipids (ALC0315 and SM102) in a Novel Lipid Nanoparticle Formulation Enhance In vivo Delivery and

Time-Dependent Expression of Messenger RNA and Self-Amplifying RNA // ChemMedChem. - 2026. - Vol. 21. - e70335. - DOI: 10.1002/cmdc.70335.

3. Kunyk, D., Plotnikova, M., Bespalov, M., Shevyrev, D., Klotchenko, S., Ivanov, R., Reshetnikov, V. The Interplay Between Therapeutic Self-Amplifying RNA and the Innate Immune System: Balancing Efficiency and Reactogenicity // International Journal of Molecular Sciences. - 2025. - Vol. 26. - 8986. - DOI: 10.3390/ijms26188986.