Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования

«НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «СИРИУС»»

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

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Решетников Василий Владимирович

Федеральная территория «Сириус» - 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 7

ГЛАВА 1. Обзор литературы 15

1.1. История развития технологии создания препаратов на основе РНК .. 15

1.1.1. Фундаментальные открытия 15

1.1.2. Первые *in vivo* исследования мРНК препаратов и переход к терапевтическому применению 18

1.2. Препараты на основе альтернативных РНК-платформ 20

1.2.1. Классические мРНК препараты 20

1.2.2. Кольцевые РНК 26

1.3. Самоамплифицирующиеся РНК 29

1.3.1. Характеристика самоамплифицирующихся РНК 29

1.3.2. саРНК на основе генома артритогенных альфавирусов 34

1.3.3. саРНК на основе генома энцефалитогенных альфавирусов 36

1.4. Природа реактогенности саРНК. 37

1.4.1. Роль рецепторов врожденного иммунного ответа в распознавании саРНК и ее интермедиатов. 37

1.4.2. Компоненты врождённого иммунитета, активируемые в ответ на саРНК 41

1.5. Стратегии оптимизации препаратов на основе саРНК. 44

1.5.1. Аминокислотные замены в неструктурных белках артритогенных альфавирусов, используемых для платформы саРНК 47

1.5.2. Аминокислотные замены в неструктурных белках энцефалитогенных альфавирусов, используемых для разработки платформы саРНК. 49

1.5.3. Другие модификации, используемые при разработке платформы саРНК. 51

1.6. Заключение по литературному обзору. 55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 56
2.1. Материалы и приборы 56
2.1.1. Питательные среды и растворы 56
2.1.2. Бактериальные штаммы и плазмиды 57
2.1.3. Реактивы 58
2.1.4. Оборудование 59
2.1.5. Получение липидных наночастиц, содержащих мРНК и саРНК 59
2.2. Методы генетической инженерии 60
2.2.1. Схема генетических конструкций 60
2.2.2. Полимеразная цепная реакция 61
2.2.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле 64
2.2.4. Очистка фрагментов ДНК и выделение плазмидной ДНК 65
2.2.5. Сборка генетических конструкции методом рестрикции-лигирования . 65
2.2.6. Трансформация клеток *E. coli* методом электропорации и ПЦР-скрининг колоний 66
2.2.7. Выделение и валидация плазмидной ДНК 67
2.2.8. Получение РНК методом транскрипции *in vitro* 67
2.2.9. Выделение РНК из клеток и обратная транскрипция 68
2.2.10. Количественная ПЦР для оценки изменения уровня экспрессии генов 69
2.3. Методы клеточной биологии 70
2.3.1. Клеточные линии 70
2.3.2. Трансфекция клеток линии HEK293T 71

2.3.3. Оценка уровня люминесценции лизатов клеток с помощью репортерного белка люциферазы светлячка 71

2.3.4. Проточная цитометрия клеток линии HEK293T 72

2.4. *In vivo* исследования 74

2.4.1. Оценка продолжительности биолюминесценции *in vivo* 75

2.4.2. Выделение РНК из мышечной ткани, обратная транскрипция и количественная ПЦР 76

2.4.3. Иммунизация мышей 77

2.4.4. Реакция торможения гемагглютинации 78

2.5. Статистическая обработка данных и репрезентация 79

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 81

3.1. Оптимизация трансфекции и сравнение платформ саРНК и мРНК.... 81

3.1.1. Анализ целостности саРНК 81

3.1.2. Оптимизация трансфекции саРНК 82

3.1.3. Трансляционная эффективность саРНК на культуре клеток 86

3.1.4. Уровень биосинтеза репортерного белка после доставки саРНК на модели *in vivo* 91

3.1.5. Оценка гуморального иммунного ответа после иммунизации мышей РНК-препаратами мРНК и саРНК 94

3.2. Влияние аминокислотных замен в nsP2 и nsP3 белках на биогенез саРНК и уровень биосинтеза репортерного белка 98

3.2.1. Влияние аминокислотных замен в nsP2 белке на уровень биосинтеза Fluc 99

3.2.2. Влияние аминокислотных замен G763R и S773P в nsP2 белке саРНК на уровень биосинтеза eGFP 101

3.2.3. Уровень репликации саРНК с мутациями в последовательности гена, кодирующего неструктурный белок nsP2 106

3.2.4. Индукция врожденного иммунного ответа в ответ на доставку саРНК с мутациями в nsP2 белке 108

3.3. Исследование влияния ингибиторов врожденного иммунного ответа на биогенез саРНК и уровень биосинтеза репортерного белка 111

3.3.1. Влияние ингибиторов врожденного иммунного ответа NS1 и p4a на уровень биосинтеза eGFP 111

3.3.2.Влияние индукции врожденного иммунного ответа на биогенез саРНК с ингибиторами врожденного иммунного ответа 116

3.3.3. Влияние ингибиторов врожденного иммунного ответа на уровень репликации саРНК 117

3.4. Исследование влияния синтетического 5’НТО в области субгеномного промотора на биогенез саРНК и уровень биосинтеза репортерного белка 119

3.4.1. Влияние синтетического НТО на уровень биосинтеза eGFP 119

3.4.2. Влияние синтетического 5’НТО на уровень репликации саРНК и индукцию транскрипции генов врожденного иммунного ответа 121

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 123

4.1. саРНК и мРНК различаются по динамике уровня биосинтеза репортерного белка 123

4.2. Аминокислотные замены в неструктурном белке nsP2 меняют паттерн биосинтеза целевого белка и соотношение форм саРНК 125

4.3. Ингибиторы врожденного иммунного ответа закодированные в кассете саРНК повышают уровень биосинтеза целевого белка 127

4.4. Измененная последовательность 5’НТО субгеномной РНК приводит к повышению уровня биосинтеза целевого белка 129

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 131

ВЫВОДЫ 133

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ..... 134

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 138

ПРИЛОЖЕНИЕ А Нуклеотидные последовательности целевых генов 156

ВВЕДЕНИЕ

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 [1,2]. 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 [3,4]. 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 [5,6], а также показана возможность использования вирусных белков-антагонистов врожденного иммунного ответа (NS1, p4a, белок L) для повышения экспрессии трансгена [7–9]. Однако количество исследований, одновременно оценивающих влияние различных типов модификаций на кинетику экспрессии, 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 [10,11], 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.

Цели и задачи работы

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 мутации 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.

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).

По материалам работы опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах:

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 Dmitry**, Vasileva Olga, Bespalov Mikhail, Dzharullaeva Alina, Mazunina Elena, Chubarova Anastasia, Seliverstov Maxim, Smirnykh Denis,

Shevyrev Daniil, Shtraus Sofia, Kozlova Alena, Subcheva Elena, Kleymenov Denis, Bykonia Evgeniia, Baranov Maxim V., Logunov Denis Y., Gushchin Vladimir A., Ivanov Roman, Reshetnikov Vasiliy, Skvortsov Ivan 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, 21, e70335. https://doi.org/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. Int. J. Mol. Sci. 2025, 26, 8986. https://doi.org/10.3390/ijms26188986

Личное участие автора

Автор работы самостоятельно планировал и проводил эксперименты *in vitro,* а также подготавливал препараты саРНК для проведения экспериментов *in vivo* и анализировал результаты статистическими методами. Соискатель самостоятельно интерпретировал полученные результаты и подготавливал публикации по работе совместно с соавторами.

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 источников.

Финансовая поддержка диссертации

Результаты получены при финансовой поддержке исследования, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение № 3-03 от 18 февраля 2025 г.).

Благодарности

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.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. История развития технологии создания препаратов на основе РНК

1.1.1. Фундаментальные открытия

На заре развития молекулярной биологии были совершены знаковые открытия. Так в 1953 году была установлена структура двойной спирали ДНК [12] и в 1955 году подтверждена локализация биосинтеза белка на рибосомах [13]. Однако, механизм трансляции генетической информации в последовательность аминокислот оставался неизвестным. Особую сложность представляла пространственная разобщенность данных процессов в клетках эукариот. Решение этой проблемы было найдено в период с 1961 по 1969 год благодаря усилиям нескольких независимых научных коллективов, что легло в основу центральной догмы молекулярной биологии. Ключевым открытием стало выявление роли матричной РНК (мРНК) как нестабильного промежуточного звена, доставляющего информацию к универсальным рибосомам. Это положение исключило гипотезу о существовании уникальных рибосом, образующихся вследствие транскрипции каждого отдельного гена и функционально привязанных к биосинтезу конкретного белка [14]. Было доказано, что мРНК комплементарна нуклеотидной последовательности ДНК и функционирует в ассоциации с рибосомами [15]. Кроме того, был установлен принцип триплетности генетического кода, согласно которому одна аминокислота кодируется одним нуклеотидным триплетом [16]. Универсальность трансляционного механизма и однозначность соответствия между мРНК и белком были экспериментально верифицированы в ходе синтеза гемоглобина мыши в бесклеточной системе трансляции, полученной из ретикулоцитов кролика [17]. Эти исследования показали, что мРНК кодирует и

переносит генетическую информацию, и заложили теоретическую основу для ее терапевтических и профилактических применений.

Уже в 1970-е годы научное сообщество осознало перспективы применения мРНК в вакцинации и генной терапии. Тем не менее, практическая реализация сталкивалась с серьезными препятствиями, главными из которых были низкая стабильность молекул мРНК и сложность транспорта мРНК через липидные мембраны внутрь клеток. В 1978 году группа исследователей под руководством Марка Остро продемонстрировала принципиальную возможность доставки 9S мРНК глобина кролика (выделенной из ретикулоцитов) в клетки человеческой карциномы гортани (линия HEp-2) с помощью униламеллярных липосом, что обеспечило экспрессию целевого белка. В результате обработки рибонуклеазами липидных частиц было подтверждено, что инкапсулированная мРНК сохранялась внутри липосом до момента проникновения в клетку [18]. Параллельно в том же году Гиоргос Димитриадис с коллегами продемонстрировал эффективность мультиламеллярных липосом не только на трансформированных клеточных линиях, но и на первичных дифференцированных клетках (спленоцитах мыши). Было выявлено, что уровень синтеза целевого белка находится в прямой зависимости от дозы введенного мРНК-липосомального комплекса [19].

В ранних работах исследователи были вынуждены очищать мРНК из живых клеток, что усложняет процесс разработки препаратов. Качественный прогресс произошел в 1984 году, когда был разработан метод высокоэффективного синтеза биологически активной мРНК *in vitro* по матрице ДНК с использованием РНК-полимеразы SP6 бактериофагов. Система базировалась на плазмидах, содержащих специфический промотор фага SP6, что обеспечивало высокую специфичность и выход мРНК, а функциональность полученной мРНК была подтверждена микроинъекцией в ооциты *Xenopus laevis* с последующей детекцией целевого белка [20]. Это заложило основу для синтеза РНК *in vitro*, и в дальнейшем после предоставления данных об эффективности T7 РНК-полимеразы [21], а также появление первых коммерческих T7 полимераз в период с 1986 по 1990 годы сделало процесс транскрипции рутинным и доступным.

Ранние поколения липосомальных векторов, составленные из нейтральных или отрицательно заряженных липидов, имели существенные недостатки. Электростатическое отталкивание затрудняло инкапсуляцию нуклеиновых кислот, а слабое взаимодействие с отрицательно заряженной поверхностью клеточных мембран приводило к низкой эффективности трансфекции (менее 1% экспрессирующих клеток) [22]. В 1987 году была существенно повышена эффективность доставки нуклеиновых кислот в клетки эукариот с помощью катионного липида DOTMA (N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмоний хлорид). Благодаря электростатическому притяжению он спонтанно формировал комплексы с нуклеиновыми кислотами [23]. Положительно заряженные липосомы эффективно адгезировались к клеточной поверхности и сливались с плазматической мембраной, обеспечивая высвобождение нуклеиновых кислот в цитоплазму. Это позволило повысить эффективность трансфекции на 2–3 порядка на широком спектре клеточных линий без необходимости использования вирусных векторов или электропорации [23,24]. Благодаря повышению доступности на рынке Т7 полимеразы, в 1989 году применили липосомы на основе DOTMA для доставки *in vitro* синтезированной мРНК кодирующей последовательность белка люциферазы, оптимизировав соотношение липид : РНК, условия инкубации, а также оценили влияние кэпирования и нетранслируемых областей (НТО) на эффективность трансляции [25]. Эти катионные липосомы эффективно доставляли мРНК в клетки человека, мыши, крысы, лягушки и дрозофилы, а кэпированные мРНК с β-глобиновыми НТО-последовательностями демонстрировали экспрессию в 1000 раз выше, чем неоптимизированные транскрипты [25]. Таким образом, было впервые доказано, что катионные липидные носители могут обеспечивать высокоэффективную доставку функциональной мРНК, открыв путь к терапевтическому применению технологии.

В целом все полученные данные показали, что липидные вектора защищают РНК от деградации, а заряд липидов имеет определяющее значение для эффективности инкапсуляции и доставки РНК в клетки. Также стало ясно, что структура мРНК влияет на трансляцию закодированных на мРНК генов и была

показана универсальность применения липосом для доставки РНК в различные клеточные культуры.

1.1.2. Первые *in vivo* исследования мРНК препаратов и переход к терапевтическому применению

Переход от клеточных моделей к экспериментам *in vivo* в 1990-е годы стал следующим этапом, позволяющим оценить реальную терапевтическую и профилактическую ценность экзогенной РНК в условиях сложной физиологической среды. Пионерской работой, доказавшей принципиальную возможность экспрессии чужеродных генов после прямого введения «голой» мРНК, стало исследование Вольфа и соавт. [26]. Внутримышечная инъекция мышам очищенной мРНК, кодирующей последовательность белка люциферазы и β-галактозидазы, приводила к локальному биосинтезу целевых белков, уровень которых сохранялся до 7 суток в месте введения. Несмотря на крайне низкое количество целевого белка по сравнению с использованием плазмидной ДНК, работа подтвердила, что мРНК способна проникать в цитоплазму клеток и инициировать синтез белка. В отличие от ДНК-векторов, требующих осуществления ядерной транслокации, мРНК работает исключительно в цитозоле, что полностью исключило риски инсерционного мутагенеза и открыло широкие возможности для применения мРНК-препаратов.

Параллельно развивалось направление мРНК-вакцин. В 1993 году Мартинон и соавт. продемонстрировали, что внутримышечное введение мРНК, кодирующей нуклеопротеин вируса гриппа, привело к формированию специфического Th1-ответа и защищало мышей от летального заражения [27]. При этом авторы отметили, что «голая» мРНК, пустые липосомы или их простая смесь (без инкапсуляции нуклеиновой кислоты) не вызывали значимого иммунного ответа, что убедительно свидетельствовало о необходимости упаковки РНК в липидные

носители. В области онкологии важным методологическим сдвигом стала стратегия *ex vivo* трансфекции дендритных клеток (ДК) с их последующим введением реципиенту. В работе Бочковски и соавторов из лаборатории Эли Гилбоа этот подход был впервые применен для противоопухолевой терапии: ДК, трансфицированные мРНК опухолевых антигенов, эффективно презентовали эпитопы *in vivo*, индуцируя антиген специфический клеточный иммунитет без применения дополнительных адъювантов [28].

Несмотря на принципиальные успехи, анализ ранних *in vivo* исследований выявил системные ограничения, препятствовавшие быстрой клинической трансляции мРНК-технологии. Во-первых, «голая» мРНК подвергалась стремительной деградации внеклеточными рибонуклеазами, что требовало введения высоких доз (сотен микрограммов на животное) для достижения терапевтического эффекта. Во-вторых, отсутствие эффективных систем доставки приводило к преимущественной локализации транскриптов в межклеточном матриксе и лизосомах, где происходил их гидролиз еще до попадания в цитоплазму. В-третьих, уже на этом этапе отмечалась выраженная активация врожденного иммунного ответа: введение синтетической мРНК сопровождалось транзиторной лихорадкой, повышением уровней провоспалительных цитокинов (IFN-α, IL-6, TNF-α) и глобальным подавлением трансляции в трансфицированных клетках [29,30]. Эти эффекты были обусловлены распознаванием экзогенной РНК и ее примесей, образующихся в процессе *in vitro* транскрипции (неоптимизированных структурных элементов и примесей двухцепочечной РНК) клеточными паттерн-распознающими рецепторами (TLR3, TLR7/8, RIG-I, MDA5).

К началу 2000-х годов стало очевидно, что низкая стабильность терапевтических РНК в биологических жидкостях и неэффективная внутриклеточная доставка являются главными барьерами их клинического применения. Подчеркивалось, что для достижения терапевтического эффекта необходимо не просто доставить молекулу в клетку-мишень, но и преодолеть эндосомальный барьер, обеспечить достаточный уровень трансляции и длительности действия, а также избежать неспецифической активации

интерферонового пути [31,32]. Для решения этих проблем разрабатывались химические модификации нуклеотидов, пептид- и липид-опосредованных системы доставки, а также создавались вектора, обеспечивающие стабильную экспрессию в долгоживущих клеточных популяциях [31,32]. Прорыв в развитии мРНК-технологии произошел благодаря фундаментальным исследованиям Каталин Карико и Дрю Вайсмана в 2005 году, они впервые детально описали молекулярную основу реактогенности *in vitro* синтезированной мРНК и доказали, что замена уридина на модифицированные нуклеотиды (в частности, псевдоуридин) кардинально снижает активацию TLR-зависимых сигнальных путей [33]. Эти работы окончательно сформировали стратегический вектор развития мРНК-технологий, обеспечив переход от нативных транскриптов к искусственно оптимизированным мРНК-конструкциям в сочетании с наноразмерными системами доставки.

Таким образом, в период 1990–2005 гг. была доказана принципиальная работоспособность мРНК как терапевтического агента *in vivo*, но одновременно стали очевидны фундаментальные ограничения, требовавшие междисциплинарных решений на стыке биохимии нуклеиновых кислот, иммунологии и нанобиотехнологий.

1.2. Препараты на основе альтернативных РНК-платформ

1.2.1. Классические мРНК препараты

Классические (неамплифицирующиеся) мРНК-препараты представляют собой одноцепочечные молекулы матричной РНК, которые несут генетическую информацию для биосинтеза белка на клеточных рибосомах в цитоплазме клеток-мишеней [34,35]. Данный класс препаратов функционирует исключительно в

цитозоле, не требуя ядерной транслокации, что полностью устраняет риск инсерционного мутагенеза и расширяет возможности применения в неделящихся клетках [35,36]. Трансляция экзогенной мРНК интернализованной в цитозоль может осуществляться как непрерывно, обеспечивая высокие уровни биосинтеза белка, так и регулируемо, благодаря введению последовательностей рибопереключателей (riboswitches), активирующих инициацию трансляции в присутствии или отсутствии определенных лигандов [37,38]. В настоящее время на этапах первой и второй фаз ведутся клинические испытания препаратов на основе мРНК против возбудителей инфекционных заболеваний таких как цитомегаловирус (CMV), вирус Зика, метапневмовирус человека/парагрипп 3 типа (hMPV/PIV3), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), грипп A (H7N9), грипп A (H1N1, H3N2), грипп B (линия Ямагата, линия Виктория), грипп A (H3N2), грипп A, вирус чикунгунья, вирус бешенства [39,40]. Также на второй фазе клинических испытаний находятся препараты против меланомы, колоректального рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, ассоциированной с ВПЧ16 (HPV16+ head-and-neck squamous carcinoma) и немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ/NSCLC) [41].

Формирование технологического стандарта для классических мРНК-препаратов стало возможным благодаря комплексной инженерной оптимизации всех структурных элементов транскрипта. Как было отмечено в предыдущем разделе, ключевым прорывом стала работа Каталин Карико и Дрю Вайсмана, в которой впервые было показано, что замена уридина на модифицированные нуклеозиды, в частности псевдоуридин (Ψ) и N1-метилпсевдоуридин (m1Ψ), снижает распознавание синтетической мРНК толл-подобными рецепторами (TLR3, TLR7/8) и RIG-I-подобными геликазами [33]. Оптимизация 5'-конца транскрипта включает введение кэп-структуры, необходимой для рекрутирования фактора инициации трансляции eIF4E и защиты от 5'→3' экзонуклеаз. Кэпирование в ядре происходит во время транскрипции и опосредуется РНК-трифосфатазой, гуанилилтрансферазой и метилтрансферазой, в результате чего образуется 7-метилгуанозин (m7G) на 5′-конце мРНК (m7GpppN, Cap0) [42]. Структура 5′-кэпа

также позволяет эукариотической клетке различать собственные и экзогенные молекулы мРНК [43]. Всего можно выделить 4 основных типа структур кэпа: кэп-0, кэп-1, кэп-2 и N6, 2′-*O*-диметиладенозин (m6Am) кэп. Кэп-1 образуется путем метилирования 2'-гидроксильной группы первого нуклеотида структуры кэп-0 и последующее 2'-*O*-метилирование второго нуклеотида образует кэп-2, который присутствует примерно в 50% всех транскриптов. Стоит отметить, что цитозольный рецептор врождённого иммунитета RIG-I (Retinoic acid-inducible gene I), распознает некэпированные РНК или РНК с кэп-0, но РНК с модификациями кэп-1 избегают распознавания RIG-I [43]. Современные методы ко-транскрипционного кэпирования (например, технология CleanCap®) обеспечивают эффективность кэпирования >95% и формирование кэп-1 структуры, что дополнительно снижает иммуногенность и повышает трансляционную эффективность по сравнению с кэп-0 аналогами типа ARCA (anti revers cap analog) [43].

НТО регулируют стабильность и ход трансляции мРНК: 5'-НТО высоко экспрессируемых генов (например, α-глобина человека) повышает частоту рекрутирования рибосом, тогда как 3'-НТО с элементами, стабилизирующими мРНК (например, из β-глобина), замедляют деаденилирование и экзосомальную деградацию [44,45]. Длина поли(А)-хвоста в диапазоне 100–150 адениловых остатков обеспечивает баланс между стабильностью транскрипта и эффективностью взаимодействия с поли(А)-связывающим белком (PABP), необходимыми для замыкания мРНК в функциональный «кольцевой» комплекс с кэп-связывающими факторами [45,46]. Кодоновая оптимизация – замена редко используемых кодонов на синонимичные, соответствующие тРНК, присутствующим в клетках-хозяевах в высокой концентрации, – дополнительно повышает выход функционального белка на 1–2 порядка по сравнению с нативными последовательностями. Однако, кодоновая оптимизация требует осторожности, поскольку избыточная оптимизация может нарушать кинетику элонгации и приводить к неправильному фолдингу белка или усилению иммуногенности [47].

Эффективная доставка классической мРНК *in vivo* невозможна без наноразмерных носителей, защищающих нуклеиновую кислоту от внеклеточных рибонуклеаз и обеспечивающих клеточный захват. Золотым стандартом стали липидные наночастицы (ЛНЧ), архитектура которых включает четыре ключевых компонента: ионизируемый липид, вспомогательный фосфолипид (обычно DSPC), холестерин и ПЭГ-липид [48,49]. Ионизируемый липид (например, SM-102 в вакцине mRNA-1273 или ALC-0315 в BNT162b2) нейтрален при физиологическом pH, что снижает системную токсичность, но протонируется в кислой среде эндосом (pH ~5.5–6.0), приобретая положительный заряд. Это приводит к дестабилизации эндосомальной мембраны и обеспечивает высвобождение мРНК в цитоплазму благодаря эффекту «протонной губки» либо за счет слияния липидного бислоя наночастицы с эндосомальной мембраной [48]. Вспомогательный фосфолипид 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), благодаря насыщенным ацильным цепям и цилиндрической молекулярной геометрии, формирует ламеллярную фазу, которая стабилизирует структурную целостность липидных наночастиц и предотвращает преждевременное высвобождение мРНК [48]. Холестерин модулирует физико-химические свойства липидного бислоя, увеличивает плотность упаковки липидов и поддерживает оптимальную текучесть мембраны, что критически важно для стабильности частиц при хранении и их взаимодействия с клеточными мембранами [48,50]. ПЭГ-липиды (например, ПЭГ2000-DMG) выполняют многофункциональную роль: они снижают агрегацию частиц за счет стерического отталкивания, уменьшают опсонизацию и продлевают время циркуляции, ограничивая клиренс через мононуклеарную фагоцитарную систему и почечную фильтрацию [48]. При этом экспериментально показано, что быстрое отщепление ПЭГ-липидов с короткими ацильными цепями в физиологических условиях необходимо для презентации поверхности наночастицы, для последующей адсорбции сывороточных белков, обеспечивая клеточный захват и последующий эндосомальный выход [48,51]. Оптимизация молярного соотношения компонентов, размера частиц (60–100 нм) и поверхностного заряда (ζ-потенциал близкий к нулю) позволила достичь высокой эффективности

трансфекции в антиген-презентирующих клетках, гепатоцитах и других тканях-мишенях [48].

Клиническая валидация платформы классической мРНК прошла в трех ключевых терапевтических направлениях. Наиболее масштабный успех был достигнут в профилактической вакцинации, в частности экстренная разработка препаратов BNT162b2 и mRNA-1273 в 2020–2021 гг. продемонстрировала, что комбинация мРНК с модифицированными нуклеотидами, кэп-1 структурой, оптимизированными НТО и ЛНЧ-доставкой обеспечивает формирование гуморального иммунного ответа и выраженный Т-клеточный ответ при уровне эффективности >90% против исходного штамма SARS-CoV-2 [52]. В области онкоиммунотерапии персонализированные мРНК-вакцины, кодирующие неоантигены пациента, демонстрируют клиническую эффективность в комбинации с ингибиторами иммунных контрольных точек. В рандомизированном исследовании фазы 2b (KEYNOTE-942, n=157) у пациентов с полностью резецированной меланомой стадии IIIB–IV добавление индивидуализированной неоантигенной терапии mRNA-4157 (V940) к пембролизумабу привело к статистически значимому увеличению выживаемости без рецидивов: отношение рисков (HR) рецидива или смерти составило 0,561 (95% ДИ 0,309–1,02) по сравнению с монотерапией пембролизумабом [53]. При медиане наблюдения 5 лет комбинация обеспечила снижение риска рецидива или смерти на 49%, при этом 2,5-летняя выживаемость без рецидивов составила 74,8% в группе с комбинированной терапией против 55,6% в группе монотерапии [54]. Иммунологический анализ в рамках исследования фазы 1 и последующего расширения когорты подтвердил, что вакцина mRNA-4157 (V940) индуцирует специфичные к неоантигенам ответы Т-клеток как CD4+, так и CD8+-фенотипа, а также демонстрирует феномен «расширения эпитопов» (epitope spreading), свидетельствующий о формировании поликлонального противоопухолевого иммунитета [53]. Данный эффект обусловлен способностью мРНК-вакцин обеспечивать перекрестную презентацию антигенов дендритными клетками и

поляризацию ответа в сторону Th1-фенотипа, что критически важно для преодоления опухолевой иммунной толерантности [55].

Несмотря на доказанную клиническую эффективность, классическая неамплифицирующаяся мРНК обладает присущими ограничениями. Во-первых, транзиторный характер экспрессии обусловлен отсутствием механизмов внутриклеточной репликации и естественной деградацией транскрипта клеточными экзорибонуклеазами, что обусловливает необходимость повторных введений для поддержания терапевтического уровня белка при хронических показаниях [36,45]. Во-вторых, достижение достаточной внутриклеточной концентрации часто требует доз в диапазоне 10–100 мкг на инъекцию, а при необходимости повторных курсов совокупная стоимость лечения может существенно возрастать [56]. В-третьих, повторные введения мРНК, инкапсулированной в липидные наночастицы, могут индуцировать выработку антител против компонентов вектора, в первую очередь – против ПЭГ-липидов, что потенциально способно ускорять клиренс последующих доз и снижать эффективность терапии [57,58]. В-четвёртых, стандартная архитектура липидных наночастиц демонстрирует выраженный печёночный тропизм после системного введения, что обусловлено быстрой опсонизацией частиц сывороточным аполипопротеином Е (ApoE) и последующим захватом гепатоцитами посредством рецепторов липопротеинов низкой плотности [48,59]. Доставка мРНК в периферические ткани, центральную нервную систему или иммунопривилегированные компартменты не осуществляется нативными ЛНЧ и требует сложной инженерии поверхности частиц: модификации кинетики отщепления ПЭГ-липидов [60], включения селективно распределяющихся «SORT-компонентов» [61] или ковалентной конъюгации таргетных лигандов (пептидов, аптамеров, фрагментов антител), специфичных к рецепторам клеток-мишеней [62–64]. Указанные ограничения фармакокинетики и биораспределения стимулировали развитие альтернативных платформ РНК, способных к внутриклеточной автокаталитической репликации или обладающих повышенной структурной резистентностью к рибонуклеазам. В результате были созданы и активно

исследуются препараты на основе кольцевой РНК (кРНК) и самоамплифицирующейся РНК, принципы функционирования и стратегические преимущества которых рассматриваются в последующих разделах.

1.2.2. Кольцевые РНК

Кольцевые РНК представляют собой класс одноцепочечных нуклеиновых кислот, ковалентно замкнутых в непрерывное кольцо за счёт образования фосфодиэфирной связи между 3'- и 5'-концами транскрипта [65]. В отличие от линейных мРНК, кРНК не содержат свободных терминальных концов, что делает их устойчивыми к действию клеточных экзонуклеаз и обеспечивает высокую стабильность как внутри клеток, так и в биологических жидкостях [66,67]. В естественных условиях кРНК образуются в ядре клеток эукариот в результате процесса обратного сплайсинга (back-splicing), при котором донорный сайт сплайсинга соединяется с акцепторным сайтом вышестоящего экзона [67]. Для терапевтического применения используются исключительно синтетические конструкции, архитектура которых оптимизирована для контролируемой экспрессии целевого белка [68].

Главным технологическим преимуществом кРНК-препаратов является преодоление фундаментального ограничения классической мРНК – кратковременности экспрессии целевого белка. У кольцевых молекул увеличен период полужизни транскрипта в клетках-мишенях с 24–72 часов до нескольких дней и даже недель, что подтверждено в доклинических моделях [68,69]. Длительный уровень биосинтеза белка с матриц кРНК позволяет существенно снизить терапевтическую дозу (до 1–10 мкг на инъекцию) и уменьшить кратность введений, что потенциально может решить проблемы производственных затрат и иммуногенности, ассоциированные с повторным введением линейных мРНК [68]. Было показано, что препарат против SARS-CoV-2 на основе кРНК, кодирующей

RBD домен спайк-белка, приводил к формированию выраженного гуморального иммунитета (нейтрализующие антитела) и Th1-клеточного ответа, обеспечивая надежную защиту от SARS-CoV-2 как у мышей, так и у макак-резус [70].

Механизм трансляции кольцевых РНК отличается от кэп-зависимой инициации, характерной для линейных мРНК. Поскольку кРНК лишены 5'-кэпа и 3'-поли(А)-хвоста, рекрутирование рибосом осуществляется кэп-независимыми путями, среди которых наиболее изучена инициация за счет внутренних сайтов посадки рибосомы (IRES) [71] и N6-метиладенозин (m6A)-опосредованная инициация [72]. IRES-элементы, как правило, заимствованные из вирусных геномов (например, вируса энцефаломиокардита мышей или вируса ящура) [73,74] они формируют сложные вторичные и третичные структуры, которые напрямую связывают 43S-преинициационный комплекс, без стадии сканирования от 5'-конца [71,75]. Альтернативный механизм происходит через стадию эпитранскриптомной модификации m6A, что приводит к распознаванию метилированных остатков аденозина фактором eIF3, который в комплексе с РНК-геликазой DHX29 обеспечивает посадку 40S-субъединицы вблизи модифицированного участка и запускает трансляцию [72,76]. В терапевтических конструкциях предпочтение отдаётся IRES-зависимым системам, поскольку они обеспечивают более высокий и воспроизводимый выход белка, тогда как m6A-опосредованная трансляция сильно варьирует в зависимости от клеточного контекста, уровня активности метилтрансфераз METTL3/14 и доступности соответствующих геликаз [77].

Производство терапевтических кРНК осуществляется методом *in vitro* транскрипции (IVT) с последующим ферментативным или автокаталитическим образованием кольцевой ковалентно замкнутой структуры. Наиболее распространённые стратегии включают использование пермутированных интрон-экзонных кассет (PIE), рибозимов группы I, а также T4 РНК-лигазы, конденсирующих концы линейного предшественника [78,79]. После кольцевания РНК обязательным этапом является обработка рибонуклеазой RNase R, селективно деградирующей остаточную линейную РНК, что обеспечивает чистоту конечного препарата >95%. Однако процесс характеризуется относительно низким выходом

(обычно 20–40% от исходной матрицы), сложностью масштабирования и высокими требованиями к аналитическому контролю, что остаётся ключевым барьером для введения в клиническую практику [80,81].

Системы доставки кРНК *in vivo* базируются на липидных наночастицах, ЛНЧ. Несмотря на структурные отличия от линейной мРНК, стандартные четырёхкомпонентные ЛНЧ (ионизируемый липид, DSPC, холестерин, ПЭГ-липид) эффективно инкапсулируют кРНК, обеспечивая сопоставимую эффективность трансфекции гепатоцитов и антиген-презентирующих клеток [80,82,83]. При этом кольцевая структура молекулы может влиять на упаковку в липидный бислой и кинетику высвобождения из ЛНЧ в цитоплазму, что требует дополнительной оптимизации соотношения липид:РНК и выбора ионизируемого липида с соответствующим pKa [82]. Доклинические исследования продемонстрировали, что однократное введение кРНК-ЛНЧ, кодирующих спайк-белок SARS-CoV-2 или терапевтические ферменты, индуцирует устойчивый гуморальный и клеточный иммунный ответ, сохраняющийся не менее 12 недель, при значительно меньшей локальной реактогенности по сравнению с эквивалентными дозами линейной РНК [69,70,84].

Несмотря на перспективность платформы, разработка кРНК-препаратов сталкивается с рядом ограничений. Во-первых, отсутствие утверждённых регуляторных методик стандартизации и контроля качества кольцевых транскриптов усложняет процедуру подачи заявки на клинические испытания [85]. Во-вторых, эффективность IRES-зависимой трансляции кРНК подвержена тканеспецифической вариабельности, обусловленной гетерогенностью экспрессии клеточных факторов трансактивации (ITAFs) [86]. Кроме того, риск нежелательного цис-взаимодействия между элементами IRES и открытой рамкой считывания конкретного антигена ставит вопрос о необходимость индивидуальной настройки и прецизионного подбора регуляторных элементов для каждой терапевтической конструкции [87]. В-третьих, протяженные внутримолекулярные дуплексы могут распознаваться ПРР, индуцируя транскрипцию интерферонов I типа, что может привести к блоку инициации трансляции посредством активации

PKR, полностью нивелируя преимущество пролонгированного уровня биосинтеза белка платформой саРНК [69,88]. В-четвёртых, высокая себестоимость ферментативного кольцевания РНК и многоступенчатый процесс очистки ограничивает экономическую целесообразность платформы для массовых программ вакцинации, смещая фокус применения в сторону заместительной терапии и онкоиммунотерапии, где допустимы более высокие затраты на курс лечения [85,89]. Указанные технологические барьеры, наряду с потребностью в платформах, сочетающих длительную экспрессию с возможностью внутриклеточной амплификации, стимулировали параллельное развитие платформы саРНК.

1.3. Самоамплифицирующиеся РНК

1.3.1. Характеристика самоамплифицирующихся РНК

саРНК кодируют последовательности неструктурных белков (nsPs) альфавирусов семейства *Togaviridae*, которые формируют репликативный аппарат. СаРНК является смысловой РНК, длина которой варьируется в диапазоне 8-15 т. н. в зависимости от закодированных целевых генов. На 5’ конце имеет структуру кэпа, регуляторные консервативные элементы последовательности (CSE), неструктурные гены, кодирующие белки необходимые для репликации РНК, субгеномный промотор (СГП), под которым располагается последовательность целевых генов, которую замыкают 3’CSE и полиА хвост (Рисунок 1.1). 5’ кэп представляет собой структуру кэп-0 (N7mGppp), которая позволяет саРНК подобно вирусной РНК имитировать мРНК клеток хозяина, однако отсутствие метилирования в 2'-О-положениях рибоз первых двух нуклеотидов может приводить к стимуляции рецепторов врожденной иммунной системы [90].

Особенность 5’ конца саРНК заключается в том, что последовательность на 5’ конце начинается с мотива AU за которым сразу следует сегмент, образующий 5’CSE - очень консервативную шпилечную структуру, необходимую для функционирования RdRp [91]. Отклонение в последовательности 5’CSE от консенсуса приводят либо к снижению, либо к полной утрате репликации саРНК [91]. саРНК подобно мРНК содержит полиА-хвост на 3’ конце [90]. Согласно модели, предложенной Фроловым с соавторами, 5’-кэп и полиА-хвост, вероятно, пространственно сближаются между собой во взаимодействии с цитоплазматическими факторами трансляции, что позволяет инициировать трансляцию вирусной РНК, как и у классической мРНК [92]. Важнейшие для репликации саРНК области 5’CSE и 3’CSE формируют шпилечные структуры необходимые для распознавания комплексом RdRp (Рисунок 1.1А). На рисунке 1.1Б представлена вероятная вторичная структура первых 230 нуклеотидов саРНК на основе вируса венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV). Как сообщают Жиль Мишель и соавторы [93] на примере вируса лошадиного энцефалита, мутации в последовательности протяженностью в 51 оснований значительно снижают репликацию РНК. Эта последовательность находится со стороны 5’-конца саРНК, содержит две шпилечные вторичные структуры и охватывает часть последовательности кодирующей nsP1 белок (Рисунок 1.1Б). Кроме того, представленные на рисунке 1.1Б малый “стебель” и большая структура стебель/петля играют немаловажную роль как в репликации, так и в трансляции неструктурных генов [91,93]. Таким образом, эти мотивы критически необходимы для функционирования саРНК.

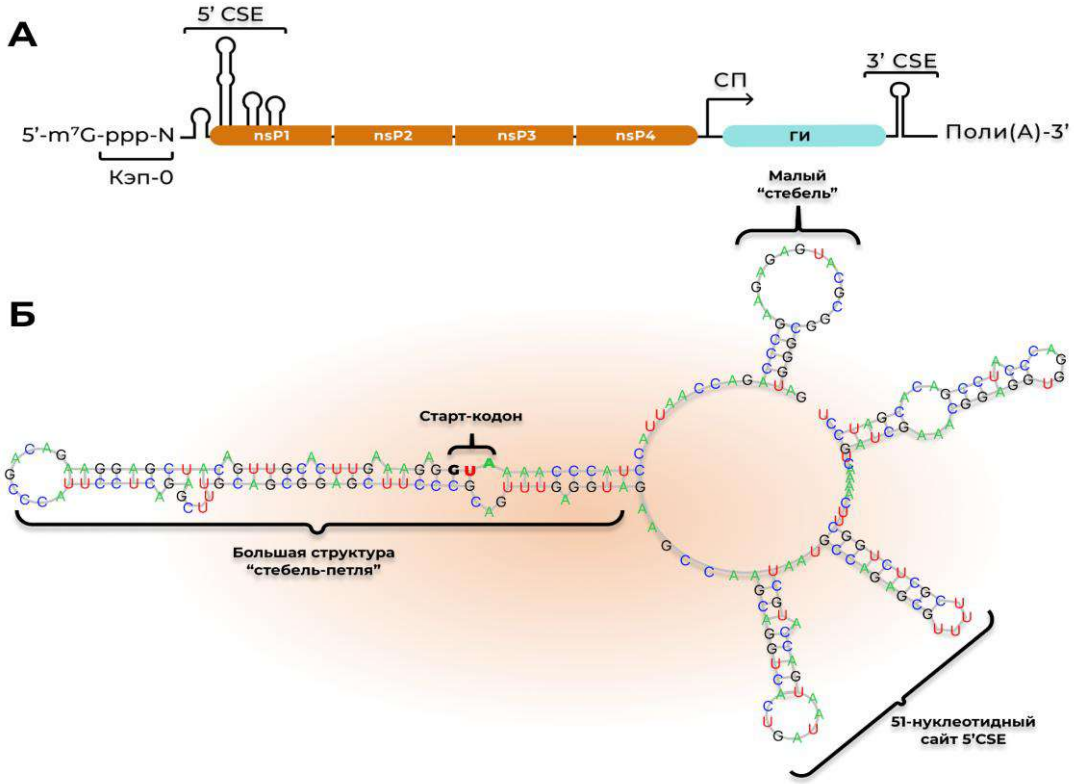


Рисунок 1.1 – А: Структура саРНК: 5′-кэп-0 (N7mGppp); 5′-CSE – включает 4 структуры «стебель-петля», функционально облегчает рекрутирование рибосомного комплекса и факторов трансляции, а также синтез (+)РНК с помощью RdRp; nsP1–4 – область, кодирующая неструктурные белки; СГП – функционирует как сайт связывания рибосомы и сайт начала синтеза субгеномной (+)РНК; ГИ – последовательность, кодирующая целевые белки; 3′-CSE – синтез (−)РНК с помощью RdRp; поли(А)-хвост – потенциальный сайт связывания белков PABP и формирования комплекса инициации трансляции; Б: Структура области 5′-CSE. Включает 4 структуры «стебель-петля», участвующие в инициации трансляции и синтезе (+)РНК.

После попадания в цитоплазму саРНК привлекает факторы инициации трансляции и рибосомы, после чего инициируется трансляция последовательности неструктурных генов (Рисунок 1.2). На первом этапе с последовательности неструктурных генов биосинтезируется либо полипротеин nsP123 за счет наличия опалового стоп кодона, либо полипротеин nsP1234, который протеолитически расщепляется на две части: nsP123 и nsP4, посредством цис взаимодействия с доменом nsP2 полипротеина nsP123 обладающего протеазной активностью. [94,95]. Формы неструктурных белков nsP123 и отдельно nsP4 преобладают на

ранних этапах репликации РНК обеспечивая синтез антисмысловой РНК, что приводит к образованию двухцепочечной РНК. Вероятно, когда концентрации nsP123 и антисмысловой РНК достигают относительно высоких значений в цитозоле, домен nsP2 полипротеина nsP123 через транс взаимодействие селективно гидролизует полипротеин nsP123 на отдельные nsP1, nsP2 и nsP3. На данном этапе синтез антисмысловой РНК снижается, инициируется синтез смысловой геномной и субгеномной РНК, который происходит в мембранных выпячиваниях, называемых сферулами, которые формируются благодаря действию неструктурных белков nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4 [96–98]. В сферулах дцРНК и репликативный аппарат изолирован от цитозоля, тем самым снижая взаимодействие с ПРР. Неструктурные белки образуют пороподобные конструкции между сферулой и цитозолем называемые в англоязычной литературе “neck complex” [98], обеспечивая селективное сообщение между компартментами. Синтез субгеномной (+)РНК инициируется на субгеномном промоторе, и в дальнейшем она используется как матрица для биосинтеза целевых белков в цитозоле.

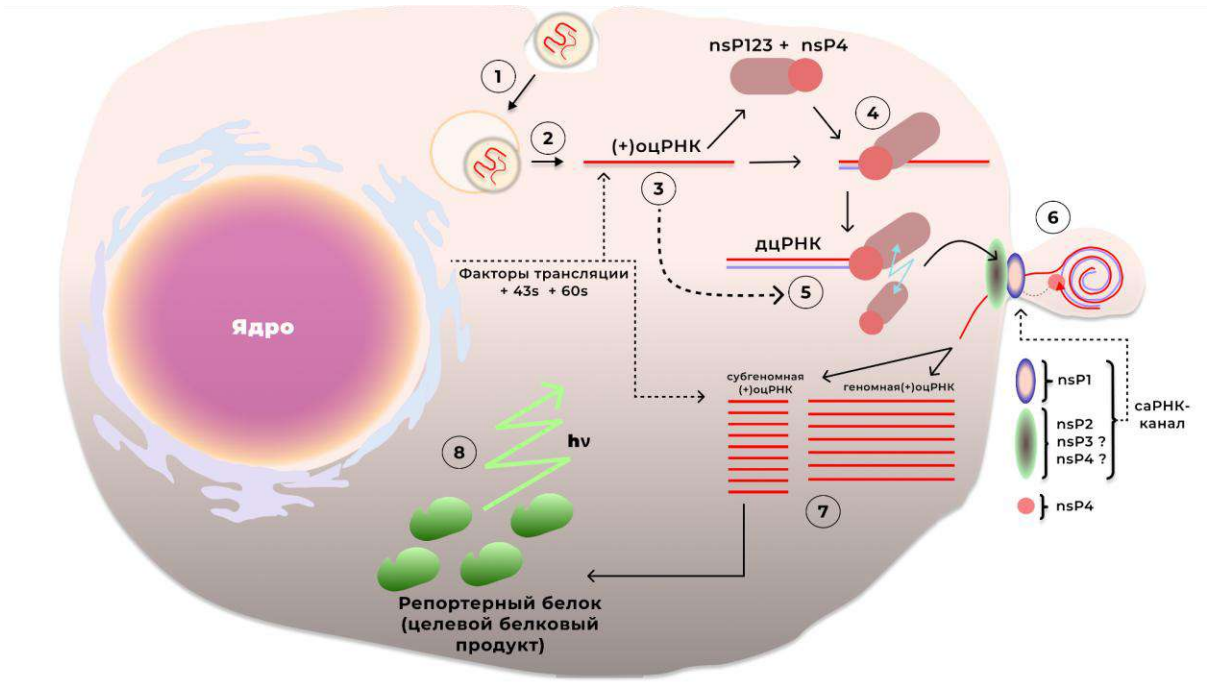


Рисунок 1.2 - Схема функционирования саРНК в клетке. 1 - эндоцитоз липидных наночастиц, содержащих саРНК; 2 - высвобождение саРНК из эндосом и выход в цитоплазму; 3 - привлечение факторов трансляции и рибосом, и трансляция неструктурных белков nsP123 и nsP4 (либо nsP1234, после чего происходит цис-«разрезание» полипротеина на nsP123 и nsP4); 4 - синтез антисмысловой РНК первичным комплексом nsP123 и nsP4 в цитоплазме (направление синтеза относительно матричной цепи от 3’ к 5’); 5 - после накопления белков nsP123 и nsP4 из шага 3 происходит транс «разрезание» белка nsP123 сначала на nsP1 и nsP23, затем nsP23 «разрезается» на nsP2 и nsP3; 6 - образование сферулы посредством заякоривания белка nsP1 в плазматической мембране, с последующим гомотипическим взаимодействием белков nsP2 и nsP3 между собой и цитоплазматической частью nsP1. Изоляция дцРНК от цитозольного компартмента клетки, синтез (+)РНК в сферулах с помощью nsP4 белка, кэпирование опосредованное nsP1 и выведение (+)РНК в цитозоль; 7 – Синтезируется 2 типа (+)РНК: полноразмерная последовательность саРНК и последовательность ограниченная СГП и poly(A)-хвостом. Трансляция ГИ инициируется на СГП; 8 - Накопление целевого белкового продукта.

Каждый из неструктурных белков вносит вклад в репликацию РНК, однако, помимо своей прямой репликативной роли, неструктурные белки также влияют на клеточные процессы, такие как транскрипция, трансляция и интерфероновый ответ. В зависимости от того, какого происхождения имеют элементы саРНК можно ожидать тех или иных влияний неструктурных белков. Функции каждого неструктурного белка описаны в таблице 1.1. Изначально репликативный комплекс саРНК базировался на альфавирусах Старого и Нового Света (по ранней классификации). В настоящее время этот комплекс чаще классифицируют иначе – по тропизму родственных вирусов, выделяя артритогенные и энцефалогенные альфавирусы.

Таблица 1.1 - Функциональная характеристика неструктурных белков саРНК

Белок	Происхождение	Активность	Функции	Отличительная функция
nsP1	Артрогенные вирусы	Гуанино-7N-метилтрансфераза; гуанлилтрансферазa, скаффолд	Каталитическое кэпирование [99,100]; заякоривание в мембране, сборка саРНК-канала и образование сферулы [97,98]	-
	Энцефалитогенные вирусы			-

Продолжение Таблицы 1.1

nsP2	Артрогенные вирусы	γ, β - ATPase, GTPase, Helicase, cystein protease	Протеолитическое расщепление полипротеина nsP1234 [95,101]; участие в процессе кэпирования РНК [100]; геликазная активность в процессе репликации [102–104]	Связывание с ДНК в ядре и разрушение RPB1. Остановка клеточной транскрипции. [105]
	Энцефалитогенные вирусы			-
nsP3	Артрогенные вирусы	Гомотипические взаимодействия с клеточными белками, регуляторная	Посредством связывания через гипервариабельный домен (HVD) с клеточными белками FXR, а также белками, содержащими домен SH3: CD2AP, SH3KBP1, и способствует репликации РНК [106]Явление исключения суперинфекции (SIE) - ограничение сверхрепликации посредством связывания клеточных факторов и их обеднения в клетке [107]	-
	Энцефалитогенные вирусы			-
nsP4	Артрогенные вирусы	РНК-зависимая РНК полимераза; аденилтрансферазная активность	Синтез РНК по матрице РНК [108,109]; Полиаденилирование субстрата РНК с 3' конца [110]	-
	Энцефалитогенные вирусы			-

1.3.2. саРНК на основе генома артритогенных альфавирусов

К артритогенным вирусам относятся вирус Синдбис (SINV), вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус леса Семлики (SFV) и вирус Росс-Ривер (RRV). Эти представители семейства *Togaviridae* индуцируют цитотоксический эффект (ЦТЭ) в основном в клетках суставной ткани [90]. На примере *Chikungunya virus* было

показано, что ЦТЭ возникает в результате нарушений функциональной целостности эндоплазматического ретикулума из-за клеточного стресса и образования аутофагосом, что в конечном итоге приводит к апоптозу примерно через 24 часа после инфицирования [111]. Инициация клеточной гибели происходит по разным причинам: в результате активации врожденного иммунного ответа в ответ на проникновение вируса или ЛНЧ содержащих саРНК или/и благодаря специфическому действию неструктурных и структурных белков. Здесь мы не будем рассматривать действие структурных вирусных белков, так как препараты на основе саРНК их не кодируют. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что nsP2 SINV быстро подавляет клеточную транскрипцию [105]. Модель остановки клеточной транскрипции выглядит следующим образом - неструктурный белок nsP2 связывается с ДНК клетки хозяина благодаря геликазной активности, меняя торсионное напряжение ДНК и одновременно взаимодействуя с ДНК-зависимой РНК-полимеразой II, приводя к остановке полимеразы, запуску системы репарации и деградации каталитической субъединицы [105]. Деградация Rpb1 - каталитической субъединицы комплекса RNAPII, опосредована убиквитинированием Rpb1 вследствие остановки полимеразы в сайте связывания nsP2 с ДНК [105]. В других работах связанных с артритогенными вирусами проявляются те же эффекты nsP2 белка, что подкрепляет общую этиологию клеточной гибели связанной с разрушением Rpb1 [111,112]. Эти результаты свидетельствуют о том, что использование неструктурных белков артритогенных альфавирусов в качестве репликативного аппарата для создания саРНК должно производиться с осторожностью. Поэтому при разработке саРНК на основе генома артритогенных вирусов необходимо модифицировать последовательность nsP2 для того, чтобы снизить реактогенность и избежать других нежелательных эффектов.

1.3.3. саРНК на основе генома энцефалитогенных альфавирусов

К энцефалитогенным альфавирусам относятся вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV), вирус восточного лошадиного энцефалита (EEEV) и вирус западного лошадиного энцефалита (WEEV). Цитотоксический эффект, индуцируемый неструктурными белками энцефалитогенных альфавирусов, отличается от механизма действия белков артритогенных альфавирусов. В отличие от артритогенных альфавирусов, белок nsP2 не играет ключевую роль в ЦТЭ. Основными эффекторами цитотоксичности у энцефалитогенных альфавирусов являются структурные капсидные белки, которые блокируют ядерные поры, нарушая сигнализацию и транспорт мРНК из ядра [113,114]. Таким образом, при использовании саРНК на основе VEEV можно ожидать отсутствия влияния на ядерный транспорт в клетке, из-за отсутствия последовательности капсидных белков. Эта особенность является одной из причин привлекательности использования репликативного аппарата VEEV для создания саРНК.

Хотя nsPs саРНК на основе энцефалитогенных альфавирусов не оказывают явного воздействия на ЦТЭ, существуют определённые механизмы, снижающие репликативную активность саРНК. Чрезмерная репликация саРНК на основе генома VEEV может ограничиваться суперинфекционным исключением (superinfection exclusion, SIE), которому способствует активность С-концевого гипервариабельного домена (HVD) белка nsP3, секвестрирующего клеточные факторы, необходимые для репликации саРНК [107]. Возможно, что этого эффекта nsP3 достаточно для снижения эффективности репликации саРНК. Таким образом, терапевтическая эффективность на основе саРНК может снижаться при попадании в клетку большого количества саРНК или комбинации нескольких саРНК, поскольку одна саРНК может ингибировать себя или другую саРНК.

Существуют также косвенные данные о том, что важную роль в этом процессе играет белок nsP2, на что указывают исследования мутагенеза [115,116].

Можно предположить, что цистеиновая протеаза nsP2, которая процессирует полипротеины nsP123 и nsP23 с высвобождением nsP3, участвует в инициации SIE. Таким образом, оптимизация последовательности nsP3 широко используется для повышения эффективности платформы создания терапевтических препаратов на основе саРНК с использованием генома энцефалитогенных альфавирусов.

1.4. Природа реактогенности саРНК.

1.4.1. Роль рецепторов врожденного иммунного ответа в распознавании саРНК и ее интермедиатов.

Понимание механизмов, лежащих в основе взаимодействия между саРНК и компонентов врожденной иммунной системы критически важно для разработки эффективной платформы для создания терапевтических препаратов на основе саРНК. Биогенез саРНК в цитозоле клетки проходит через образование (+)оцРНК, (-)оцРНК и дцРНК [90]. Во-первых, саРНК синтезирует полноразмерную (-)-цепь, которая, в свою очередь, служит матрицей для синтеза полноразмерной (+)-РНК, а также для транскрипции субгеномной РНК. Образование (+)-цепи проходит по матрице дцРНК. Таким образом, во время репликации саРНК в клетке-мишени наряду с (+)-цепью субгеномной кэпированной РНК неизбежно образуются двухцепочечные РНК-комплексы и РНК со свободной 5'-трифосфатной группой. Эти РНК-интермедиаты могут стимулировать ПРР [117]. Основные клеточные рецепторы, активирующиеся в ответ на интернализацию саРНК, являются ПРР с внутриклеточной локализацией, включающие эндосомальные рецепторы TLR3, TLR7/TLR8 и цитозольные рецепторы RIG-I и MDA5 [118]. Точная роль различных ПРР в распознавании саРНК и индукции врождённого иммунного ответа ещё

требует уточнения. Основной сигнальный путь, опосредуемый ПРР и активируемый в ответ на саРНК, подробно представлен на Рисунке 1.3.

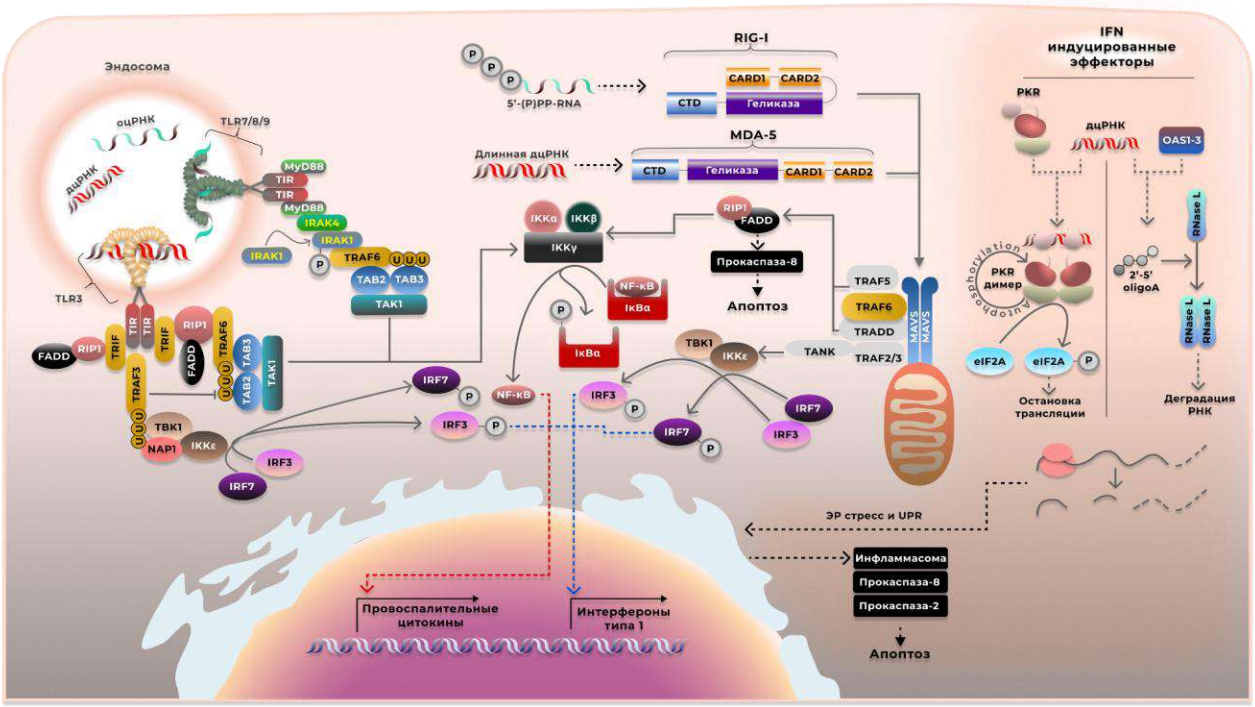


Рисунок 1.3 - Роль рецепторов врожденного иммунного ответа в распознавании саРНК и ее интермедиатов. Промежуточные продукты репликации саРНК преимущественно способны взаимодействовать с TLR3, RIG-I и MDA5. Рецепторы TLR3 располагаются на мембранах эндосом, а в некоторых случаях – на наружной плазматической мембране. Активация TLR3 приводит к фосфорилированию остатков тирозина (Y759 и Y858) в TIR-домене рецептора TLR3, что запускает образование сигнальных комплексов через адаптерные белки TRIF, TRAF6 и TRAF3. Белки TRAF функционируют как убиквитинлигазы и каркасные белки. Их активация вызывает либо высвобождение комплекса p50/p65 (NF-κB) и активацию провоспалительных цитокинов, либо фосфорилирование IRF-3 и активацию IFN-I. Активация RIG-I и MDA5 приводит к сборке комплекса, включающего MAVS и адаптерные белки, на мембранах митохондрий, пероксисом или митоассоциированных мембран ЭР. Убиквитинирование этих адаптерных белков приводит к рекрутированию киназ, что запускает пути, сходные с активируемыми TLR3. IFN-I стимулирует экспрессию, а также активацию PKR и белков семейства OAS. При взаимодействии с двуцепочечной РНК (дцРНК) PKR переходит в активное состояние, димеризуется и транс-фосфорилирует димеры PKR, переводя их в активную форму. PKR фосфорилирует eIF2α, предотвращая формирование 43S рибосомного инициаторного комплекса, и останавливает клеточную трансляцию. OAS при взаимодействии с дцРНК синтезируют 2′-5′-олигоаденилаты, которые активируют RNase L. RNase L димеризуется и

гидролизует клеточные мРНК. Все эти пути так или иначе способны индуцировать апоптоз.

TLR, распознающие саРНК, локализованы в эндоплазматическом ретикулуме, эндосомах и лизосомах. TLR3 преимущественно распознаёт дцРНК, тогда как TLR7 и TLR8 распознают оцРНК [119,120]. Хотя TLR3 и TLR7/8 распознают разные формы РНК, они опосредуют метаболические пути через различные сигнальные адаптеры. Активация TLR3 запускает взаимодействие с адаптерным белком TRIF через внутриклеточный С-концевой домен (TIR), что способствует передаче сигнала по двум путям. Согласно первому механизму, адаптерный белок TRAF3 рекрутирует белок NAP1, который, в свою очередь, рекрутирует серин/треониновые киназы TBK1 и IKKε. Вместе они фосфорилируют фактор транскрипции IRF3, что приводит к транскрипции генов интерферона-бета (IFN-β). Второй механизм зависит от взаимодействия TLR3 с адаптерными белками TRAF6 и RIP1. TLR3 активирует серин/треониновые киназы TAK1, вызывая высвобождение NF-κB. NF-κB транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию провоспалительных цитокинов и антиапоптотических белков (членов семейства Bcl2 и клеточных ингибиторов апоптоза) [121,122]. Взаимодействие саРНК с TLR7/8 активирует MyD88-зависимый путь. MyD88 стимулирует IRF7 через взаимодействие с IRAK1, IRAK4, IKKα, TRAF3 и TRAF6, быстро индуцируя синтез интерферонов (преимущественно IFN-α) и провоспалительных цитокинов [119].

Считается, что внутриклеточные TLR отвечают за первичное распознавание нуклеиновых кислот, высвобождаемых из эндосом [118]. Однако после того, как РНК/ДНК перемещается в цитозоль и инициирует репликацию, образуя промежуточные продукты, основную роль в индукции врождённого иммунного ответа берут на себя цитозольные сенсоры, такие как RIG-I и MDA5. RIG-I и MDA5 являются РНК-геликазами, связывающими дцРНК. Считается, что активация RIG-I опосредуется дцРНК, содержащей ди- или трифосфатные группы на 5'-конце, в то время как MDA5 активируется распознаванием длинной дцРНК [123].

Взаимодействие лиганда с С-концевым доменом сенсора запускает конформационные изменения и индуцирует нижестоящий сигналинг путём связывания с митохондриальным противовирусным сигнальным белком MAVS [124,125]. Дальнейшая передача сигнала опосредуется адаптерными белками TRAF5, TRAF6 и TRAF2/3. Она включает активацию либо IRF3 с последующей продукцией IFN-α/β, либо NF-κB, который индуцирует транскрипцию антиапоптотических и провоспалительных генов [126].

Поскольку сигнальные пути различных рецепторов в значительной степени перекрываются и компенсируют друг друга [127], их точная роль в распознавании саРНК и продуктов ее биогенеза до сих пор не выяснена. Повышение экспрессии генов, кодирующих рецепторы врождённого иммунного ответа, может служить косвенным свидетельством их активации [128]. Исследования по оптимизации последовательности nsP3 саРНК показали, что через 24 часа после введения саРНК в клетках HeLa повышается экспрессия TLR3, MDA5 и RIG-I по сравнению с некодирующей кэпированной мРНК [129]. Никонов с соавт. показали, что репликация саРНК на основе SFV в фибробластах мышей вызывала активацию экспрессии *RIGI* и *MDA5*, индуцируя продукцию IFN-α/β [130], а нокаут *MDA5* и *RIGI* значительно снизил продукцию IFN-β. Эти результаты указывают на то, что активация ПРР зависит от образования дцРНК-интермедиатов во время амплификации саРНК.

Реактогенность саРНК на основе VEEV сравнивали у мышей C57BL/6 дефицитом RDR-адаптера MAVS или нокаутом генов *MyD88/TRIF*, которые отвечают за передачу сигнала TLR7 и мышей C57BL/6 без мутаций. Уровни IFN-α и IFN-β в крови у мышей MAVS(–) были значительно снижены по сравнению с другими группами [127]. Иван Ахрымук с соавт. изучали врождённый иммунный ответ против VEEV и SINV и показали, что два цитозольных сенсора, RIG-I и MDA5, играют одинаково важную роль в индукции первичного противовирусного ответа в течение первых часов после заражения [131]. Согласно этому исследованию, секвестрированные интермедиаты саРНК, включая дцРНК в сферулах, не распознавались TLR3, TLR7 и TLR8.

Резюмируя, наряду с активацией TLR3, TLR7 и TLR8 под действием саРНК, RIG-I и MDA5 также необходимы для ответа на саРНК при наличии остаточной дцРНК, некэпированной РНК и немодифицированных остатков в препаратах, полученных *in vitro* транскрипции (IVT). В то же время RIG-I и MDA5 играют основную роль в распознавании реплицирующейся саРНК и активации защитных механизмов, стимулируя продукцию IFN-I, а также индуцируя проапоптотический сигналинг.

1.4.2. Компоненты врождённого иммунитета, активируемые в ответ на саРНК

Негативные последствия функционального взаимодействия между саРНК и рецепторами врождённого иммунного ответа включают ингибирование транскрипции и трансляции трансгена, а также индукцию апоптоза. Ингибирование транскрипции трансгена опосредовано главным образом продукцией IFN и активацией ряда IFN-стимулированных генов (ISG). Таким образом, активация рецепторов врождённого иммунного ответа запускает сигнальные пути, опосредованные факторами транскрипции NF-κB и IRF3, что приводит к устойчивой экспрессии генов IFN-I. IFN-I стимулирует экспрессию IFN-стимулированных генов (ISG), таких как протеинкиназа R (PKR), 2′-5′-олигоаденилатсинтаза (OAS), RNase L и IFN-индуцированные белки с тетратрикопептидными повторами (IFIT) [132,133]. ISG могут напрямую препятствовать репликации и экспрессии саРНК.

PKR содержит домен, который напрямую связывает дцРНК, включая вторичные структуры РНК, имитирующие дцРНК [134,135]. После активации дцРНК PKR димеризуется и аутофосфорилируется, а затем фосфорилирует инициаторный фактор eIF2α. Фосфорилирование eIF2α останавливает трансляцию как клеточной мРНК, так и РНК, полученной транскрипцией *in vitro* [136,137].

Было показано, что активация PKR после окислительного стресса повышает чувствительность клеток к апоптозу. Длительная активация PKR индуцирует апоптоз через проапоптотический фактор FADD с последующей активацией каспазы 8. Кроме того, активация PKR приводит к экспрессии белков BAK и BAX и индуцирует апоптоз через митохондриальный механизм и высвобождение цитохрома C [138,139].

Наряду с PKR, PERK (PKR-подобная киназа эндоплазматического ретикулума) может играть значительную роль в негативной регуляции трансляции альфавирусами. В частности, PERK выполняет двойную функцию при инфекции VEEV, играя заметную роль в репликации вируса [140]. С одной стороны, PERK может быть необходим для трансляции неструктурных белков альфавирусов на ранних стадиях инфекции. С другой стороны, на поздних стадиях инактивация PERK вызывает гибель клеток. Тем не менее, следует отметить, что активация PERK может индуцироваться стрессом ЭР, вызванным продукцией белков альфавирусов, включая неправильно свернутые белки [141]. Таким образом, роль PERK в индуцируемом саРНК апоптозе ещё предстоит выяснить.

Семейство генов OAS (2′-5′-олигоаденилатсинтазы) представляет собой группу генов, повсеместно экспрессируемых у млекопитающих и играющих важную роль в противовирусном ответе. Это семейство включает четыре гена: OAS1, OAS2, OAS3 и OASL. OAS действуют как сенсоры вирусной инфекции, напрямую распознавая дцРНК и запуская синтез 2′-5′-олигоаденилатов (2-5A) [142]. Белки OAS1, OAS2 и OAS3 взаимодействуют с RNase L с разной аффинностью, вызывая активацию РНКазы [143]. Четвёртый ген кодирует полипротеин OASL, который усиливает сигналинг RIG-I без активации RNase L [144].

RNase L – это фермент с латентной активностью, экспрессируемый в большинстве клеток и тканей. Это уникальная эндорибонуклеаза с очень низкой специфичностью к последовательности РНК, регулируемая сложными механизмами [145,146]. RNase L состоит из N-концевого регуляторного домена, содержащего анкириновые повторы, домена, гомологичного протеинкиназам, и C-

концевого рибонуклеазного домена. RNase L является эффектором системы 2-5A. Её регуляторный домен взаимодействует с 2-5A, индуцируя конформационные изменения, которые, согласно современным данным, открывают С-концевой рибонуклеазный домен. Это позволяет RNase L образовывать гомодимеры и приобретать нуклеазную активность [147]. Регуляция сигналинга опосредована 2′-фосфодиэстеразой и 5′-фосфатазой, которые, по-видимому, вызывают транзиторную активацию RNase L только в присутствии высокого содержания дцРНК [148–150]. Активация RNase L экзогенным 2-5A приводит к деградации около 70% клеточной РНК.

Проводились исследования, посвящённые изменениям экспрессии OAS1 и OAS3 в ответ на саРНК на основе генома дикого типа VEEV и саРНК, несущей мутации в последовательности гена nsP3 (Q48P или I113F), а также на линейную некодирующую мРНК. С помощью количественной ПЦР в реальном времени было показано, что обе саРНК (как дикого типа, так и мутантные) значительно повышают экспрессию OAS1 и OAS3 через 24 ч после трансфекции в клетках HeLa [129]. Фракции 28S/18S рибосомальной РНК (рРНК), выделенной из клеток HeLa в различные моменты времени после трансфекции саРНК, анализировали с помощью капиллярного электрофореза [129]. Было показано, что саРНК дикого типа вызывает значительную деградацию рРНК через 24 и 48 часов, чего не наблюдалось в случае мутантной саРНК. Это показало, что деградация рРНК происходит после трансфекции саРНК, и зависит от активации пути OAS-RNase L и от мутаций в неструктурных белках альфавирусов. Также, активность каспаз 3 и 8 оценивали с помощью вестерн-блоттинга, тогда как апоптоз оценивали двойным окрашиванием аннексином V и йодидом пропидия [129]. Гонг и соавторы [129] продемонстрировали, что мутантная саРНК вызывала более низкие уровни апоптоза по сравнению с саРНК дикого типа, что приводило к более высокой экспрессии целевого белка. Таката и соавторы показали, что по крайней мере три ISG, включая ZAP, IFIT1 и IFIT3, значительно влияют на репликацию VEEV, что также актуально для саРНК, полученной из генома этого альфавируса. ZAP распознаёт динуклеотиды CG, присутствующие в РНК альфавирусов [151], тогда

как IFIT1 и IFIT3 связывают 5′-концы вирусной Cap0-РНК, ингибируя трансляцию альфавирусов [132,152]. Таким образом, сильная активация врождённого иммунного ответа против компонентов саРНК, возникающий на поздних стадиях амплификации РНК, негативно влияет на клеточный гомеостаз. Модификация компонентов саРНК может позволить создавать саРНК со сниженной реактогенностью и стабильно высоким уровнем биосинтеза целевого белка [129].

1.5. Стратегии оптимизации препаратов на основе саРНК.

Влияние аминокислотных замен в белках nsP2 и nsP3 на гомеостаз клетки проявляется в снижении токсичности и уменьшении скорости репликации. Полный перечень известных мутаций и их соответствующих эффектов представлена в Таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Известные мутации в неструктурных белках альфавирусов и регуляторных районов, оказывающие значимый эффект на биогенез саРНК в экспериментах *in vitro*.

Геном	Регион	Нуклеотидные/ аминокислотные замены/	Клеточная линия	Эффект	Ссылка
VEEV	5′-НТО	(G3A)	BHK-V; L929	Усиление репликации генома; подавление репликации субгеномной РНК; повышение уровней IFN-I	[153]
VEEV	5′-НТО	(C24U)	BHK-V; L929	Снижение уровней IFN-I	[153]
VEEV	nsP1 и nsP2	nsP1(G357C, G1569A, A1572C, C1575T) + nsP2 (A3821T, G3892C, T3922C)	HEK293T; RAW-Lucia ISG	Ослабление врождённого иммунного ответа; повышение экспрессии целевого белка	[5]

Продолжение Таблицы 1.2

VEEV	nsP2	A533I	BHK-V; L929	Снижение цитотоксичности; повышение уровней IFN-I	[153]
VEEV	nsP2	Q739L, P773S	BHK-21	Возможные изменения геликазной и протеазной активностей; снижение цитотоксических эффектов; уменьшение уровней репликации	[116]
VEEV	nsP2 и nsP3	G1298R (G3936C) + K1423E (A4311G)	Jurkat; Raw-Lucia ISG; B16F10	Повышение уровня репликации; увеличение общей и специфической экспрессии субгеномной РНК; повышение уровней IFN-I	[115]
VEEV	nsP3	Q48P (A4174C)	BHK-21; Huh7.5.1; C2C12; RAW264.7	Снижение репликации саРНК; усиление трансляции субгеномной РНК; усиление врождённого иммунного ответа на саРНК; значительное ингибирование апоптоза; повышение жизнеспособности клеток по сравнению с саРНК дикого типа	[129]
VEEV	nsP3	I113F (A4368T)	BHK-21; Huh7.5.1; C2C12; RAW264.7	Снижение репликации саРНК; повышение экспрессии целевого белка; усиление врождённого иммунного ответа на саРНК; значительное ингибирование апоптоза; повышение жизнеспособности клеток	[129]
VEEV	nsP3	L121P	BHK-21	Снижение цитотоксических эффектов	[116]
VEEV	nsP2 и nsP3	G1298R (G3936C) + S1572G (A4758G)	Jurkat; Raw-Lucia ISG; B16F11	Увеличение длительности биосинтеза репортёрного белка	[115]
VEEV	nsP3	S1572G (A4758G) + E1584D/ V1634 (G4796T/ G4946A)	Jurkat; Raw-Lucia ISG; B16F12	Регуляция трансляции субгеномной (+)РНК; снижение экспрессии субгеномной РНК; снижение уровней IFN-I	[115]

Продолжение Таблицы 1.2

VEEV	nsP3	E1584/ V1634 (G4796T/ G4946A)	Jurkat; Raw-Lucia ISG; B16F13	Снижение уровней IFN-I	[115]
VEEV	nsP3	Последовательности 5628–5666 и 5684–5702	BHK-21; Vero	Нарушение протеолитического расщепления nsP3–nsP4	[154]
VEEV	nsP3	Последовательность 5628-5666	BHK-21; Vero	Нарушение сигналинга деградации и клеточной локализации nsP3	[154]
VEEV	nsP4	C482Y и K290R	BHK21	Повышение точности RdRp; возможное использование аналогов уридина; влияние на инициацию репликации	[155]
CHIKV	nsP1	A533V	Vero; L929	Снижение цитотоксичности; повышение уровней IFN-I	[156]
CHIKV	nsP2	A674R T675L L676E A730V	BHK-21; NIH 3T3	Ослабление цитопатических эффектов за счёт изменений в структуре V-петли C-конца белка nsP2, что ингибирует транскрипцию	[111]
CHIKV	nsP2	P718G + GEEGS вставка между 647 и 648 а.к.	BHK-21	Снижение цитопатических эффектов; нарушение геликазной и ГТФазной активностей	[157]
CHIKV	nsP2	(P718G + GEEGS вставка между 647 и 648 а.к.) + F391L + I175L	Huh7	Снижение цитопатических эффектов; нарушение геликазной и ГТФазной активностей; длительная персистенция в клетке	[157]

Продолжение Таблицы 1.2

SINV	nsP2	P726L и P726G	BHK-21; NIH 3T3	Снижение цитопатических эффектов и эффективности репликации саРНК; отсутствие ядерной локализации nsP2	[116,158,159]
SINV	nsP2	H619Q и H643Q. P683Q	BHK-21	Снижение цитопатических эффектов; отсутствие ядерной локализации nsP2	[160]

1.5.1. Аминокислотные замены в неструктурных белках артритогенных альфавирусов, используемых для платформы саРНК

Используя саРНК на основе VEEV, Фролов с соавт. показали, что индукция ЦТЭ значительно подавляется мутациями в гене, кодирующем неструктурный белок SINV nsP2 с аминокислотынми заменами P726G и P726L, которые были встроены в репликон РНК VEEV под контролем субгеномного промотора вместо структурных белков VEEV [116,159]. В клетках BHK-21 эти мутации не влияли на транскрипцию и трансляцию, но умеренно снижали скорость репликации [116,159]. Аминокислотные замены P726G и P726L влияли на локализацию nsP2 в клеточных компартментах, значительно снижая уровни nsP2 в ядерной фракции, что может указывать на его ядерную функцию. Фролов с соавт. показали, что наряду с подавлением ЦТЭ, индуцируемого nsP2 SINV с аминокислотными заменами P726G и P726L, цитотоксический эффект также был снижен при наличии аминокислотных замен H619Q, H643Q и P683Q в nsP2 SINV [160]. Аминокислотная замена P683Q в белке nsP2 саРНК, вероятно, снижала взаимодействие с доменом RPB1 из-за уменьшенной ядерной локализации [160], что могло смягчать негативное влияние на транскрипцию. Аминокислотная замена

P683Q также влияла на функцию геликазного домена, предотвращая деградацию комплекса RPB1. Однако это минимально сказывалось на гибели клеток [160].

Описанные аминокислотные замены в последовательности неструктурных белков, используемые для создания платформ саРНК на основе генома CHIKV значительно снижали их ЦТЭ. Утт с соавторами исследовали влияние аминокислотных замен P718G, E116K и вставку пяти аминокислот GEEGS между остатками 647 и 648 в белке nsP2 [157]. Как и в случае белка nsP2 SINV, nsP2 CHIKV, кодируемый его репликоном, выполняет критические функции в репликации саРНК и индукции ЦТЭ. Наряду со вставкой GEEGS между остатками 647 и 648, мутация P718G приводила к снижению ЦТЭ в клетках BHK-21 и в большей степени в Huh-7, вероятно, нарушая геликазную и ГТФазную активности nsP2 – функции, связанные с ЦТЭ [157]. Кроме того, адаптивные аминокислотные замены F391L в белке nsP1 и I175L в белке nsP3, возникшие в ходе эксперимента, обеспечивали длительную персистенцию саРНК в клеточной линии человека Huh7 [157]. Эти замены, вероятно, затрагивали области, способствующие рекрутированию клеточных факторов [107], что приводило к стабильной репликации саРНК в клеточных линиях. Используя модель саРНК на основе CHIKV, Фролов с соавт. идентифицировали варианты саРНК, несущие мутации в последовательности кодирующей nsP2. Эти мутации влияли на вторичную структуру V-петли на С-конце, предотвращали ингибирование транскрипции и снижали ЦТЭ без какого-либо влияния на скорость репликации. Аминокислотные замены A674R, T675L, L676E и A730V, возможно, приводили к потере функциональной активности геликазного домена nsP2, нарушали связывание ДНК nsP2 и предотвращали ингибирование индукции IFN-I. Это, вероятно, способствует стимуляции врождённого иммунного ответа и, следовательно, презентации антигена, а также индукции адаптивного иммунного ответа [111]. Идентифицированные аминокислотные замены в неструктурных белках артритогенных альфавирусов не только снижают цитотоксический эффект, но и демонстрируют тонкое регуляторное взаимодействие между эффективностью репликации саРНК и модуляцией иммунного ответа. Это открывает перспективы

для разработки новых вакцин и решений для генной терапии на основе платформы саРНК.

Таким образом, для артритогенных альфавирусов основной мишенью для снижения ЦТЭ является белок nsP2. Аминокислотные замены в его геликазном или протеазном доменах эффективно предотвращают выключение клеточной транскрипции и подавляют апоптоз, что имеет решающее значение для безопасности лекарственных средств на основе саРНК.

1.5.2. Аминокислотные замены в неструктурных белках энцефалитогенных альфавирусов, используемых для разработки платформы саРНК.

Структурные белки энцефалитогенных альфавирусов играют доминирующую роль в развитии ЦТЭ. Однако неструктурные белки их репликативого аппарата, используемые для создания платформы саРНК, также вносят вклад в этот процесс. Петракова с соавторами продемонстрировали, что трансфекция клеток ВНК-21 саРНК, несущей мутации, приводящие к аминокислотным заменам Q739L и P773S в белке nsP2, не индуцировала ЦТЭ и не ингибировала рост клеток, в отличие от контрольной саРНК без мутаций [116]. Считается, что С-концевой домен nsP2 играет критическую роль в его взаимодействиях с белками хозяина во время вирусной репликации, поскольку локализация этого домена непосредственно прилегает к nsP3. Примечательно, что большинство мутаций локализованы в С-концевом домене nsP2, что может указывать на его роль в цитотоксических эффектах. Кроме того, аминокислотная замена L121P в белке nsP3 снижает цитотоксичность репликона РНК 5′ VEErep/Pac в клетках Huh-7 [116]. Согласно другому исследованию, аминокислотные замены в С-концевых областях nsP1 (G357C, G1569A, A1572C, C1575T) и nsP2 (A3821T, G3892C, T3922C) также приводили к снижению цитотоксических эффектов [5]. Кроме того, точечная мутация G3A в 5′-НТО аттенуированного штамма TS-83

репликона РНК VEEV снижала гибель клеток BHK-21 [5]. Эта мутация была связана со снижением восприимчивости репликационного аппарата саРНК к интерфероновому ответу. Было высказано предположение, что мутация G3A, а также мутации A30C и C24U влияют на образование шпилек в 5′-НТО, что приводит к одновременным изменениям сходных структур в 3′-НТО антисмысловой РНК. Вместе они вызывают изменение соотношения геномной/субгеномной РНК и повышают регуляцию IFN-α/β *in vitro*, увеличивая процент CD4+ клеток *in vivo* по сравнению с саРНК на основе VEEV без мутаций [153]. Совокупные данные о влиянии мутаций и SIE указывают на возможное функциональное взаимодействие между белками nsP2 и nsP3 репликона РНК VEEV, которое может играть критическую роль в его способности индуцировать ЦТЭ. Подавляющее большинство мутаций и аминокислотных земен, перечисленных в Таблице 1.2, которые снижают цитотоксические эффекты, локализованы в последовательности nsP3. Это связано с регуляторной ролью nsP3 в репликации саРНК. nsP3 облегчает репликацию саРНК, взаимодействуя с клеточными белками CD2AP, SH3KBP1 и FXR, содержащими SH3-домены, через свой гипервариабельный домен (HVD). Возможно, что мутации в области, кодирующей nsP3, незначительно подавляют репликацию саРНК, одновременно снижая чрезмерную активацию врождённого иммунного ответа.

В отличие от артритогенных альфавирусов, большинство попыток оптимизации для энцефалитогенных вирусов, таких как VEEV, были сосредоточены главным образом на белке nsP3. Модификация его гипервариабельного домена позволяет регулировать эффективность репликации, избегая чрезмерной активации иммунного ответа. Кроме того, аминокислотные замены могут помочь преодолеть ограничения репликации, налагаемые механизмом SIE. Различия в функциях неструктурных белков саРНК у артритогенных и энцефалитогенных альфавирусов подчёркивают неоднородность подходов, используемых для повышения функциональной эффективности саРНК. Расширение знаний о биологии альфавирусов может способствовать оптимизации саРНК.

1.5.3. Другие модификации, используемые при разработке платформы саРНК.

Потенциальным направлением для расширения области применения саРНК может стать выбор альтернативных альфавирусов. Известно, что альфавирусы обладают различным тропизмом к специфическим тканям: VEEV эффективно проникает в нейроны и лимфоидные ткани, SINV нацелен на мышечные и эпителиальные клетки, тогда как CHIKV инфицирует фибробласты и ткани суставов [161–163]. Недавно было показано с использованием саРНК, что тропизм альфавирусов к тканям также коррелирует с репликативной активностью и трансляцией трансгена саРНК на основе последовательностей родственных вирусов [164]. Так, саРНК на основе генома вируса Эверглейдс (EVEV), родственного VEEV, экспрессировалась преимущественно в селезёнке, достигая уровней экспрессии, сравнимых с таковыми у VEEV [164]. Другие варианты саРНК на основе геномов вируса Моссо-дас-Педрас (MDPV) и вируса Рио-Негро (RNV) экспрессировались в лимфатических узлах и селезёнке соответственно [164]. Эти данные отражают гибкость платформы саРНК, поскольку таргетная экспрессия в специфических тканях может снизить риск реактогенности.

Аналоги уридина обычно используются при производстве мРНК-терапевтических препаратов, что обеспечивает снижение активации врождённого иммунного ответа и повышение экспрессии целевых белков [165]. Как показала практика, использование псевдоуридина и m1Ψ нецелесообразно при использовании саРНК на основе геномных последовательностей альфавирусов дикого типа из-за их влияния на вторичную структуру РНК и, следовательно, на репликацию саРНК [166,167]. Однако использование 5-метилцитидина (5meC) при синтезе саРНК может служить альтернативой псевдоуридину и m1Ψ в ходе разработки платформы саРНК. 5meC существенно не влияет на репликацию саРНК и снижает вероятность распознавания ПРР, тем самым уменьшая продукцию IFN-α/β [166]. Азизи с соавторами продемонстрировали, что саРНК на основе VEEV,

модифицированная 5meC, обеспечивает более высокий уровень репортерного белка, что было показано с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии в клетках HEK-293T [166]. Кроме того, включение 5meC в саРНК снижает секрецию IP-10 и IFNa2 в PBMC [168], а в других исследованиях повышает иммуногенные характеристики саРНК [168–170].

Другой подход включает модификации RdRp (белка nsP4), направленные на повышение точности и специфичности каталитического центра. Это может позволить эффективно использовать аналоги нуклеозидов, такие как m1Ψ. Кинтана с соавт. показали, что модификация каталитического центра nsP4 VEEV (GDD464-466ASR) облегчала репликацию саРНК, содержащей m1Ψ. Однако количество репортёрного белка не превышал уровень наблюдаемый при доставки саРНК, модифицированной 5meC, и контрольного образца саРНК с немодифицированными нуклеозидтрифосфатами [155]. Изучается также комбинированное использование иммуносупрессивных препаратов для повышения эффективности трансфекции РНК, полученной транскрипцией *in vitro* (IVT), в исследованиях по регенеративной медицине [171]. Повышенный уровень биосинтеза трансгена, кодируемого мРНК, был достигнут с использованием стероидного противовоспалительного препарата дексаметазона, что, по-видимому, связано с ингибированием пути NF-κB [172].

Применение белков-ингибиторов активации систем врожденного иммунного ответа (innate inhibiting proteins, IIP) для селективного ингибирования путей врождённого иммунитета является ещё одной стратегией снижения избыточной иммуногенности саРНК [173]. Некоторые вирусы выработали механизмы уклонения от активации системы IFN-I клеткой-хозяином, что даёт им репликативное преимущество. Одним из перспективных подходов является использование вирусных белков в качестве антагонистов системы IFN-I для ослабления врождённого иммунного ответа на саРНК. Было показано, что комбинация вирусных белков коровьей оспы E3, K3 и B18R (комплекс EKB) с неструктурным белком вируса гриппа NS1 повышает эффективность трансляции IVT РНК как *in vitro*, так и *in vivo* [174,175]. Эти белки используют различные

механизмы для повышения уровня биосинтеза репортерного белка (люциферазы) и ингибирования мРНК-зависимого апоптоза. E3 и K3 ингибируют активацию PKR, тогда как B18R нарушает сигналинг IFN-I, предотвращая взаимодействие между внеклеточным IFN и рецептором IFN-α/β (IFNAR) на поверхности клетки [176]. Белок NS1 выполняет множество иммуносупрессивных функций, ингибируя ключевые ISG, такие как PKR, OAS, IRF3 и NF-κB, а также взаимодействуя с ядерным фактором CPSF30, что, в свою очередь, нарушает процессинг пре-мРНК в ядре и приводит к глобальному ингибированию трансляции клеточных белков [177,178].

Блэкни с соавт. изучали влияние IIP на биосинтез целевого белка, кодируемого саРНК, используя 10 вирусных белков, подавляющих врождённый иммунный ответ: белок NS1 вируса гриппа A, белок US2 вируса простого герпеса 2-го типа (HSV-2), белки US1 и US2 вируса простого герпеса 1-го типа (HSV-1), белок OV20 вируса оспы птиц (ORF), белок Npro вируса диареи крупного рогатого скота, V-белок парагриппа 5-го типа, M-белок и белок p4a MERS-CoV, белок NS5 флавивируса Лангат [7]. Они сконструировали 10 конструкций, кодирующих саРНК на основе VEEV, регулируемую субгеномным промотором, которая продуцировала один из вышеупомянутых белков, отделённых от репортерного гена FLuc сайтом расщепления протеазой T2A. Измеряли интенсивность люминесценции FLuc в клетках HEK293T.17, HeLa и MRC5 после доставки саРНК с использованием полимерной системы pABOL, которая практически не стимулирует врождённый иммунный ответ [179]. Было показано, что белки V и p4a повышают экспрессию трансгена в 100–500 раз *in vitro* в чувствительных к IFN клеточных линиях HeLa и MRC5. Оба белка предотвращали активацию IRF3 и NF-κB по сравнению с саРНК дикого типа (без IIP), что приводило к снижению продукции IFN-I и ISG, смягчая тем самым чрезмерный ответ на высокую дозу саРНК [7].

Войцеховски с соавт. продемонстрировали, что лидерный пептид кардиовируса, кодируемый мРНК (называемый RNAx), ослаблял чрезмерную активацию ПРР и способствовал наработке целевого белка [180]. RNAx

предотвращал ингибирование трансляции, опосредованное PKR, влияя на ядерно-цитоплазматический транспорт. Используя модель мышей C57BL/6, исследователи показали, что комбинированное введение 2 мкг саРНК, кодирующей NanoLuc, и мРНК-RNAx приводило к статистически значимому 170-кратному повышению уровня NanoLuc по сравнению с группой, получавшей только саРНК. Ещё одним перспективным инструментом для уклонения от врождённого иммунного ответа является лидерный белок вируса энцефаломиелита мышей Телера (TMEV L), также относящийся к роду кардиовирусов [180,181]. Иммунизация мышей C57BL/6 вакциной на основе саРНК, полученной из VEEV и кодирующей TMEV L, снижала продукцию цитокинов IFN-α, IL-6, KC, MCP-1 и TNF-α как при первичном введении, так и при бустерной иммунизации. При этом она не влияла на клеточный ответ Th1/Th2 и повышала уровни нейтрализующих антител [180].

Одним из альтернативных подходов для снижения активности PKR при введении саРНК на основе SINV является экспрессия PKR с аминокислотной заменой (K296R) под контролем SG-промотора. Слияние саРНК с цис-кодируемой мутантной PKR резко повышало экспрессию GFP в клетках HEK293T, HeLa и A549 по сравнению с несвязанной саРНК [158]. Введение дополнительных аминокислотных замен в белок nsP2 в конструкции, кодирующей саРНК, способствовало в 3–4 раза более высокому уровню eGFP.

В заключение подчеркнём, что достижение оптимальной иммуногенности требует соблюдения баланса между врождённым иммунным ответом и уровнем целевого антигена. Хотя альфавирусные репликоны обладают адъювантными свойствами, они могут ингибировать как Т-клеточный [76,182], так и В-клеточный [7,76,183,184] иммунный ответ из-за чрезмерной активации сигналинга IFN-I. Эти иммунологические аспекты следует учитывать при разработке терапевтических и профилактических препаратов на основе саРНК. Поскольку описанные здесь пути активации врождённого иммунитета создают значительные барьеры для эффективного уровня биосинтеза целевых белков, стратегии оптимизации, могут быть применены для снижения негативного влияния их активации.

1.6. Заключение по литературному обзору.

В целом, представленные данные отражают потенциал дальнейшей оптимизации платформы саРНК для разработки новых терапевтических и профилактических препаратов. Возможность введения мутаций в последовательности, кодирующие белки nsP2 и nsP3, и нацеленной экспрессии генов в специфических тканях путём выбора подходящих геномов альфавирусов, а также ингибирование активации ПРР с помощью аналогов нуклеотидов позволят снизить ЦТЭ и повысить эффективность продукции целевого белка. Однако следует отметить, что одного лишь снижения цитопатического эффекта недостаточно для тонкой настройки последовательности саРНК. Для оптимизации последовательности необходимо тщательное изучение взаимодействия между саРНК и компонентами иммунной системы. Уменьшение доли дцРНК в сочетании с модуляцией взаимодействия nsP с клеточными факторами может снизить вероятность нежелательного воспаления. Это снижение имеет решающее значение для успеха терапии на основе саРНК.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и приборы

2.1.1. Питательные среды и растворы

LB: 1 % бакто-триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 1% NaCl.

LB-агар: 1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 1,5% бакто-агар.

SOC: 2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10мМ NaCl, 2,5мМ KCl, 20 мМ глюкоза, pH 7,0.

1x TAE: 40 мМ Tris-HCl, 40 мМ уксусная кислота, 2 мМ ЭДТА, pH 8.0.

PBS: 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4, 1,8 мМ KH_2PO_4, pH 7,4. (ПанЭко, Россия)

DMEM: 109,5 мМ NaCl, 5,37 мМ KCl, 1,8 мМ $CaCl_2$, 0,81 мМ $MgSO_4$, 0,8 мМ NaH_2PO_4, 44,05 мМ $NaHCO_3$, 25 мМ Д-глюкозы, 1 мМ пирувата натрия, 0,00025 мМ $Fe(NO_3)_3$, 4 мМ глутамина, 0,8 мМ валина, 0,8 мМ изолейцина, 0,8 мМ лейцина, 0,8 мМ лизина, 0,8 мМ треонина, 0,4 мМ аргинина, 0,4 мМ серина, 0,4 мМ тирозина, 0,4 мМ фенилаланина, 0,4 мМ глицина, 0,22 мМ гистидина, 0,2 мМ метионина, 0,2 мМ цистина, 0,08 мМ триптофана, 0,039 мМ инозитола, 0,033 мМ никотинамида, 0,029 мМ холина хлорида, 0,02 мМ пиридоксаля, 0,017 мМ пантотената, 0,012 мМ тиамина, 0,009 мМ фолиевой кислоты, 0,0011 мМ рибофлавина, pH 7,0-7,4. (ПанЭко, Россия)

Раствор Версена: 0,02% ЭДТА (динатриевая соль), 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,02% KH_2PO_4, 0,11% Na_2HPO_4, pH 7,2–7,4 (без Ca^{2+} и Mg^{2+}). (ПанЭко, Россия)

2.1.2. Бактериальные штаммы и плазмиды

В работе был использован штамм *E.coli* NEB® Stable (F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10 (TetR)/ Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrB) (New England Biolabs, США). В приложении А приведены генетические последовательности, используемые в исследовании.

Векторы для сборки целевых конструкций представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 - Используемые векторы

Название вектора	Гены	Размер, п.н.	Описание
T7-VEE-GFP (Addgene: #58977)	*nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, EGFP, AmpR*	11522	Содержит гены неструктурных белков VEEV и репортерный ген EGFP.
VEEV_NS1_T2A_eGFP	*nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, NS1, EGFP, AmpR*	11055	Содержит гены неструктурных белков VEEV и репортерный ген EGFP и неструктурный белок вируса гриппа А.
VEEV_ORF4a_T2A_eGFP	*nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, ORF4a, EGFP, AmpR*	10692	Содержит гены неструктурных белков VEEV и репортерный ген EGFP и ген белка p4a вируса ближневосточного респираторного синдрома.
VEE_synth_1_eGFP	*nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, EGFP, AmpR*	10363	Содержит гены неструктурных белков VEEV, последовательность 5'-НТО располагающаяся после субгеномного промотора и репортерный ген EGFP.

H1N1_VEE	*nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, HA, AmpR*	11271	Содержит гены неструктурных белков VEEV и ген гемагглютинина вируса гриппа H1N1 (A/Wisconsin/588/2019).
pS_AG_TPL_EGFP_Mod	*EGFP, AmpR*	3105	Содержит репортерный ген EGFP.
T7_VEE_LucF	*Fluc, AmpR*	11222	Содержит гены неструктурных белков VEEV и репортерный ген люциферазы светлячка.

2.1.3. Реактивы

Для выделения плазмидной ДНК использовали наборы Plasmid Miniprep или Plasmid Midiprep 3.0 (Евроген, Россия). Для выделения фрагментов ДНК использовался набор Cleanup Standard (Евроген, Россия). Для выделения РНК использовали реагент «Лира» (Биолабмикс, Россия). Для очистки РНК использовались магнитные частицы (Vazyme, Китай). Для выделения фрагментов ДНК из геля использовался набор N-Gel-50-micro (Биолабмикс, Россия). Для осуществления транскрипции РНК *in vitro* использовались наборы mRNA-20 или High-mRNA-20 (Биолабмикс, Россия). Для синтеза кДНК использовался набор БиоМастер RNAscribe RT Plus (Биолабмикс, Россия). Для проведения количественной ПЦР в реальном времени использовался набор БиоМастер HS-qPCR (Биолабмикс, Россия).

2.1.4. Оборудование

Для оценки концентрации ДНК и бактериальных клеток измеряли оптическую плотность с помощью спектрофотометра NanoDrop One (Thermo Scientific, США). Получение фрагментов ДНК проводили методом ПЦР с использованием термоциклера Thermal Cycler T100 (BioRad, США). Биолюминесценцию в *in vitro* экспериментах с использованием эукариотических клеточных линий измеряли на мультипланшетном ридере CLARIOstar® (BMG LABTECH, Германия), флуоресценцию на проточном цитофлуориметре BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, США). В работе использовали центрифуги Eppendorf 5418R, 5910R (Eppendorf Geratebau, Германия), термостат Thermo-Shaker TS-100C (Biosan, Латвия), воздушные термостатированные шейкеры Innova 44 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, США), CO_2-инкубаторы Binder C150 (Binder GmbH, 41 Германия), комплекты оборудования для электрофореза Gel Electrophoresis Cell Model 150 (BioRad, США), источники постоянного тока BioRad PowerPac Basic (Bio-Rad, США), микроскоп AxioVert A1(Carl Zeiss, Германия). Для формуляции липидных наночастиц использовался прибор Automated Nanoparticle (ANP) System (Dolomite Microfluidics, Великобритания). Для проведения капиллярного электрофореза использовался прибор MCE-202 MultiNA (Shimadzu, Япония). Для проведения количественной ПЦР в реальном времени использовался прибор QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США).

2.1.5. Получение липидных наночастиц, содержащих мРНК и саРНК

Инкапсуляцию мРНК и саРНК в липидные наночастицы проводили с использованием автоматизированной системы для генерации липосом (микрофлюидный чип, Dolomite Microfluidics, Великобритания). Методика

приготовления ЛНЧ была аналогична описанной для других мРНК-платформ. Водную фазу составлял 10 мМ цитратный буфер (pH 3,0; RusChem, Россия), органическую фазу – абсолютный этанол (Hayman, Индия). Концентрация РНК в цитратном буфере составляла 200 нг/мкл, общая концентрация липидов в этаноле – 5,8 мкг/мкл. Липидный состав включал холестерин (Merck, США), ионизируемые катионные липиды SM-102 (Sinopeg, Китай) и ALC-0315 (Sinopeg, Китай) в эквимолярном соотношении, вспомогательный липид DSPC (Avanti, США) и пегилированный липид DMG-PEG2000 (Avanti, США). Оптимальное молярное соотношение компонентов составило холестерин : SM-102 : ALC-0315 : DSPC : DMG-PEG2000 = 42,70 : 23,15 : 23,15 : 9,40 : 1,60. Объёмное соотношение водной и липидной фаз составляло 3:1, общая скорость потока – 1,5 мл/мин.

После формирования частиц суспензии очищали диализом с использованием мембран Float-A-Lyzer G2 с молекулярно-массовым отсечением 10 кДа (целлюлозоэфирная мембрана, Repligen, США) в соответствии с протоколом производителя. Диализ проводили в течение 12 ч в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4) при +4 °C с интенсивным перемешиванием; буфер заменяли однократно. Криоконсервацию выполняли путём инкубации в 20%-ном растворе сахарозы в PBS в течение 2 ч при +4 °C с последующим замораживанием необходимого количества аликвот при –80 °C для анализа и функционального тестирования. Все процедуры с полученными ЛНЧ-мРНК и ЛНЧ-саРНК проводили после разморозки.

2.2. Методы генетической инженерии

2.2.1. Схема генетических конструкций

Внесения мутаций в область неструктурного белка nsP2 приводящих к аминокислотным заменам G763R и S773P осуществляли с помощью сайт-

направленного мутагенеза с помощью ПЦР. Для их получения были заказаны праймеры представленные в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Праймеры для внесения мутаций в последовательность гена nsP2.

Название	Последовательность 5’-3’
mut3892-f	TCTGTTTGTATTCATTCGGTACGATCGCAAG
mut3922-f	GGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTT
mut3892-r	CGGGCCTTGCGATCGTACCGAATGAATACAA
mut3922-r	AGGTTGATGAAAGCTTGTAAGGATTGTGCGTAC

Была сконструирована плазмидная ДНК кодирующая саРНК с мутацией, приводящей к аминокислотной замене S773P в nsP2, а также гены кодирующие белки NS1 или p4a соединенные вместе с EGFP через последовательность T2A. Ген, кодирующий белок NS1, был получен из плазмидного вектора pNIC28-Bsa4, любезно предоставленного Дмитриевым Сергеем Евгеньевичем, последовательность гена ORF4a – методом ПЦР на основе перекрывающихся олигонуклеотидов. Также была сконструирована плазмидная ДНК, содержащая последовательность 5’НТО «synt1» добавленная после сайта последовательности субгеномного промотора саРНК.

2.2.2. Полимеразная цепная реакция

Получение фрагментов нуклеотидных ДНК последовательностей, используемых в данной работе, осуществляли методом ПЦР. Метод ПЦР использовался для сборки гена *ORF4a de novo*.

Амплификация генов была проведена с помощью ПЦР в объеме 50 мкл. Фрагменты ДНК были амплифицированы с помощью фьюжн ДНК-полимеразы

(Pfu-Sso7d) (Биолабмикс, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя фермента, представленными в Таблицах 2.3 и 2.4.

Таблица 2.3 – Состав раствора ПЦР

Компонент	Количество
5х реакционный буфер для Фьюжн ДНК-полимеразы	10 мкл
Прямой и обратный праймеры, 10 мкМ	До 0,4 мкМ (для сборки *ORF4a* добавляли 7 прямых и 7 обратных праймеров до общей концентрации 1,4 мкМ)
Образец ДНК	1 нг (для *ORF4a* – 0 нг)
Смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP), 10 мкМ	До 0,2 мкМ
Фьюжн ДНК-полимераза, 2 е.а./мкл	0.25 мкл
Деионизированная вода	До 50 мкл

Таблица 2.4 – Протокол реакции амплификации

Стадия	Температура и время	Количество циклов
Предварительная денатурация	98°C, 40 сек	1 цикл
Денатурация	98°C,10 сек	25 циклов
Отжиг праймеров	60 - 70°C, 20 сек	
Элонгация	72°C, 50 сек/1 кб	
Финальная элонгация	72°C, 5 мин	1 цикл

Праймеры для создания генетических конструкций VEEV_NS1_T2A_eGFP, VEEV_ORF4a_T2A_eGFP, VEE_synth_1_eGFP, H1N1_VEE представлены в Таблице 2.5

Таблица 2.5 – Список праймеров для амплификации целевых генов

Название	Последовательность 5’-3’
VEE_f_NDE_ext	AAGTCTAGCATATGGGCGCGC
eGFP_over_for	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
eGFP_over_rev	AGCTTGCCAATTCTAGACTACTTGTACA
ORF4_for_S	TCTAGCATATGGGCGCGCCCTCAG
ORF4_rev_S	AGACTTCCTCTGCCCTCTCCCGATC
ORF4a_for_1	TCTAGCATATGGGCGCGCCCTCAGCATCGATTCAATTCGCCACCATGGATTACGTGTCTCT
ORF4a_for_2	GCTTAATCAAATTTGGCAGAAGTACCTTAACTCACCGTATACTACT
ORF4a_for_3	TGTTTGTACATCCCTAAACCCACAGCTAAGTATACACCTTTAGTTGGC
ORF4a_for_4	ACTTCATTGCACCCTGTGCTGTGGAACTGTCAGCTATCCTTTGCTGGTTA
ORF4a_for_5	TACTGAATCTGCTGTTAATTCTACAAAAGCTTTGGCCAAACAGGACGCAG
ORF4a_for_6	CTCAGCGAATCGCTTGGTTGCTACATAAGGATGGAGGAATCCCTGATG
ORF4a_for_7	GATGTTCCCTCTACCTCCGGCACTCAAGTTTATTCGCGCAAAGCGAGGAAG
ORF4a_rev_1	ACTTCTGCCAAATTTGATTAAGCAGAGACACGTAATCCAT
ORF4a_rev_2	GTGGGTTTAGGGATGTACAAACAAGTAGTATACGGTGAGTTAAGGT
ORF4a_rev_3	TCCACAGCACAGGGTGCAATGAAGTGCCAACTAAAGGTGTATACTTAGCT
ORF4a_rev_4	TAGAATTAACAGCAGATTCAGTATAACCAGCAAAGGATAGCTGACAGT
ORF4a_rev_5	GCAACCAAGCGATTCGCTGAGCTGCGTCCTGTTTGGCCAAAGCTTTTG
ORF4a_rev_6	TGAGTGCCGGAGGTAGAGGGAACATCCATCAGGGATTCCTCCATCCTTATGTA
ORF4a_rev_7	AGACTTCCTCTGCCCTCTCCCGATCCGTTGGAGAATGGCTCCTCTTCCTCGCTTTGCGCGAATAAACT

Продолжение Таблицы 2.5

Название	Последовательность 5’-3’
r-SphI-SAM	TAAGGCGGCATGCCAA
T2A_over_for	CGAGACGAGTTGAGTCAGAAGTTGGATCGGGAGAGGGCAGAGG
T2A_over_rev	CTCCTCGCCCTTGCTCACCA
XbaI+SphI_1_rev	TGTAAGCAGCTTGCCAATTCTAGACTACTTGTACA
XbaI+SphI_2_rev	GCGGCATGCCAATCGCCGCGAGTTCTATGTAAGCAGCTTGCCAATT
Synt_1_for_NDE	TAGCATATGGGCGCGATCGGATATCCGCTAACGTA
Synt_1_rev_GFP	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATTCTGCCTACTAGATCAGACC
NS1_over_for	TCTAGCATATGGGCGCGCCCTCAGCATCGATTCAATTCGCCACCATGAATTCCAACACAATAACCTCG
NS1_over_rev	AACTTCTGACTCAACTCGTCTCGC

2.2.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Амплифицированные фрагменты ДНК анализировали в 1%-ном агарозном геле с использованием источника питания Bio-Rad при напряжении 120 В. Агарозу растворяли в 1× ТАЕ, перед полимеризацией геля в раствор добавляли бромистый этидий до конечной концентрации 1,5 мкг/мл. К образцам перед нанесением на гель добавляли 4× буфер для нанесения ДНК на гель «БиК» (Биолабмикс, Россия). В качестве электролитического буфера использовали 1× ТАЕ. Длину ДНК в геле оценивали с помощью источника ультрафиолетового излучения при длине волны 356 нм.

2.2.4. Очистка фрагментов ДНК и выделение плазмидной ДНК

Разделение фрагментов ДНК выполняли методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле. После окрашивания бромистым этидием гель просматривали в УФ-свете при длине волны 356 нм, идентифицировали полосы, соответствующие целевым фрагментам, затем скальпелем вырезали из геля. Выделение ДНК из агарозного геля проводили с использованием набора N-Gel-50-micro (Биолабмикс, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя: гель растворяли в буфере связывания, ДНК сорбировали на колонке, отмывали этанолсодержащим раствором и элюировали небольшим объёмом буфера. Для очистки ДНК из реакционных смесей (после ПЦР, рестрикции или лигирования) для удаления ферментов, праймеров и солей использовали набор Cleanup Standard (Евроген, Россия), а также переосаждение изопропанолом.

Плазмидную ДНК выделяли из ночной культуры *E. coli*, выращенной в среде LB с соответствующим антибиотиком. Для получения малых количеств плазмиды (до 20 мкг) использовали набор Plasmid-250-mini (Биолабмикс, Россия), для препаративных количеств (100–300 мкг) – Plasmid-20 maxi (Биолабмикс, Россия). Выделение проводили методом щелочного лизиса с последующей очисткой на колонках по протоколу изготовителя. Концентрацию полученной ДНК определяли спектрофотометрически, качество оценивали электрофорезом в 1% агарозном геле.

2.2.5. Сборка генетических конструкции методом рестрикции-лигирования

Рестрикцию ампликонов NS1_T2A_eGFP, ORF4a_T2A_eGFP, synt1_eGFP, HA и вектора T7_VEEV(nsP2/S773P)_eGFP проводили с помощью эндонуклеаз рестрикции FauND1 и Sph1 в соответствующем буфере согласно рекомендациям производителя в течение 2 часов при 37 °C. По окончании инкубации продукты

рестрикции разделяли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле при 90 В в течение 90 минут. После электрофореза целевые фрагменты ДНК вырезали из геля и очищали с использованием набора N-Gel-50-micro (Биолабмикс, Россия). Концентрацию полученных фрагментов измеряли на спектрофотометре Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США). Лигирование проводили при молярном соотношении вектор : вставка 1:3 с использованием Т4-ДНК-лигазы (NEB, США) в течение ночи при +4 °С.

2.2.6. Трансформация клеток *E. coli* методом электропорации и ПЦР-скрининг колоний

К аликвоте электрокомпетентных клеток *E. coli* штамма NebStable (NEB, США) добавляли полный объём лигазной смеси, после чего суспензию инкубировали на льду в течение 30 минут. Смесь переносили в охлаждённую электропорационную кювету с зазором 1 мм и проводили электропорацию на приборе MicroPulser (Bio-Rad, США) с использованием программы для бактерий (напряжение 1,8 кВ). После импульса немедленно добавляли 1 мл предварительно охлаждённой среды SOC, клетки ресуспендировали и инкубировали при 37 °С в течение 1 часа для восстановления. Затем клеточную суспензию высевали на чашки с твердой средой LB, содержащей соответствующие антибиотики для селекции, и культивировали при 30 °С в течение ночи.

Выросшие колонии отбирали, ресуспендировали в 20 мкл среды LB и одновременно инокулировали в 25 мкл готовой смеси для ПЦР, содержащей специфические для вставки праймеры и 5× ScreenMix (Евроген, Россия). Условия и режим ПЦР выбирали согласно протоколу производителя (Таблицы 2.6 и 2.7). Размер ПЦР-продуктов определяли электрофоретически в 1%-ном агарозном геле с использованием ДНК-маркера молекулярного веса SkyHigh (Биолабмикс, Россия).

2.2.7. Выделение и валидация плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК выделяли из 3 мл ночной культуры *E. coli*, выращенной на LB-среде с антибиотиком при 220 об/мин и 37 °C. Для этого применяли набор Plasmid-250-Mini (Биолабмикс), работая в строгом соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию препаратов определяли спектрофотометрически (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific).

Корректность собранных конструкций подтверждали рестрикционным анализом. Успешно прошедшие проверку образцы секвенировали в ресурсном центре генетической инженерии АНО ВО «Университет Сириус». Верифицированные штаммы *E. coli* криоконсервировали в присутствии 30% глицерина при –80 °C.

2.2.8. Получение РНК методом транскрипции *in vitro*

Транскрипцию *in vitro* проводили с использованием набора H-mRNA-20 (Биолабмикс, Россия). В качестве матрицы служила линеаризованная очищенная плазмидная ДНК, которую вносили из расчёта 2 мкг на 50 мкл реакционной смеси. Реакционную смесь готовили в стерильных пробирках, последовательно добавляя 5× буфер (до конечной концентрации 1×), 100 мМ растворы АТФ, ЦТФ, ГТФ и UTP до конечной концентрации 7,5 мМ каждого, а также 100 мМ кэп-аналог ARCA (Биолабмикс) в молярном соотношении ARCA:GTP = 4:1. ДНК-зависимую РНК-полимеразу T7 вносили в количестве 10% от конечного объёма реакции (5 мкл на 50 мкл). Реакционную смесь инкубировали при 37 °C в течение 1 ч. По окончании транскрипции для удаления ДНК-матрицы добавляли ДНКазу I (2 е.а. на 1 мкг матрицы) и инкубировали ещё 15 мин при 37 °C.

Очистку из реакционной смеси РНК проводили с помощью магнитных частиц VAHTS RNA Clean Beads (Vazyme, Китай), добавляя их в соотношении 1,8:1 по объёму к реакционной смеси. После связывания (3–5 мин) пробирки помещали на магнитный штатив, удаляли супернатант, дважды промывали осадок 80% этанолом и элюировали РНК стерильной водой. Концентрацию РНК измеряли спектрофотометрически на приборе NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), целостность оценивали электрофоретически. Полученную РНК при необходимости разбавляли до 1000 нг/мкл и хранили при –80 °C.

2.2.9. Выделение РНК из клеток и обратная транскрипция

Тотальную РНК выделяли из клеточных образцов с использованием набора ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Концентрацию выделенной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США). Обратную транскрипцию кДНК осуществляли на матрице выделенной РНК с применением набора БиоМастер RNAscribe RT Plus (5×) (Биолабмикс, Россия) в соответствии с протоколом изготовителя. Состав реакционной смеси и температурные условия реакции представлены в таблицах 2.6 и 2.7.

Таблица 2.6 – Условия для проведения обратной транскрипции

Компонент	Количество
БиоМастер RNAscribe RT Plus (5×)	5 мкл
Образец РНК	1 мкг
Деионизированная вода	до 20 мкл

Таблица 2.7 - Протокол обратной транскрипции

Стадия	Температура и время
Отжиг праймеров	25 °C, 120 с
Элонгация	55 °C, 600 с
Инактивация фермента	95 °C, 60 с

2.2.10. Количественная ПЦР для оценки изменения уровня экспрессии генов

Количественную ПЦР в реальном времени (qPCR) проводили с использованием набора HS-qPCR (2×) (Биолабмикс, Россия) на приборе QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) с программным обеспечением QuantStudio™ Design & Analysis Software 1.3.1. Реакционную смесь готовили в соответствии с рекомендациями производителя (общий объём 25 мкл), добавляя 2× буфер, праймеры до конечной концентрации 0,3 мкМ, зонды до конечной концентрации 0,1 мкМ и образец кДНК. Протокол амплификации включал начальную денатурацию при 95 °C в течение 50 с, затем 40 циклов: 95 °C – 10 с, 60 °C – 60 с (регистрация флуоресценции). Для нормализации уровня экспрессии использовали ген *GAPDH*. Определение относительного уровня экспрессии целевых генов проводили методом 2^(–ΔΔCt). Последовательности праймеров и зондов представлены в таблице 2.8.

Таблица 2.8 - Последовательности праймеров и зондов для проведения количественной ПЦР в реальном времени

Ген	Тип	Последовательность (5′→3′)
GAPDH	Forward	ATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG
	Reverse	CCACCACCCTGTTGCTGTA
	Probe	ACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGG
RIG-I	Forward	GAGCACTTGTGGACGCTTTA

	Reverse	ATACACTTCTGTGCCGGGAG
	Probe	CCTGGCATATTGACTGGACGTGGC
IFIT1	Forward	AAACTTCGGAGAAAGGCATTAGAT
	Reverse	TGAAATGAAATGTGAAAGTGGCTG
	Probe	CCTGAGACTGGCTGCTGACTTTGAGAAC
Антисенс РНК саРНК	Forward	AGGTATGAAACCGTAGGAAC
	Reverse	GCGGACTAGACTATGTCGTAG
	Probe	CCTCTCAGGTAGCTGAATGATTTAACACTGC
Субгеномная РНК саРНК	Forward	AACTACAACAGCCACAACG
	Reverse	TTCTGCTGGTAGTGGTCG
	Probe	ATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCAC

2.3. Методы клеточной биологии

2.3.1. Клеточные линии

Клеточная линия HEK293T была получена из ATCC (Манассас, США). Клетки культивировали при 37ºC в 5% атмосфере CO2 в среде DMEM с 10% содержанием фетальной бычьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS).

Культивирование клеточных линий осуществляли в полной питательной среде при 37 °C в атмосфере 5% CO_2. Пассирование проводили каждые 3–4 дня по достижении клетками конфлюэнтности 70–80%. Для снятия клеток с поверхности культурального пластика применяли 0,25%-ный раствор трипсина (ПанЭко, Россия), инактивацию которого осуществляли добавлением избытка полной

ростовой среды. Оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием красителя трипанового синего (ПанЭко, Россия) с подсчётом в камере Горяева.

2.3.2. Трансфекция клеток линии HEK293T

За сутки до трансфекции клетки HEK 293T высевали в 24-луночные планшеты из расчёта 5×10^4 клеток на лунку. Трансфекцию проводили с использованием реагента GenJect-40 (Молекта, Россия). Для каждой лунки готовили две отдельные смеси: в первой 20 мкл Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США) смешивали с РНК до конечной концентрации 50 нг/мкл; во второй 19 мкл Opti-MEM смешивали с 1 мкл GenJect-40, тщательно перемешивали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации содержимое обеих пробирок объединяли (20 мкл раствора РНК и 20 мкл раствора GenJect-40 на лунку), аккуратно перемешивали пипетированием (2 раза) и инкубировали ещё 15 мин. Полученную трансфекционную смесь (40 мкл) вносили по каплям в каждую лунку планшета.

2.3.3. Оценка уровня люминесценции лизатов клеток с помощью репортерного белка люциферазы светлячка

Клетки HEK293T высевали в 96-луночный непрозрачный белый планшет и трансфицировали саРНК, кодирующей люциферазу светлячка (Firefly luciferase), по методике, описанной в разделе 2.3.2, с использованием 100 нг РНК и 0,1 мкл реагента GenJect-40 на лунку. Через 24 и 48 часов после трансфекции культуральный супернатант удаляли.

Для проведения люциферазного анализа готовили рабочий раствор набора AbiLux Firefly Luciferase Assay Kit (ООО «Абисенс», Россия): весь объем буфера

для анализа люциферазы (Реагент #1) аккуратно добавляли во флакон с лиофилизированным субстратом на основе D-люциферина (Реагент #2) и перемешивали переворачиванием до полного растворения субстрата. Полученный рабочий раствор (3X) вносили по 40 мкл в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут для лизиса клеток.

Интенсивность хемилюминесценции, возникающей в результате АТФ-зависимого окисления D-люциферина, регистрировали на планшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) в режиме люминесценции при длине волны 560 нм. Полученные значения люминесценции использовали для оценки уровня экспрессии репортерного белка.

2.3.4. Проточная цитометрия клеток линии HEK293T

Клетки HEK293T трансфицировали саРНК, кодирующей репортерный белок eGFP, по методике, описанной в разделе 2.3.2. Через 24, 48, 72, 96, 120 и 168 часов после трансфекции клетки готовили для цитометрического анализа. Культуральный супернатант удаляли, в лунки добавляли раствор Версена, клетки аккуратно снимали пипетированием и переносили в пробирки. Клеточную суспензию центрифугировали при 300 g в течение 5 мин, супернатант удаляли, осадок дважды промывали 1× FACS-буфером (PBS с 2% FBS) с промежуточным центрифугированием при 300 g в течение 5 мин. После последнего центрифугирования клетки ресуспендировали в 100–150 мкл FACS-буфера. Для оценки жизнеспособности клеток непосредственно перед анализом добавляли раствор пропидия йодида (PI, Servicebio, Китай) до конечной концентрации 5 мкг/мл.

Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре BD LSR Fortessa (BD Biosciences, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva. Флуоресценцию eGFP возбуждали лазером с длиной волны 488 нм и

регистрировали в канале B530/30. Флуоресценцию пропидия йодида регистрировали в канале YG610-20A. Жизнеспособные клетки идентифицировали как PI-отрицательные. Для каждого образца регистрировали 20 000 событий. Данные анализировали в программе FlowJo 10.10 (BD Biosciences, США). Оценку уровня экспрессии eGFP проводили по медиане или среднему геометрическому значений интенсивности флуоресценции GFP-положительных клеток, устанавливая порог на уровне 3×10^3 для исключения аутофлуоресценции. Статистическую обработку результатов выполняли в программе Prism 10 (GraphPad Software, США). Результаты представляли в виде графиков распределения клеток по интенсивности флуоресценции и динамики изменения медианной интенсивности флуоресценции во времени.

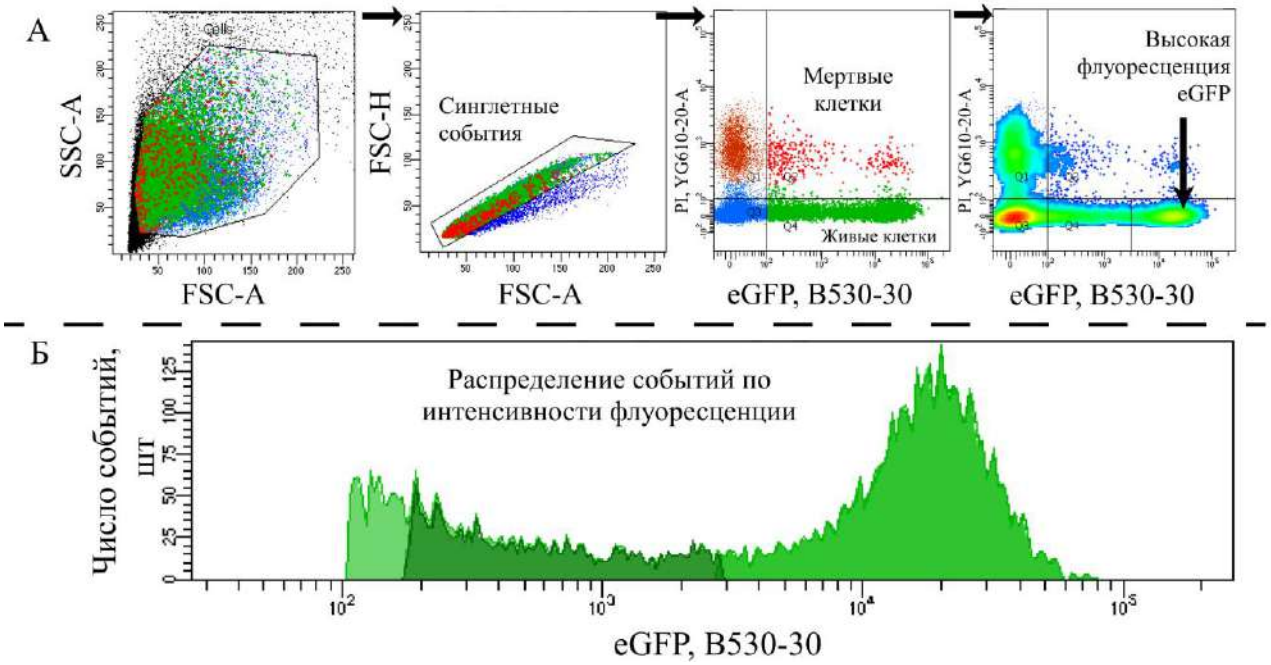


Рисунок 2.1 – Анализ интенсивности флуоресценции eGFP методом проточной цитометрии. А: стратегия ограничения субпопуляций для eGFP-положительных событий. На первом (FSC-A, SSC-A) и (FSC-A, FSC-H) втором графиках исключены клеточные остатки и клеточные агрегаты (выделены единичные синглеты). Далее при помощи пропидиум йодида (PI) исключены мертвые клетки и выделены eGFP-положительные события, зарегистрированные в канале B-530-30A; Б: Гистограмма распределения численности событий (ось ординат) в зависимости от интенсивности регистрируемого сигнала в канале B530-30-A.

2.4. *In vivo* исследования

Самок мышей линии BALB/c в возрасте 7–8 недель (вес 22±3 грамма) приобретали в НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН. Производители предоставили данные последнего контроля здоровья животных. При получении был проведён внешний осмотр состояния животных. Ветеринар не зафиксировал отклонений и количество принятых животных. После получения из питомника поставщика прошли адаптацию в виварии в течение 7-10 дней до начала введения в соответствии с СанПиН 3.3686-21. Во время этого периода проводили ежедневный осмотр внешнего состояния животных.

Экспериментальных животных во время эксперимента содержали в не инфекционном блоке вивария лаборатории клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России в стандартных условиях, соответствующих СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", и Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г по охране животных, используемых в научных целях, а также «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». Исследования на животных одобрены ЛЭК ФБГУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, протокол заседания №94 от 20 мая 2025 года.

При формировании групп животные были распределены в свободном порядке. После распределения по группам животных содержали в клетках с индивидуальной системой вентилляции, подсоединенных к общей вентиляции, по 5-7 особей. В качестве подстила использовали древесную стружку (ООО «Лабораторкорм»). Для кормления и поения животных были использованы: корм полнорационный, сухой гранулированный для лабораторных животных «Чара» - для мышей, крыс, хомяков (СПФ разведение (ООО «Фаворит», Россия), вода водопроводная фильтрованная (Аквафор, Россия).

Профильтрованную водопроводную воду и корм давали животным *ad libitum*. Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды. За

оптимальные принимаются границы температуры 20-24°C и влажности 45-65%; за допустимые принимаются границы температуры 20-26°C и влажности 30-70%. Температура и влажность постоянно контролируется. Воздухообмен в помещениях для содержания животных составляет 12-15 об/ч. Все эксперименты с использованием лабораторных животных были одобрены Этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 94 от 20 мая 2025 г. и протокол № 41 от 4 июня 2023 г.). Работа с животными выполнялась в строгом соответствии с этическими стандартами, утверждёнными Приказом Минздрава России, а также принципами международного руководства Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. При планировании экспериментов предпринимали все меры для сокращения числа используемых животных и снижения дискомфорта.

2.4.1. Оценка продолжительности биолюминесценции *in vivo*

Для оценки продолжительности экспрессии репортерного белка самкам мышей линии BALB/c в возрасте 7–8 недель внутримышечно вводили 5 мкг мРНК- или саРНК-ЛНЧ, кодирующих люциферазу светлячка (FLuc), в составе формуляции LNP-5. Регистрацию биолюминесценции проводили с использованием системы *in vivo* визуализации IVIS Lumina II (Life Sciences). За 15 мин до каждого измерения мышам внутрибрюшинно вводили D-люциферин (2,5 мг в 200 мкл PBS; Goldbio). Животных анестезировали смесью изофлурана с кислородом, помещали в горизонтальное положение (на спину) в камеру системы; во время процедуры анестезию поддерживали через носовой конус. Биолюминесценцию регистрировали при бининге 4 × 4 и времени экспозиции 30 с. Обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Living Image (Life Sciences). Измерения выполняли в следующие временные точки после инъекции: 3, 8, 24, 48, 72, 96 ч, а также 7, 14 и 21 сутки (n = 6 на группу).

Полученные данные использовали для построения кинетических кривых изменения биолюминесценции и сравнения продолжительности экспрессии между мРНК- и саРНК-платформами.

2.4.2. Выделение РНК из мышечной ткани, обратная транскрипция и количественная ПЦР

Для оценки эффективности доставки и стабильности РНК-платформ *in vivo* самкам мышей линии BALB/c в возрасте 7–8 недель внутримышечно вводили 5 мкг препаратов мРНК и саРНК, инкапсулированных в ЛНЧ. Через 24, 48 ч и 7 суток после инъекции проводили биопсию мышечной ткани из места введения (четырёхглавая мышца бедра) по 4 животных на каждую временную точку для каждой РНК-платформы. Образцы замораживали и хранили при –80 °C до выделения РНК.

Тотальную РНК экстрагировали из гомогенизированной мышечной ткани с использованием фенол-хлороформного метода (5:1) с реагентом ExtractRNA (Евроген, Россия). Гомогенизацию проводили на гомогенизаторе KZ-III-FP (Servicebio, Китай) с пластиковыми бусинами в 3 циклах при частоте 60 Гц в течение 30 с с паузой 30 с между циклами. Концентрацию и качество выделенной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США) по поглощению при 260 нм, после чего образцы разводили до концентрации 1000 нг/мкл. В качестве контроля использовали РНК, выделенную из мышечной ткани двух интактных животных без введения препаратов.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием 1000 нг РНК, набора ОТ-М-MuLV-RH (Биолабмикс, Россия) и произвольных гексануклеотидных праймеров. Полученную кДНК разводили в 5 раз и использовали для определения числа копий мРНК FLuc и референсного гена GAPDH в каждом образце методом количественной ПЦР в реальном времени на приборе QuantGene 9600 (BIOER,

Китай). Реакционную смесь объёмом 20 мкл готовили с использованием 2× HS-qPCR смеси (Биолабмикс, Россия), праймеров в концентрации 1× и зондов в концентрации 250 нМ, вносили 1 мкл разведённой кДНК. Последовательности праймеров и зондов представлены ниже:

FLuc: forward 5′-GCTACCAGGTAGCCCCAGCC-3′, reverse 5′-GGTTTTACCGTGTTCCAGCACG-3′, probe 5′-FAM-AGAGCATCCTGCTGCAACACC-BHQ1-3′;

GAPDH: forward 5′-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3′, reverse 5′-CCACCACCCTGTTGCTGTA-3′, probe 5′-FAM-ACTTTGTCAAGCTCATTTCCTGG-BHQ1-3′.

Анализ данных qPCR выполняли с использованием программного обеспечения QuantGene 9600 (BIOER, Китай) для получения значений Ct при пороговом уровне флуоресценции 400. Относительное содержание мРНК FLuc рассчитывали методом 2^(–ΔCt), где ΔCt = Ct(FLuc) – Ct(GAPDH).

2.4.3. Иммунизация мышей

Для оценки иммуногенности были сформированы четыре группы самок мышей линии BALB/c в возрасте 7–8 недель (по 6 мышей в группе). Мышей распределяли по группам в случайном порядке. Иммунизацию проводили внутримышечно в мышцу бедра в нулевой и 21-й день. Животные получали 2 мкг саРНК или мРНК, либо 0,2 человеческой дозы (3 мкг гемагглютинина на штамм) инактивированной вакцины «Ультрикс Квадри» (штаммовый состав 2025–2026 гг. для Северного полушария: A/Victoria/4897/2022 (H1N1)pdm09; A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2); B/Austria/1359417/2021; B/Phuket/3073/2013), либо 100 мкл плацебо (PBS с 20% сахарозы). Доза вакцины «Ультрикс Квадри» (3 мкг гемагглютинина на штамм) была выбрана на основе аллометрического масштабирования по площади поверхности тела с использованием Km-факторов и

соответствовала ~0,2 человеческой дозы. Поскольку экспериментальные РНК-препараты кодируют единственный антиген (гемагглютинин A/Wisconsin/588/2019), сравнение иммуногенности с вакциной «Ультрикс Квадри» проводили по эквивалентной дозе гемагглютинина штамма H1N1. Оценку титра антител проводили в сыворотках крови мышей на 20-й день после первой иммунизации и на 21-й день после второй иммунизации (42-й день после первой иммунизации) в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) по отношению к гемагглютинину антигенных вариантов вируса гриппа A(H1N1)pdm09.

2.4.4. Реакция торможения гемагглютинации

Иммуногенность оценивали с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА) в соответствии с протоколом, разработанным на основе рекомендаций ВОЗ. Сыворотки крови мышей обрабатывали рецептор-разрушающим ферментом (RDE, Denka Seiken Co., Ltd., Япония) в течение 16 часов для удаления неспецифических ингибиторов. После инактивации рецептор-разрушающего фермента при температуре 56°C в 96-луночных планшетах с V-образным дном готовили двукратные разведения обработанных сывороток. Затем добавляли вирусный антиген в рабочей дозе 8 агглютинирующих единиц (АЕ) и инкубировали планшет в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого добавляли 0,8% суспензию эритроцитов человека первой группы крови системы AB0 и инкубировали планшет ещё 60 мин при комнатной температуре. Титр антител определяли как наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдали полное торможение гемагглютинации.

В качестве антигена для РТГА использовали вирус гриппа A/Victoria/4897/2022 (ООО «Компания по производству диагностических препаратов», Санкт-Петербург, Россия). Для накопления антигенного материала

штамма A/Wisconsin/588/2019 проводили культивирование на культуре клеток MDCK согласно общепринятой методике.

2.5. Статистическая обработка данных и репрезентация

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Inc., США). Для сравнения двух независимых групп при нормальном распределении данных применяли непарный t-критерий Стьюдента. При сравнении трёх и более групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующим проведением множественных попарных сравнений. Выбор пост-хок критерия определялся характером распределения данных и однородностью дисперсий. При соблюдении предпосылок нормального распределения и гомогенности дисперсий применяли критерий Тьюки. При нормальном распределении данных в условиях гетерогенности дисперсий использовали критерий Даннетта T3. При отклонении распределения от нормального применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующим пост-хок анализом по критерию Данна. Для сравнения двух независимых групп при отсутствии нормального распределения использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при p <0,05. Уровни статистической значимости обозначали следующим образом: * — p <0,05; ** — p <0,01; *** — p <0,001; **** — p <0,0001; ns — p >0,05 (статистически незначимые различия). Количественные данные представляли в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение, либо среднего арифметического значения ± стандартная ошибка среднего, что указывали в подписях к соответствующим рисункам. Титры антител, определённые методом реакции торможения гемагглютинации (РТГА), представляли в виде средних

геометрических титров (GMT) с соответствующими 95% доверительными интервалами (ДИ).

Графики, схемы и иллюстрации подготавливались с использованием программ GraphPad Prism 10 и Figma (Figma, Inc., США).

Обработку изображений, полученных методом флуоресцентной микроскопии, проводили при помощи программного пакета ImageJ (версия 1.54f, с открытым исходным кодом).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Оптимизация трансфекции и сравнение платформ саРНК и мРНК

3.1.1. Анализ целостности саРНК

Для подтверждения чистоты и целостности РНК после транскрипции *in vitro* проводили спектрофотометрическую оценку концентрации и чистоты препаратов на приборе NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США). Оценку длины и целостности РНК проводили методом капиллярного электрофореза на приборе MultiNA (Shimadzu, Япония). Спектрофотометрический анализ показал, что соотношение A_{260}/A_{280} для всех образцов находилось в диапазоне 1,9–2,1, что свидетельствует об отсутствии значительного белкового загрязнения. Отношение A_{260}/A_{230} превышало 1,8, указывая на отсутствие значимых количеств гуанидина и фенола в препаратах.

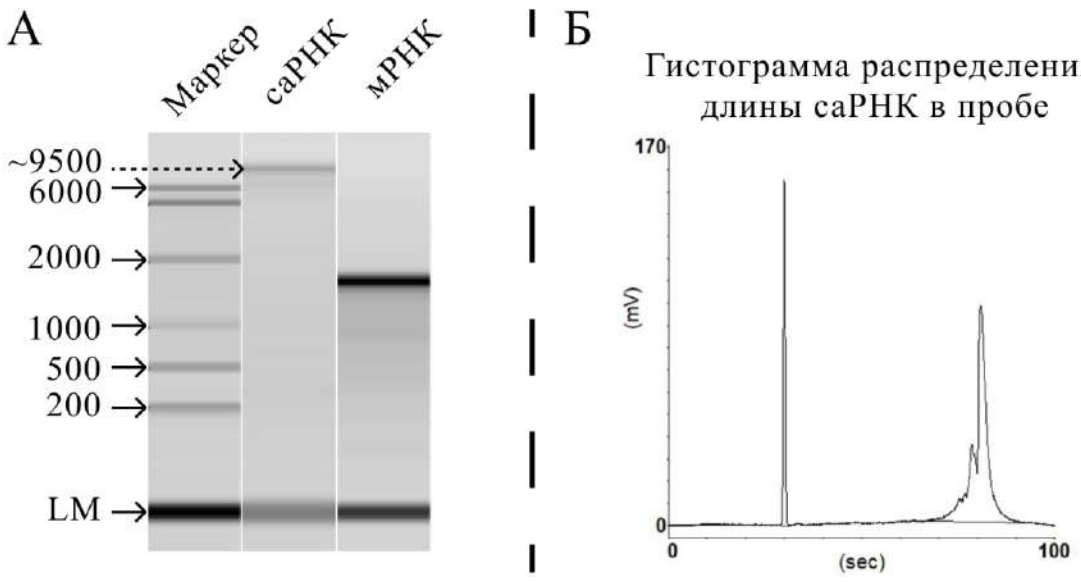


Рисунок 3.1 – Анализ препаратов саРНК и мРНК методом капиллярного электрофореза (система MultiNA). А: виртуализированный гель

(электрофореграмма в виде дорожек). В дорожке «Маркер» указаны длины фрагментов в нуклеотидах (н.о.). Полоса, соответствующая саРНК, располагается в области высоких молекулярных масс (длина превышает 6000 н.о.). «LM» — маркер, используемый для контроля процесса (Lower Marker). Б – Электроферограмма пробы саРНК: распределение интенсивности сигнала (ось ординат, мВ) в зависимости от времени выхода фрагментов из капилляра (ось абсцисс, сек). Пик в правой части графика соответствует целевой фракции саРНК.

По результатам капиллярного электрофореза была подтверждена целостность саРНК-транскриптов: на электрофореграммах наблюдался чёткий пик без значимых фрагментов деградации (Рисунок 3.1), а также минорный пик, вероятно, соответствующий фракции саРНК имеющей сложную вторичную структуру. Однако точная длина транскриптов саРНК не могла быть определена ввиду ограничений разрешающей способности метода и отсутствия коммерческих маркеров молекулярной массы, специфичных для РНК длиной ~10 тыс. нуклеотидных остатков. Тем не менее, оценка приблизительной длины проводилась на основании сравнения с маркером молекулярной массы (200–6000 нт), что указывало на соответствие ожидаемой длине молекулы саРНК.

3.1.2. Оптимизация трансфекции саРНК

СаРНК имеет значительно большую длину и высокий суммарный отрицательный заряд по сравнению с нереплицирующейся мРНК, что накладывает стерические ограничения способные снизить эффективность трансфекции клеточных культур. В связи с этим была исследована эффективность трансфекции клеток линии HEK293T препаратом саРНК (200 нг), кодирующим репортерный белок eGFP, с использованием трёх трансфекционных реагентов: GenJect-40 (GJ), Липофектамин-2000 и полиэтиленимина (ПЭИ), в различных соотношениях РНК (мкг) : трансфектант (мкл) – 2:1, 4:1, 8:1, 16:1 и 36:1 (для GJ), а также 1:1, 2:1, 8:1 и 16:1 (для Липофектамин-2000 и ПЭИ). Оценку эффективности доставки

препаратов проводили через 24 часа после трансфекции методом флуоресцентной микроскопии на приборе Zeiss AxioVert A1.

Как показано на рисунке 3.2А, при использовании GJ в соотношении РНК:GJ = 4:1 (мкг:мкл) наблюдалась наибольшая эффективность трансфекции (11,67% ± 0,30% доли площади GFP-положительных клеток) по сравнению с другими тестируемыми соотношениями (2:1, 8:1, 16:1, 36:1) (6,80% ± 0,05%; 6,63 ± 1,77%; 2,63% ± 1,55%; 0,75% ± 0,57% доли площади GFP-положительных клеток соответственно). Снижение количества GJ по отношению к саРНК приводило к значительному уменьшению удельной площади GFP-положительных клеток, что, вероятно, обусловлено недостаточной эффективностью формирования полиплексных частиц при субоптимальных соотношениях реагента и РНК. С другой стороны, увеличение количества GJ по отношению к саРНК также приводило к снижению эффективности трансфекции, что, вероятно, связано с цитотоксичностью трансфектанта.

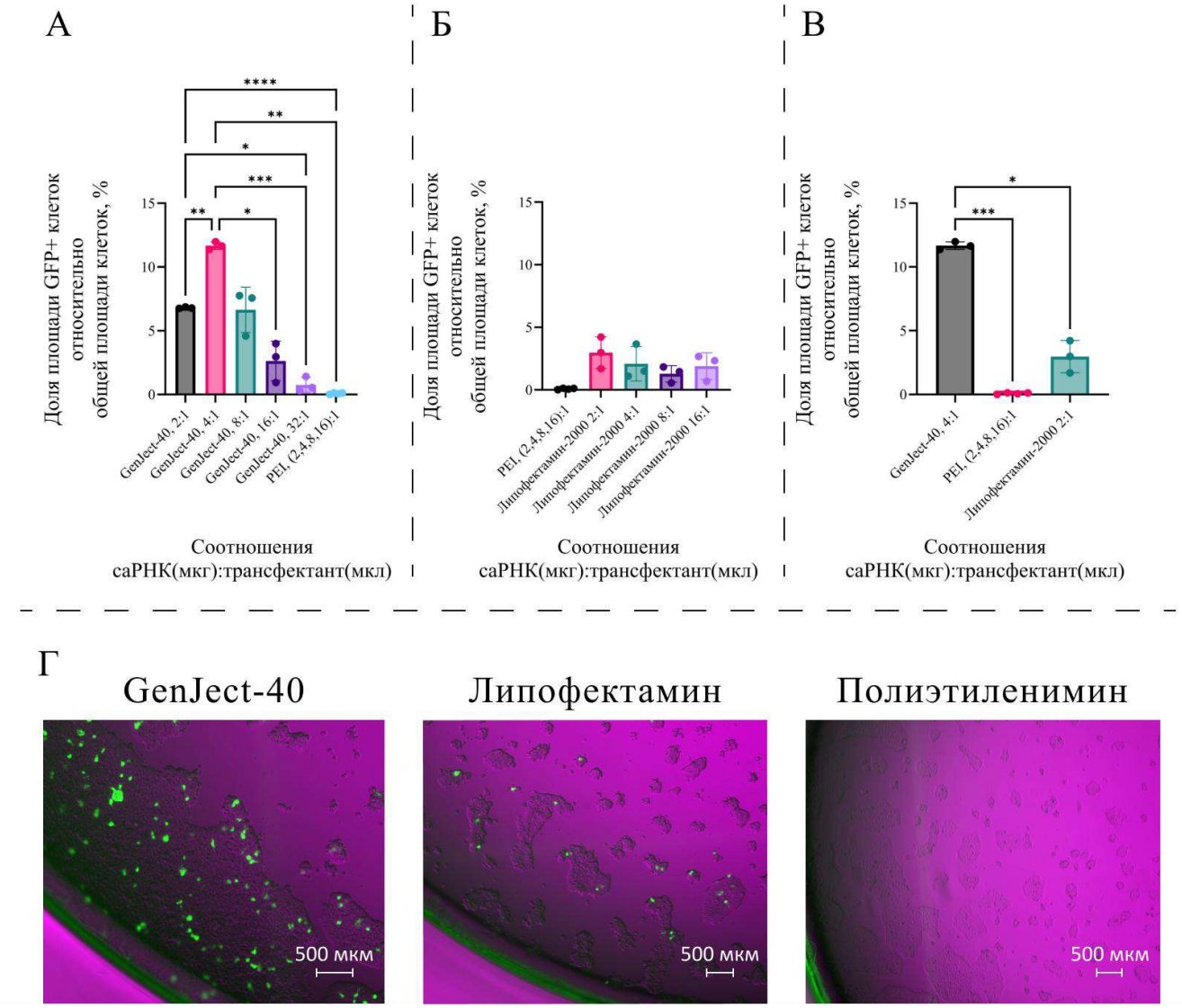


Рисунок 3.2 – Оценка уровня трансфекции клеток линии HEK293T трансфекционными агентами GenJect-40, Липофектамин-2000 и ПЭИ в различных соотношениях саРНК:трансфектант методом флуоресцентной микроскопии. А, Б, В: Диаграммы, отображающие долю площади GFP+-клеток (в % от общей площади клеток) в зависимости от типа трансфектанта и соотношения саРНК (мкг) к трансфектанту (мкл). Панель А демонстрирует результаты для реагента GenJect-40 (и ПЭИ в качестве контроля), панель Б – для Липофектамина-2000, панель В – сравнительный анализ лучших образцов (GJ, Липофектамин-2000, ПЭИ). Критерий Даннетта Т3; * - p <0,05; ** - p <0,01; *** - p <0,001; **** - p <0,0001. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Г – Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток через 24 часа после трансфекции с использованием GJ, Липофектамина и ПЭИ. Зеленым цветом визуализируются GFP-положительные клетки, фиолетовым – светлое поле.

Трансфекция с использованием трансфекционного агента Липофектамин-2000 при всех тестируемых соотношениях (1:1, 2:1, 8:1, 16:1) характеризовалась значительно более низкой эффективностью доставки по сравнению с GenJect-40, что проявлялось в меньшей доле площади GFP-положительных клеток (<5%) (Рисунок 3.2Б). Кроме того, при использовании реагента Липофектамин-2000 наблюдалась массовая клеточная гибель, что может свидетельствовать о выраженной цитотоксичности данного реагента при работе с саРНК. При использовании ПЭИ не было выявлено успешной трансфекции ни в одном из выбранных соотношений (1:1, 2:1, 8:1, 16:1) и морфология клеток соответствовала наблюдаемой у нетрансфецированных клеток.

Таким образом, среди протестированных трансфекционных агентов оптимальным для доставки саРНК в клетки HEK293T являлся GenJect-40 при соотношении РНК:GJ = 4:1 (мкг:мкл), который обеспечивал наибольшую эффективность трансфекции при минимальной цитотоксичности.

Далее с использованием саРНК кодирующей FLuc дополнительно была проведена оценка оптимального соотношения GJ:саРНК (мкл/мкг). Как представлено на рисунке 3.3 при соотношении GJ:саРНК - 1:1 наблюдается более высокий уровень FLuc через 24 часа по сравнению с соотношениями 0.5:1, 1,5:1, 2.5:1, 3:1 (Критерий Даннтетта Т3). Через 48 и 72 часа наибольшие значения биолюминесценции также наблюдались при соотношении 1 мкл GJ к 1 мкг саРНК. Таким образом, данное соотношение трансфекционного агента к РНК было выбрано для использования в дальнейших экспериментах на линии клеток HEK293T.

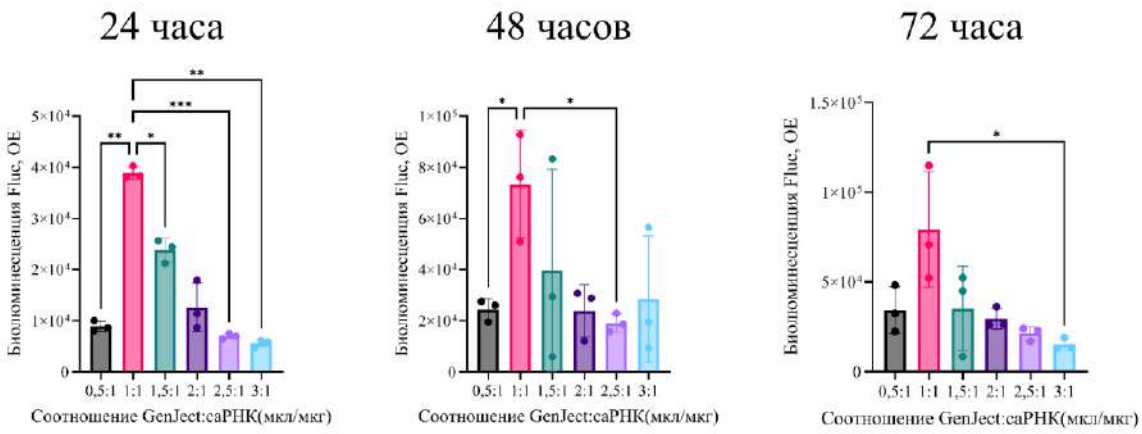


Рисунок 3.3 – Оценка оптимального соотношения GJ(мкл):саРНК(мкг) после трансфекции клеток линии HEK293T препаратами саРНК кодирующей FLuc с помощью метода цитофлуорометрии через 24, 48 и 72 часа после трансфекции клеток линии HEK293T препаратами саРНК . Соотношения GJ(мкл):саРНК(мкг) - 0,5:1; 1:1; 1,5:1; 2:1; 2,5:1; 3:1. Критерий Даннетта Т3; * - *p*-value <0,05; ** - *p*-value <0,01; *** - *p*-value <0,001. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

3.1.3. Трансляционная эффективность саРНК на культуре клеток

Для определения оптимального количества саРНК необходимого для доставки в клетку была проведена трансфекция клеточной культуры линии HEK293T препаратом саРНК, кодирующим репортерный белок FLuc, в трёх дозах (1,66; 5,0 и 13,33 пг/кл) и мРНК в дозе 5 пг/кл. через 24 часа после трансфекции (Рисунок 3.4). Как показано на рисунке 3.4Б, при дозах 13,33 и 1,66 пг/кл РНК наблюдался достоверно более высокий уровень биолюминесценции репортерного белка в группе мРНК (U-тест Манна-Уитни, *p*-value <0,05 и *p*-value <0,0001). Однако при использовании дозы 5,0 пг/кл РНК различия между группами саРНК и мРНК не наблюдались (*p*-value >0,05).

При сравнении абсолютных значений биолюминесценции FLuc через 24 часа после трансфекции культуры клеток линии HEK293T препаратом саРНК в дозах 1,66; 5,0 и 13,33 пг/кл наибольший уровень биолюминесценции наблюдался при

дозе 5 пг/кл, он превышал в ~ 4 раза уровни, наблюдаемые при использовании других доз саРНК (Критерий Даннтетта Т3; *p*-value <0,01,Рисунок 3.4А).

Полученные данные могут свидетельствовать о нелинейной зависимости уровня целевого белка от дозы саРНК. Повышение количества саРНК в перерасчете на клетку сверх определённого порога не приводит к пропорциональному росту уровня белка. Эти эффекты могут быть обусловлены несколькими факторами: во-первых, чрезмерной индукцией врождённого иммунного ответа клеток на двуцепочечные РНК-интермедиаты, образующиеся в процессе репликации саРНК; во-вторых, цитотоксическим эффектом, связанным с перегрузкой клеточных механизмов трансляции при сверхвысоких дозах.

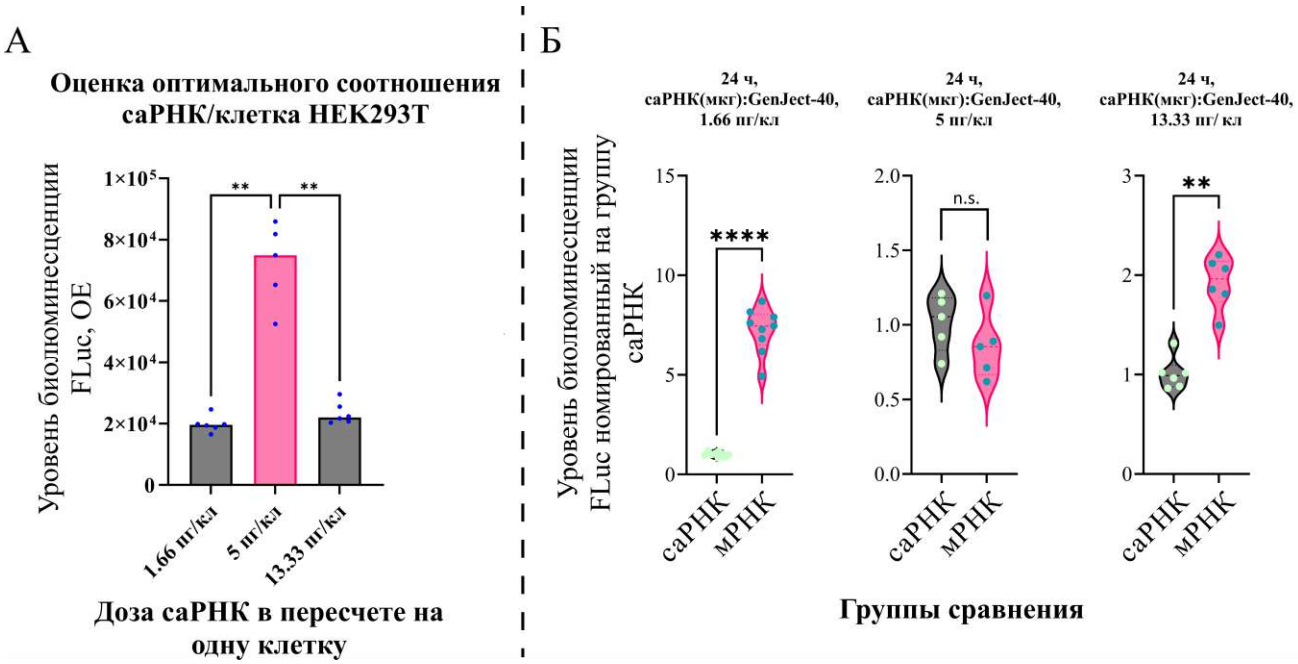


Рисунок 3.4 – А: Влияние дозы саРНК на эффективность экспрессии репортерного белка FLuc через 24 часа после трансфекции клеток линии HEK293T (** - *p*-value <0,01 по сравнению с группой 5 пг/кл (критерий Т3 Даннетта)); Б: сравнение интенсивности биолюминесценции FLuc через 24 часа после трансфекции клеток 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.

На следующем этапе мы оценили динамику изменения уровня флуоресценции белка eGFP, а также долю трансфицированных клеток HEK293T (Рисунок 3.5). Было выявлено, что общий процент трансфицированных клеток в группе, саРНК составил 39,6% ± 3,1%, что ниже, чем в группе мРНК в ~2,3 раза (92,2% ± 2,2%). Доля трансфицированных клеток, где уровень интенсивности флуоресценции репортерного белка eGFP превышал $3x10^3$ ОЕ, в группе саРНК составила 12,1% ± 0,9%, что ниже уровня трансфекции наблюдаемного в группе мРНК в ~6,3 раза (76,7% ± 3,1%). Также было выявлено равномерное распределение интенсивности флуоресценции по логарифмической шкале в группе саРНК, что, вероятно, связано со стохастическим характером доставки и репликации саРНК. Такой паттерн распределения eGFP-положительных клеток может указывать на необходимость оптимизации саРНК для получения более гомогенной популяции трансфицированных клеток.

На рисунке 3.5В показана динамика изменения медианы интенсивности флуоресценции eGFP-положительных событий с высоким уровнем флуоресценции. Нами была обнаружена разнонаправленный паттерн изменения медианы интенсивности флуоресценции после трансфекции саРНК и мРНК. Через 24 часа после трансфекции более высокие значения показателя медианы флуоресценции (в ~1,8 раза) наблюдаются при использовании мРНК. В более поздних точках измерений через 48, 72, 96 и 120 часов после трансфекции, наоборот наблюдался более высокий сигнал флуоресценции клеток, трансфицированных саРНК (U-тест Манна-Уитни; * - *p*-value <0,05; ** - *p*-value <0,01; *** - *p*-value <0,001,Рисунок 3.5В).

Основываясь на совокупности данных по сравнению эффективности мРНК и саРНК на культуре клеток HEK293T, были сделаны следующие промежуточные заключения:

1) Уровень репортерного белка закодированного в последовательности саРНК имеет нелинейный характер в зависимости от дозировки, что указывает на необходимость тщательного подбора оптимальной дозировки саРНК для достижения максимального уровня биосинтеза целевого белка.

2) саРНК менее эффективно трансфицирует клетки по сравнению с мРНК, что, вероятно, связано с высокой молекулярной массой саРНК, а также образованием вторичных структур, создающих стерические барьеры для трансфекции и снижающих эффективность внутриклеточной доставки.

3) Паттерн кинетики уровня репортерного белка после трансфекции культуры клеток линии HEK293T препаратами саРНК и мРНК имеет разнонаправленный характер: мРНК обеспечивает высокие количества целевого белка в первые часы после трансфекции, тогда как саРНК характеризуется отсроченным, но более продолжительным профилем биосинтеза репортерного белка.

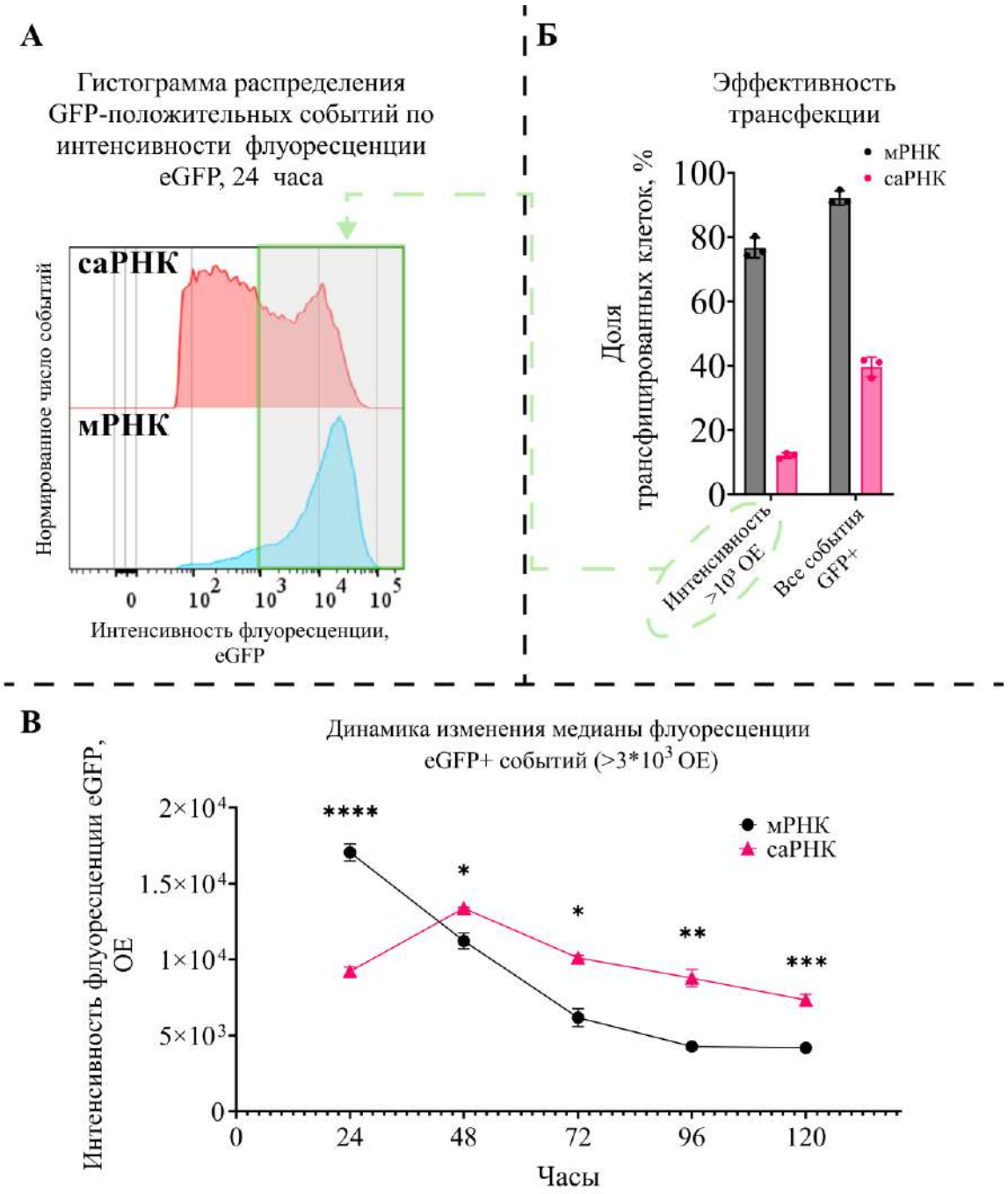


Рисунок 3.5 – Распределение интенсивности флуоресценции и паттерн кинетики экспрессии eGFP после трансфекции клеток линии HEK293T препаратами саРНК и мРНК. А: Гистограмма распределения событий по интенсивности флуоресценции eGFP; Б: доли зарегистрированных GFP-положительных событий, через 24 часа после трансфекции препаратов саРНК и мРНК выраженные в процентах; В: динамика изменения медианы флуоресценции eGFP в течение 120 часов после трансфекции клеток. U-тест Манна-Уитни; * - *p*-value <0,05; ** - *p*-value <0,01; *** - *p*-value <0,001. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

3.1.4. Уровень биосинтеза репортерного белка после доставки саРНК на модели *in vivo*

В модели *in vitro* мы наблюдали разнонаправленный и различающийся во времени паттерн кинетики уровня репортерного белка после трансфекции клеточной культуры препаратами саРНК и мРНК. Для подтверждения выявленных различий платформ саРНК и мРНК мы провели аналогичное исследование *in vivo*, с целью определения преимуществ и недостатков платформы саРНК.

Мышам линии BALB/c внутримышечно вводили препараты мРНК (AG_TPL_LucF_mod) и саРНК (T7_VEE_LucF), инкапсулированные в ЛНЧ после чего в течение 21 дня (Рисунок 3.6А,Б) поводили регистрацию биолюминесцентного сигнала репортерного белка FLuc. У животных, получавших мРНК, пик биолюминесценции наблюдался через 8 ч после инъекции и составлял $4{,}65 \times 10^8 \pm 4{,}04 \times 10^8$ ОЕ, после чего сигнал постепенно снижался, сохраняясь до 21 дня ($6{,}78 \times 10^4 \pm 4{,}33 \times 10^4$ ОЕ) (Рисунок 3.6Б). В группе саРНК в первых точках измерения (3 ч) биолюминесценция была не отличима от фоновой ($6{,}89 \times 10^4 \pm 2{,}30 \times 10^4$ ОЕ), однако в последующие точки наблюдения отмечался рост биолюминесцентного сигнала с достижением максимума на 7-й день ($1{,}56 \times 10^7 \pm 2{,}87 \times 10^7$ ОЕ). С 7 по 21 день наблюдения экспрессия репортера снижалась в обоих группах (Рисунок 3.6Б).

Интенсивность биолюминесценции в группе мРНК более чем на два порядка превышала наблюдаемую в группе саРНК через 24 часа и 48 часов после введения препарата, однако к 7-му дню уровень интенсивности биолюминесцентного сигнала в группах мРНК и саРНК стал неотличим (p-value = 0,484), и к 14 дню в группе мышей которым вводили саРНК-препарат уровень сигнала превышал наблюдаемый в группе мышей, которым вводили мРНК (p-value <0,05). Таким образом, мРНК-препарат обеспечивал быстрый и интенсивный, но кратковременный уровень биосинтеза репортерного белка, тогда как саРНК

характеризовалась постепенным пролонгированным нарастанием продукции белка с пиком на 7 день (Рисунок 3.6Б).

Для выяснения деталей, определяющих наблюдаемые профили биолюминесценции, нами была проведена оценка динамики содержания копий РНК в месте инъекции методом qPCR. При идентичной массовой дозе препаратов исходное молярное количество введённых молекул мРНК было в 4,3 раза выше, чем саРНК, вследствие меньшей молекулярной массы мРНК (Рисунок 3.6Г). Через 24 и 48 часов после введения препаратов относительное содержание РНК (нормированное на *Gapdh*) между группами не различалось, хотя через 24 часа уровень копий саРНК имел тенденцию к более низким значениям (0,014 ± 0,005 против 0,026 ± 0,008 отн. ед.) (Рисунок 3.6В). К 7 дню количество транскриптов FLuc снизилось в обеих группах, однако для мРНК это падение было критическим (в 20–25 раз по сравнению с точкой 48 ч), в то время как уровень саРНК снизился лишь в 4 раза (Рисунок 3.6В). В результате на 7 день количество копий саРНК (1,00 ± 0,40) достоверно превышало количество мРНК (0,23 ± 0,08) примерно в 4,3 раза (Рисунок 3.6В), что может указывать на, активную внутриклеточную репликацию саРНК, компенсирующую естественную деградацию исходных молекул РНК.

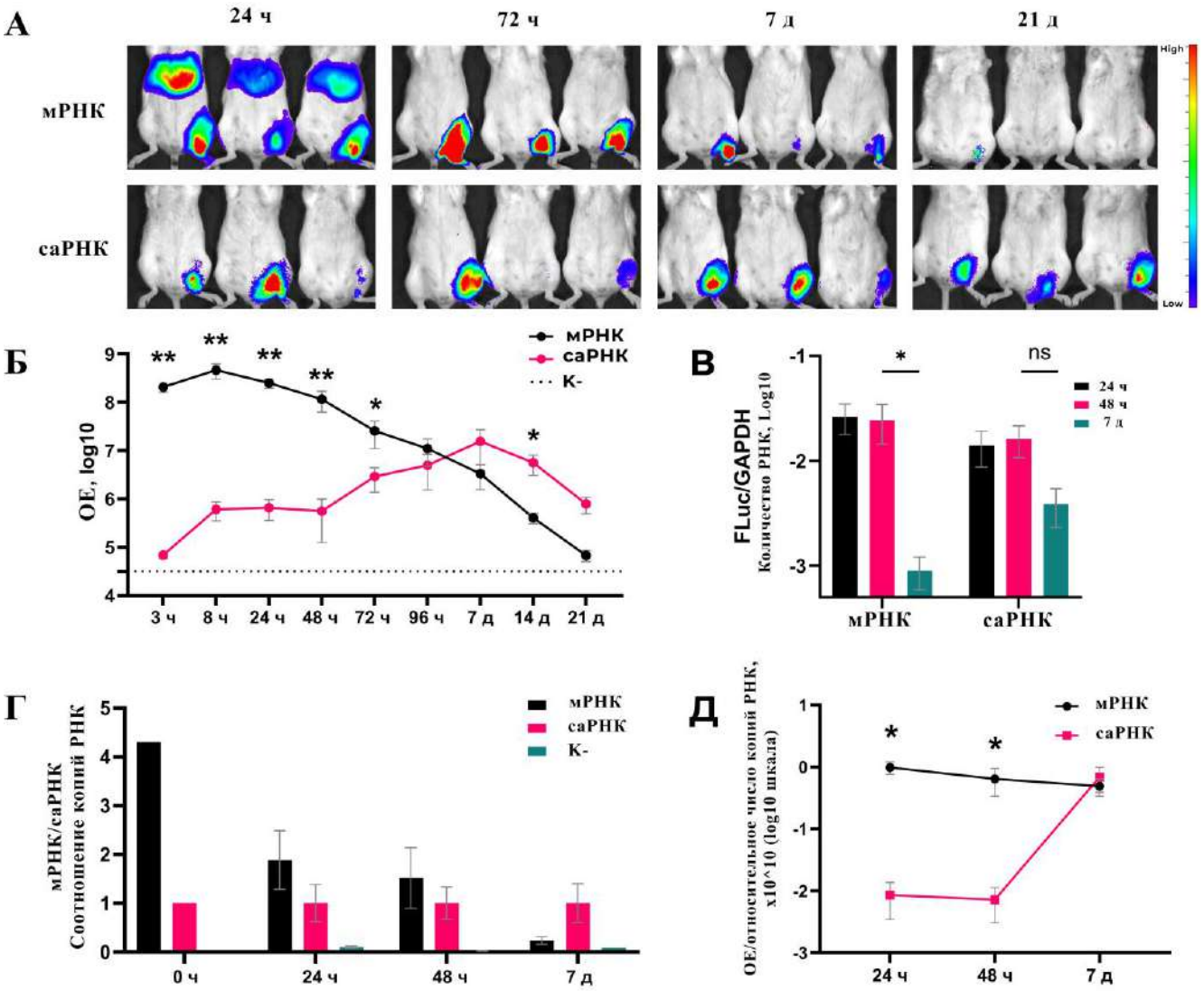


Рисунок 3.6 – Результаты исследования динамики биолюминесценции и стабильности РНК в месте введения препарата на мышах линии BALB/c. А – фотографии демонстрирующие локализацию и относительный уровень интенсивности биолюминесценции FLuc; Б – Динамика интенсивности биолюминесценции через 3 ч, 8 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 7 д, 14 д, 21 д (U-тест Манна-Уитни, * - *p*-value <0,05, ** - *p*-value <0,01), отрицательный контроль (K-) соответствует базальному уровню аутофлуоресценции животных после введения D-люциферина. В – Количество РНК нормированное на содержание мРНК кодирующих «ген домашнего хозяйства» *GAPDH* (непарный t-критерий; * - *p*-value <0,05; ns - *p* >0,05); Г – Расчётное соотношение числа копий саРНК или мРНК, кодирующих FLuc нормированное на саРНК. Д - Отношение интенсивности биолюминесценции к относительному количеству мРНК или саРНК через 24, 48 ч и 7 дней после инъекции (непарный t-критерий; * – *p*-value <0,05). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Для интегральной оценки эффективности процессов, предшествующих биосинтезу целевого белка (клеточное поглощение ЛНЧ, выход из эндосом и трансляция РНК), рассчитывали отношение интенсивности биолюминесценции к относительному содержанию РНК (биолюминесценция на копию РНК). Через 24 и 48 часов удельная эффективность трансляции мРНК на одну копию была примерно на два порядка выше, чем у саРНК (Рисунок 3.6Д). Однако к 7 дню данный показатель между платформами был сопоставим. Это свидетельствует о том, что осуществление репликации саРНК и накопление функциональных субгеномных РНК со временем полностью компенсируют исходно более низкую трансляционную активность платформы. Можно сказать, что динамика профиля экспрессии флуоресцентного белка на модели *in vivo* соотносится с экспериментом *in vitro*. С тем лишь отличием, что в случае экспериментов на клеточных линиях более высокие уровни репортерного белка в группе саРНК наблюдались уже через 48 часов, а в экспериментах на животных – только через 14 дней. Тем не менее разнонаправленный характер динамики уровня репортерного белка, а также увеличение копий РНК, кодирующих FLuc, является косвенным свидетельством того, что саРНК действительно реплицируется и имеет потенциал для увеличения эффективности посредством дальнейшей оптимизации платформы саРНК.

Основываясь на этих данных, подтверждающих функциональность платформы саРНК, а также данных литературы о самоадъювантных свойствах саРНК было проведено исследование иммуногенности саРНК-препарата, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа в качестве антигена.

3.1.5. Оценка гуморального иммунного ответа после иммунизации мышей РНК-препаратами мРНК и саРНК

Для оценки иммуногенности саРНК-препарата нами была проведена двухкратная иммунизация мышей линии BALB/c с интервалом 21 день

препаратами саРНК, мРНК (2 мкг), кодирующими гемагглютинин вируса гриппа A/Wisconsin/588/2019 (H1N1), коммерческой инактивированной сплит-вакциной «Ультрикс Квадри» (0,2 человеческой дозы, 3 мкг гемагглютинина на штамм) и плацебо (PBS с 20% сахарозы). Оценку гуморального иммунного ответа проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) против антигенных вариантов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 – A/Wisconsin/588/2019 (гомологичный антиген) и A/Victoria/4897/2022 (гетерологичный антиген).

Через 20 дней после первой иммунизации (Рисунок 3.7А) в группах мышей, получивших экспериментальные РНК-препараты (саРНК и мРНК), наблюдали регистрируемые титры антител, ингибирующие гемагглютинацию (p-value <0,01), против обоих антигенов по сравнению с группой отрицательного контроля (PBS). В группе саРНК среднее геометрическое значение титров антител составило 1:180 (ДИ: 1:133 – 1:242) против штамма A/Wisconsin/588/2019 и 1:67 (ДИ: 1:44 – 1:92) против A/Victoria/4897/2022. В группе классической мРНК были получены более высокие показатели: 1:285 (ДИ: 1:165 – 1:493) и 1:101 (ДИ: 1:48 – 1:214) против тех же штаммов соответственно, однако межгрупповые различия между саРНК и мРНК не достигали статистической значимости. В группе животных, вакцинированных коммерческой вакциной «Ультрикс Квадри», титр антител в тесте РТГА против штамма A/Wisconsin/588/2019 составил 1:71 (ДИ: 1:53 – 1:96), а против штамма A/Victoria/4897/2022 наблюдали минимальные значения (менее 1:37, ДИ: 1:17 – 1:73). Таким образом, коммерческая вакцина, несмотря на наличие в составе антигенов штамма A/Victoria/4897/2022, стимулировала выработку более низкого уровня иммунного ответа в выбранной дозе по сравнению с экспериментальными РНК-препаратами.

Через 20 дней после второй иммунизации (41-й день эксперимента; Рисунок 3.7Б) 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 (Рисунок 3.7А). Наиболее выраженное повышение титра антител

отмечено в группе мышей, иммунизированных классической мРНК. Титр антител в группе мРНК против штамма A/Wisconsin/588/2019 составил 1:2281 (ДИ: 1:1319 – 1:3943), что было выше (p <0,0001) по сравнению с группой отрицательного контроля (PBS) и группой мышей, получивших коммерческую вакцину (1:17, ДИ: 1:8 – 1:42). Против штамма A/Victoria/4897/2022 в группе мРНК также наблюдались высокие титры (1:1810, ДИ: 1:844 – 1:3882), достоверно отличающиеся от контроля и группы «Ультрикс Квадри» (1:56, ДИ: 1:26 – 1:121; *p*-value <0,05).

В группе мышей, иммунизированных саРНК-препаратом, титры антител также повышались после второй иммунизации, но менее выраженно, чем в группе мРНК. Титры в группе саРНК составили 1:640 (ДИ: 1:404 – 1:1014) против штамма A/Wisconsin/588/2019 и 1:452 (ДИ: 1:246 – 1:832) против штамма A/Victoria/4897/2022, что было выше, чем в контрольной группе (*p*-value <0,05). Межгрупповые различия между группами саРНК и мРНК не достигали статистической значимости.

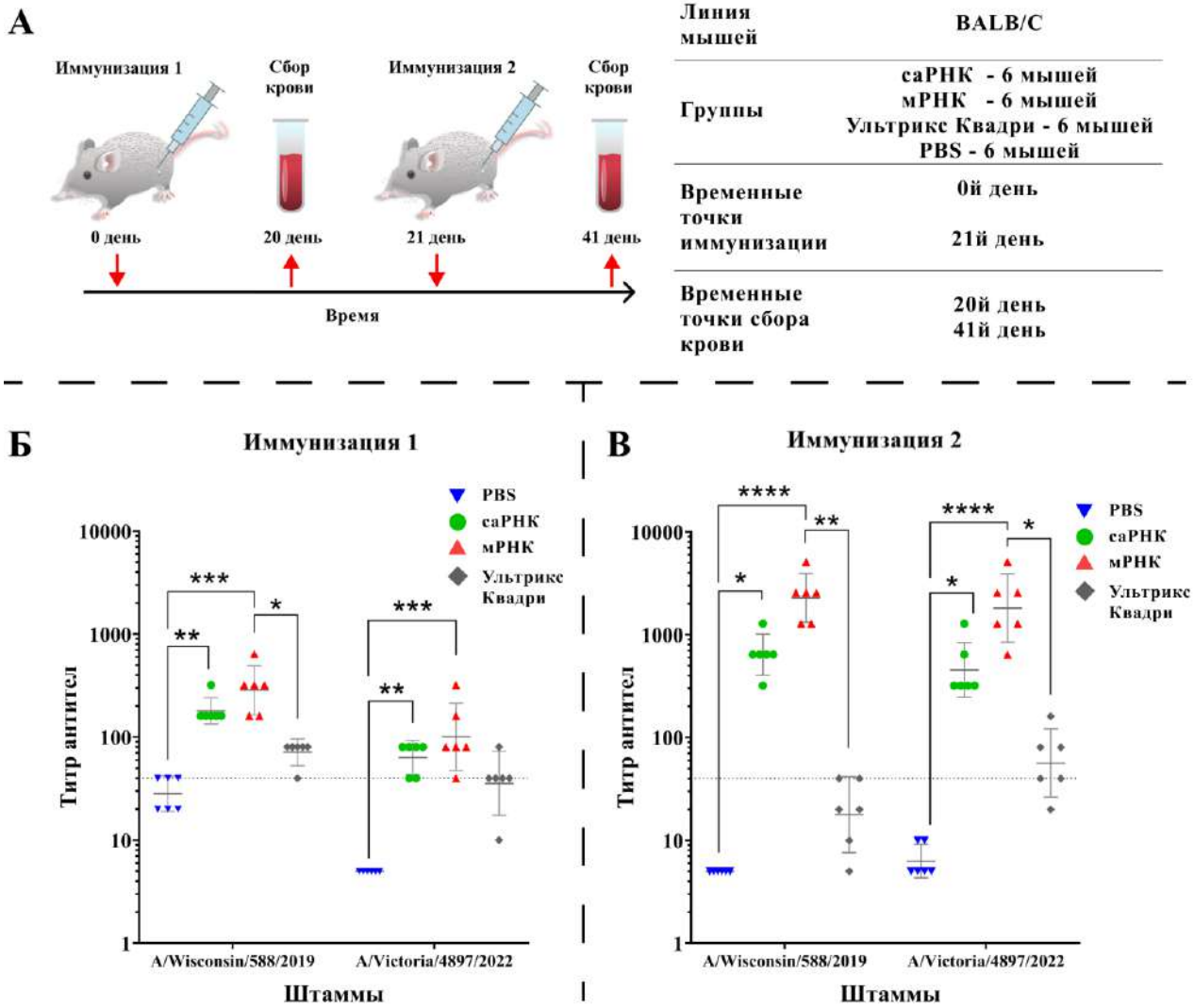


Рисунок 3.7 - Оценка гуморального иммунного ответа после иммунизации мышей РНК-препаратами мРНК и саРНК А. Схема эксперимента. Проводили 2 последовательные иммунизации через 21 день. Сбор биоматериала осуществлялся через 20 дней после первой и второй иммунизации. Б. График среднегеометрического титра 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% ДИ.

Вакцина «Ультрикс Квадри» после второй иммунизации показала низкие титры антител в тесте РТГА, которые были значительно ниже показателей обеих групп РНК-вакцин. Это может быть обусловлено как выбранной дозой (0,2 человеческой дозы), так и особенностями инактивированной вакцины,

индуцирующей преимущественно гуморальный ответ без значимой активации врождённых механизмов.

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, стартегиям оптимизации будет посвящена вторая часть нашего исследования, которая направлена на поиск и исследование оптимизаций саРНК.

Таким образом, в рамках первого блока работ были успешно получены и охарактеризованы молекулы саРНК, отработаны условия трансфекции на культуре клеток, оценена динамика биосинтеза репортерных белков в экспериментах на культуре клеток и животных, оценена стабильность молекул РНК, проведена апробация платформы в качестве вакцины против гриппа. В совокупности полученные нами результаты позволяют свидетельствовать о работоспособности платформы саРНК и необходимости ее дальнейшей оптимизации.

3.2. Влияние аминокислотных замен в nsP2 и nsP3 белках на биогенез саРНК и уровень биосинтеза репортерного белка

Мы исследовали влияние мутаций в последовательности саРНК кодирующей nsP2 и nsP3 белки, приводящих к аминокислотным заменам G763R, S773P, Q739L в С-концевом домене функционально проявляющим цистеиновую протеазную активность. Выбор именно этих мутаций основан на ряде работ, описанных в литературном обзоре [5, 116]. Как отмечено в работах аминокислотные замены G763R, S773P, Q739L могут влиять на эффективность репликации, образование

субгеномной РНК и цитотоксичность. После генно-инженерных работ мы получили конструкции саРНК, содержащие отдельные мутации. Далее группы сравнения и варианты саРНК содержащие вышеуказанные мутации будут называться как «G763R», «S773P», «Q739L» соответственно. Исходные варианты саРНК далее мы будем называть «WT».

Выбор мутаций в приводящих к аминокислотным заменам Q48P, I113F и L121P в N-концевом районе nsP3 был осуществлен на основе литературных данных [116, 129]. Отбор мутаций проводили на основе данных о возможном влиянии на эффективность репликации, образовании субгеномной РНК и цитотоксичности. Группы сравнения и варианты саРНК содержащие вышеуказанные мутации будут называться как «Q48P», «I113F», «L121P» соответственно.

3.2.1. Влияние аминокислотных замен в nsP2 белке на уровень биосинтеза Fluc

На первом этапе нами была проведена сравнительная оценка интенсивности биолюминесценции FLuc после трансфекции культуры клеток линии HEK293T вариантами саРНК «G763R», «S773P», «Q739L» и «WT». Как показано на рисунке 3.8, через 24 часа было выявлено повышение уровня биолюминесценции в ~2,3 раза в группах трансфицированных вариантами саРНК «G763R» и «S773P» по сравнению с контрольной саРНК «WT» (p-value <0,01). С другой стороны вариант саРНК «Q739L» значительно снизил уровень биосинтеза FLuc. Во временной точке 48 часов было исследовано 7 независимых повторов эксперимента, однако значимых различий между саРНК «WT», «G763R» и «S773P» не было обнаружено (p-value >0,05). В той же временной точке саРНК «Q739L» оказала негативный эффект на уровень биолюминесценции FLuc (p-value <0,0001).

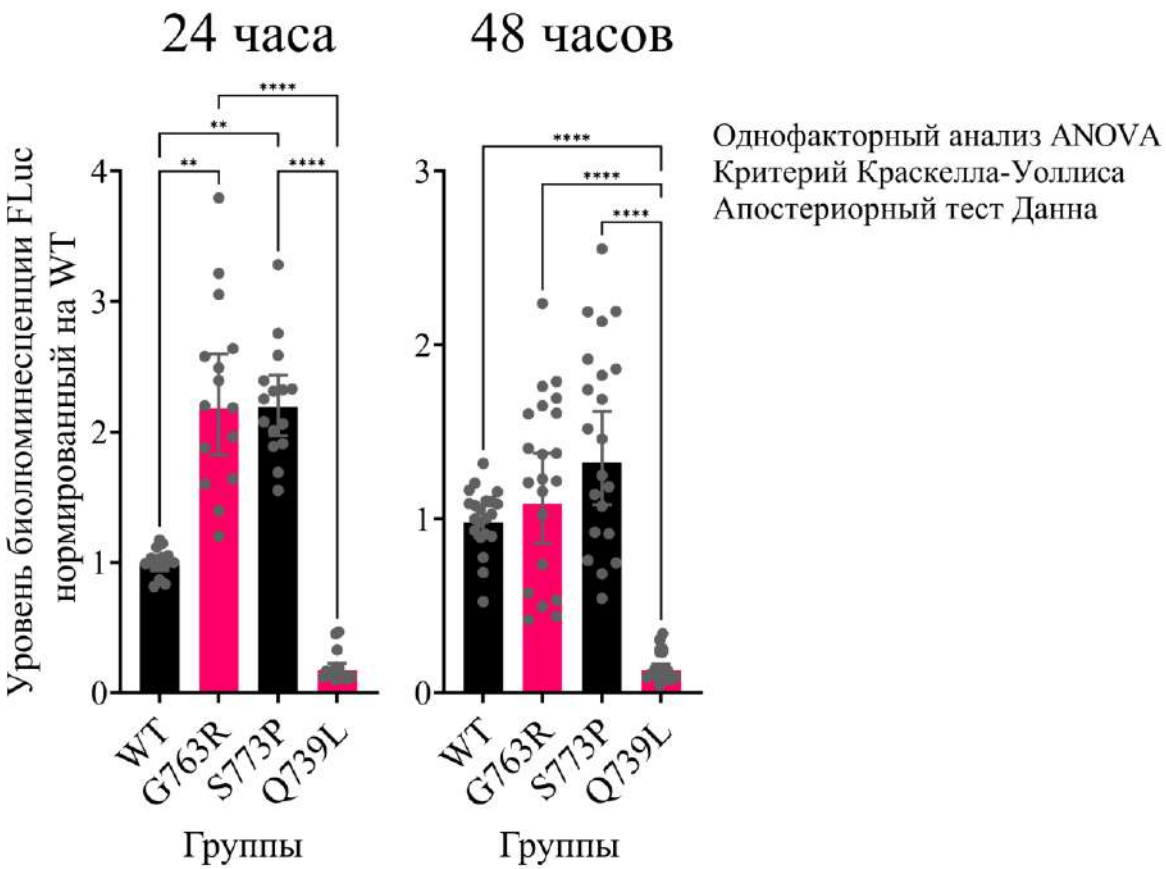


Рисунок 3.8 – Оценка уровня биолюминисценции FLuc через 24 и 48 часов после трансфекции клеточной культуры линии HEK293T вариантами саРНК, кодирующими мутации приводящие к аминокислотным заменам Q739L, G763R и S773P в последовательности белка nsP2. 24 часа: число повторов = 5; 48 часов = 7; ** - *p*-value <0,01; ****- *p*-value <0,0001. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

Чтобы нивелировать эффект влияния эффективности трансфекции мы провели аналогичное исследование вариантов саРНК «G763R» и «S773P» с помощью метода проточной цитометрии с закодированной последовательностью репортера eGFP, исключив «Q739L» по причине негативного влияния на уровень сигнала биолюминесценции FLuc.

3.2.2. Влияние аминокислотных замен G763R и S773P в nsP2 белке саРНК на уровень биосинтеза eGFP

Для исследования характера флуоресценции eGFP через 24 и 48 часов после трансфекции клеточной линии HEK293T вариантами саРНК «WT», «G763R» и «S773P» была проведена проточная цитометрия. Было выявлено, что оба варианта саРНК с мутациями достоверно превосходят саРНК «WT» по значениям медианы флуоресценции выделенной GFP-положительной субпопуляции событий (отличие от контроля по показателю B530-30-A: OE>80) через 24 и 48 часов (G763R: *p*-value <0,0001; S773P: *p*-value <0,0001) (рис. 3.9). Также через 48 часов было обнаружено, что уровень флуоресценции в группе саРНК «S773P» превосходит саРНК «G763R», что может указывать либо на более эффективную репликацию саРНК в клетке, либо на транскрипцию субгеномной РНК (*p*-value <0,0001) (рис. 3.9).

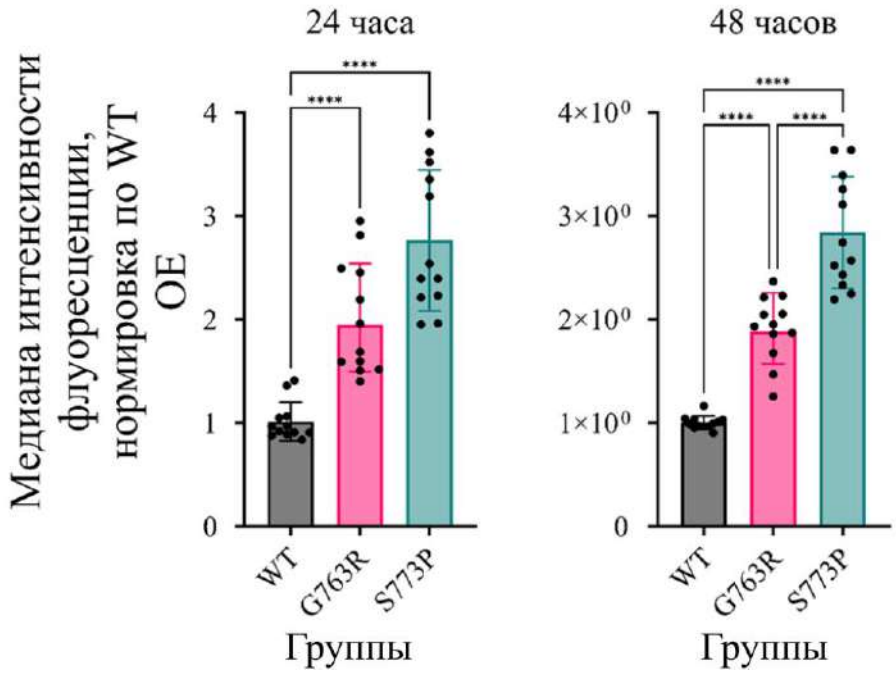


Рисунок 3.9 – Сравнение значений медианы интенсивности флуоресценции eGFP после трансфекции клеток линии HEK293T вариантами саРНК с мутациями, приводящими к аминокислотным заменам G763R и S773P в последовательности белка nsP2. Измерения проводились через 24 и 48 часов после трансфекции методом проточной цитометрии. Критерий Даннетта T3; ** - *p*-value <0,01; ***- *p*-value <0,001; ****- *p*-value <0,0001. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

Для того чтобы оценить динамику изменения флуоресценции eGFP через более длительный промежуток времени были проведены измерения флуоресценции eGFP методом проточной цитометрии через 24, 48, 72, 96, 120 и 168 часов после трансфекции клеточной культуры линии HEK293T вариантами саРНК «G763R», «S773P»и «WT» и мРНК. Как показано на рисунке 3.10 медиана интенсивности флуоресценции клеток линии HEK293T после трансфекции мРНК снижается по строгому степенному закону (*p*-value <0,0001; k = -0,02717) и период, за который происходило двухкратное снижение сигнала флуоресценции ($T_{1/2}$) составил ~ 25,5 часов (Рис 3.10).

С другой стороны, исследуемые и контрольная саРНК не продемонстрировали такой строгой линейной зависимости. В точках 24 и 48 часов наблюдалась динамика роста интенсивности флуоресценции во всех исследуемых группах саРНК (Рис 3.10). Характер распределения интенсивности флуоресценции в отличие от логнормального распределения наблюдаемого на группе мРНК, имел более гетерогенный паттерн. В группе WT медиана флуоресценции снижалась через 48 часов после трансфекции и период $T_{1/2}$ составил ~67,2 часа (*p*-value <0,0001; k = -0,01028) (Рис 3.10). Группа «G763R» продемонстрировала более выраженную популяцию GFP-положительных событий в отличии от группы «WT» и расчётный показатель $T_{1/2}$ был ~ 93,3 часа (*p*-value <0,0001; k = -0,007419). Наиболее выраженная популяция GFP положительных клеток наблюдалась в группе «S773P» и в отличие от групп «WT» и «G763R» медиана интенсивности флуоресценции падала с наименьшей скоростью ($T_{1/2}$ ~ 190 часов; *p*-value <0,01; k = -0,003642).

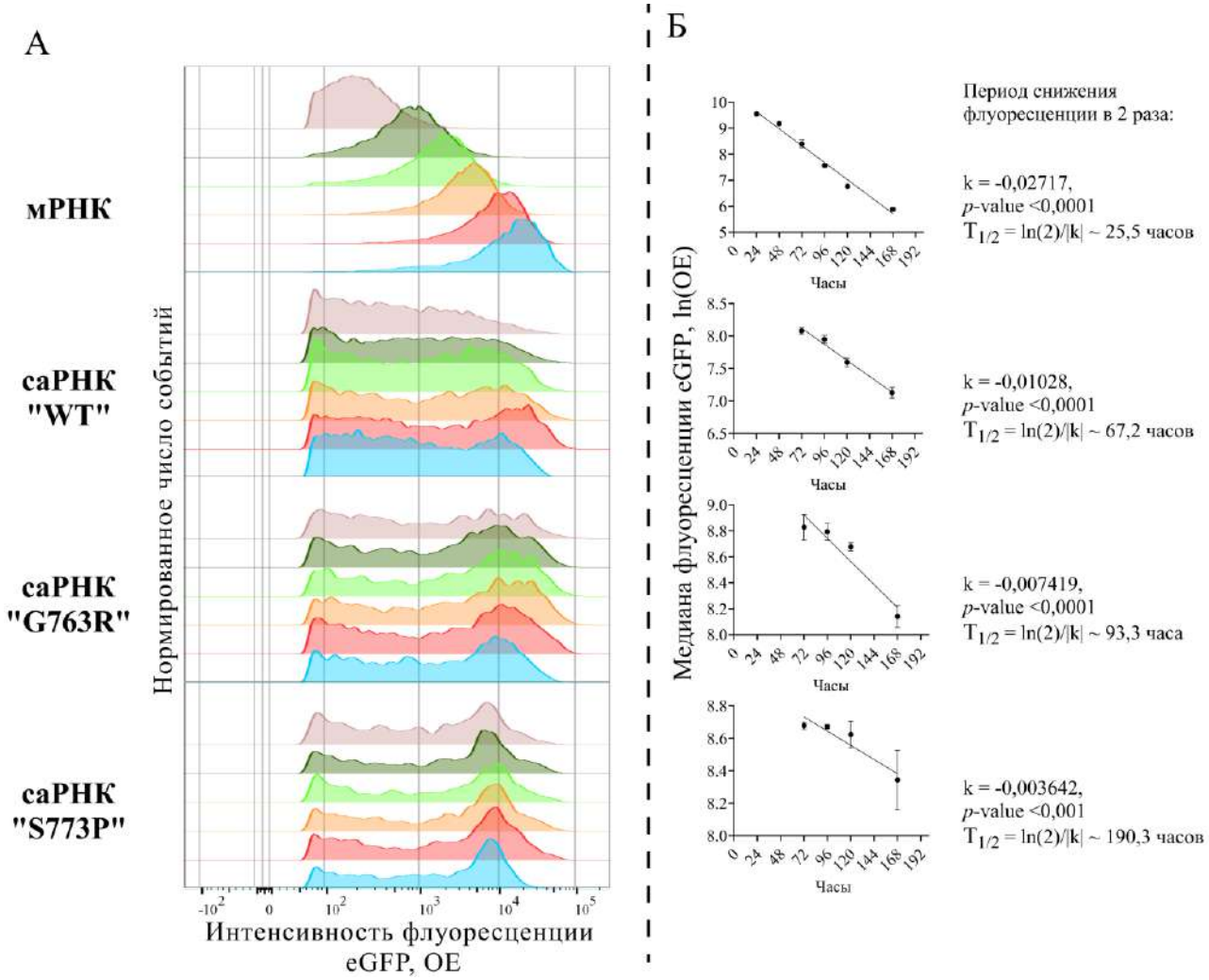


Рисунок 3.10 – Сравнение кинетики уровня флуоресценции eGFP после трансфекции клеток линии HEK293T вариантами саРНК с мутациями, приводящими к аминокислотным заменам G763R и S773P в последовательности белка nsP2. А: гистограммы распределения интенсивности флуоресценции eGFP субпопуляций клеток линии 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.

На рисунке 3.11 показано прямое сравнение паттернов кинетики флуоресцентного сигнала между группами саРНК «WT», «G763R» и «S773P» после трансфекции клеток HEK293T. В группе мРНК наблюдался спад флуоресценции через 48 часов, в то время как медиана флуоресценции всех исследуемых групп саРНК возрастала. Группы саРНК «G763R» и «S773P» проявили идентичную динамику изменения флуоресцентного сигнала (Критерий Даннетта Т3; *p*-value

>0,05), где лишь во временной точке 48 часов наблюдалось значимое различие (*p*-value <0,05). Группы «G763R» и «S773P», как и ожидалось, имели повышенный уровень флуоресценции во всех временных точках по сравнению с «WT» (*p*-value <0,05).

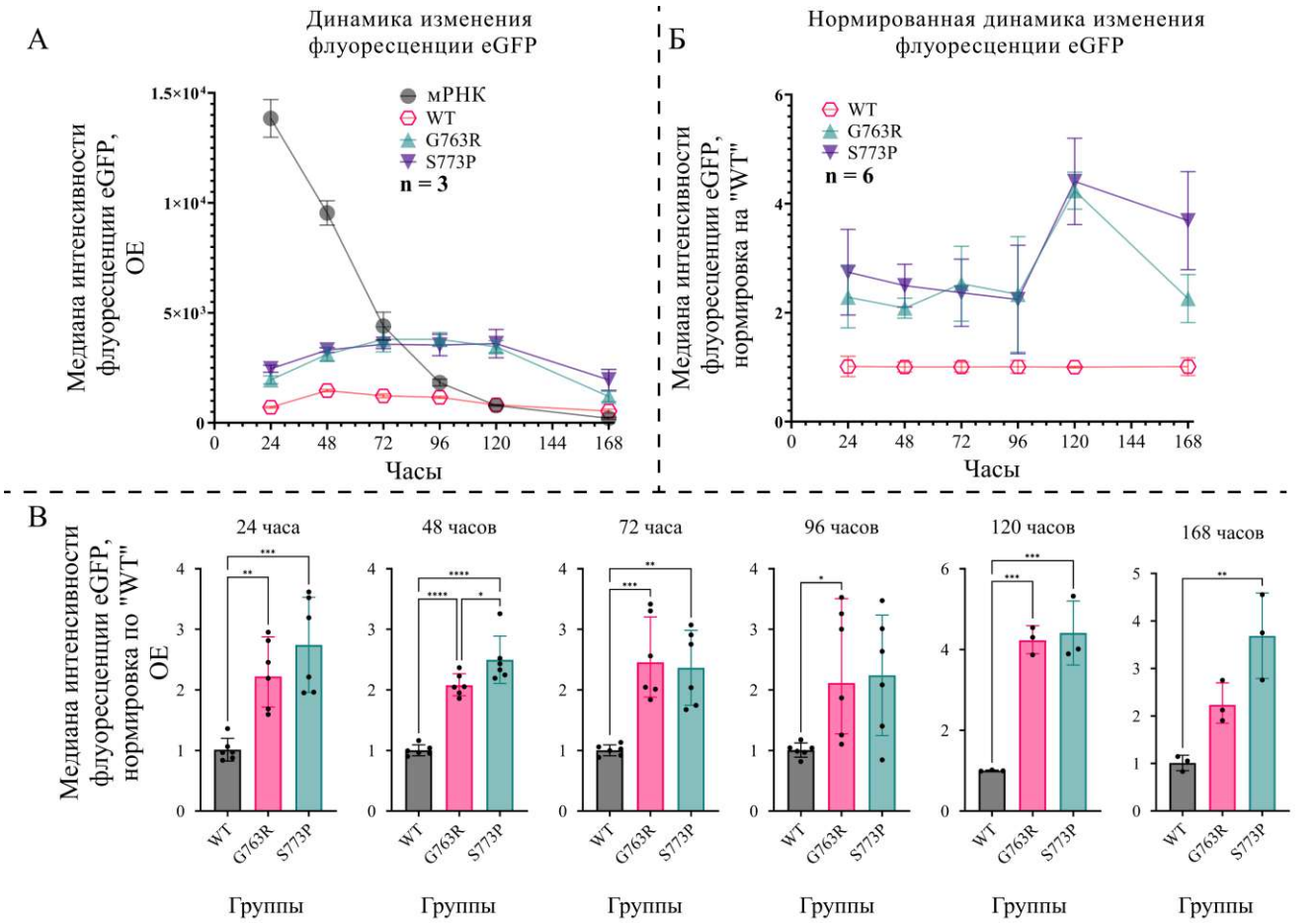


Рисунок 3.11 – Влияние аминокислотных замен G763R и S773P в nsP2 белке на уровень биосинтеза eGFP после трансфекции клеток HEK293T саРНК. А: Динамика изменения значений медианы интенсивности флуоресценции субпопуляций GFP-положительных событий. Б: динамика изменения флуоресцентного сигнала eGFP в группах «G763R», «S773P» относительно уровня флуоресценции в группе «WT» в соответствующей временной точке. В: 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.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1) Самоамплифицирующаяся РНК, имеющая мутацию, приводящую к аминокислотной замене Q739L в неструктурном белке nsP2, имеет сниженный уровень биосинтеза репортерного белка. Данный вариант саРНК был исключен из дальнейшего исследования.

2) Варианты саРНК «G763R» и «S773P» приводят к повышению уровня репортерного белка по сравнению с саРНК «WT», вариант саРНК «S773P» обеспечивает наиболее стабильную экспрессию репортерного белка и имеет высокий показатель $T_{1/2}$.

Помимо мутаций, приводящих к аминокислотным заменам в nsP2 белке, было также проведено исследования влияния мутаций, приводящих к аминокислотным заменам Q48P, I113F и L121P в последовательности белка nsP3. В связи с негативным влиянием на уровень репортерного белка данные варианты были исключены из дальнейших исследований (Рисунок 3.12.)

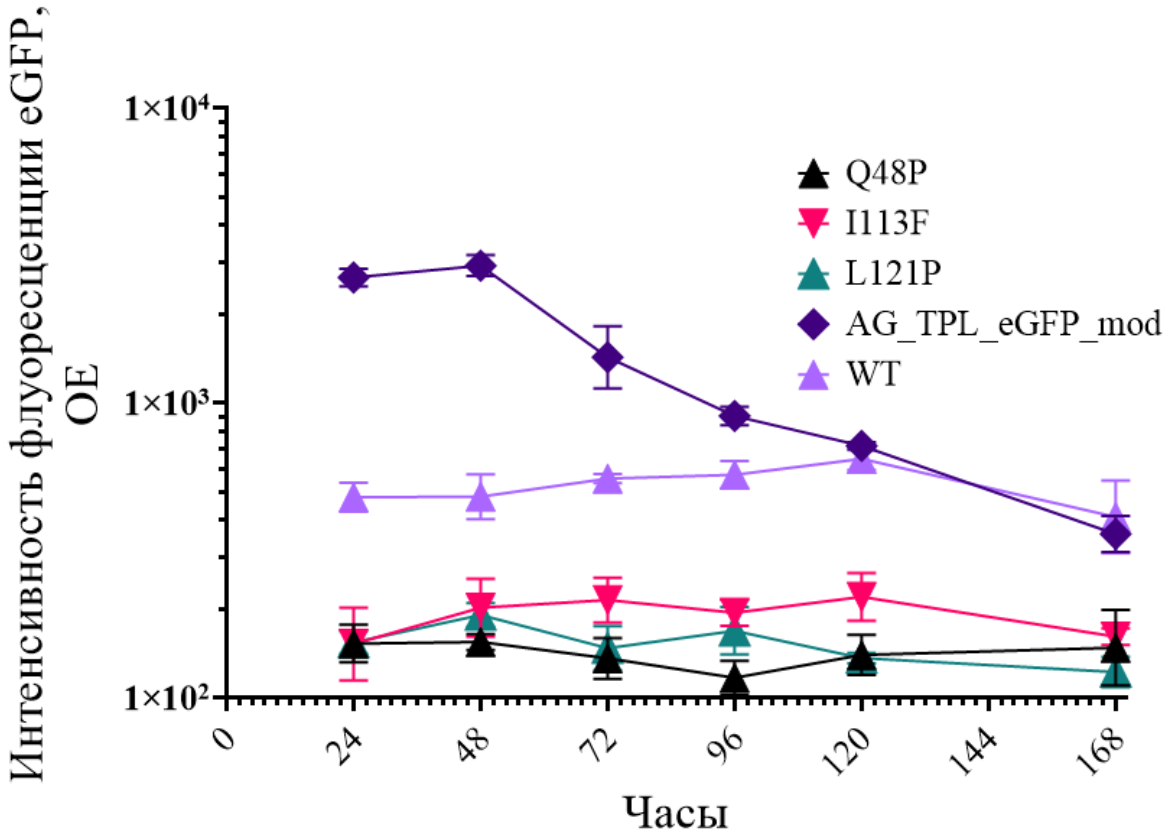


Рисунок 3.12 - Динамика изменения флуоресцентного сигнала eGFP во времени после трансфекции клеток линии HEK293T вариантами саРНК «Q48P», «I113F», «L121P», «WT» и мРНК. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

3.2.3. Уровень репликации саРНК с мутациями в последовательности гена, кодирующего неструктурный белок nsP2

Для того чтобы выяснить как соотносятся данные флуоресценции репортерного белка с количеством копий субгеномной и антисмысловой/смысловой геномных РНК в процессе биогенеза саРНК был проведен анализ с помощью метода qPCR.

На рисунке 3.13 отражены результаты анализа соотношения форм саРНК. Во всех исследуемых группах во временной точке 24 часа обнаружено повышенное содержание молекул субгеномной РНК по отношению к геномной смысловой и антисмысловой РНК (~20-80 раз). В группе сравнения трансфицированной саРНК «S773P» соотношение числа копий субгеномной РНК к геномным формам смысловой и антисмысловой цепей РНК было повышено по сравнению с группами «WT» и «G763R» (Критерий Даннетта T3; *p*-value <0,01), что соотносится с данными интенсивности флуоресценции.

Через 48 часов, как указано на рисунке 3.13, хотя разница в соотношениях форм РНК между группами снизилась, группы «G763R» и «S773P» имеют повышенное содержание субгеномной РНК по отношению к смысловой и антисмысловой цепям в отличие от группы «WT» (Критерий Даннетта T3; G763R: *p*-value <0,001; S773P: *p*-value <0,05).

В целом полученные данные свидетельствуют о благоприятном влиянии мутации саРНК, приводящей к аминокислотной замене S773P в последовательности белка nsP2 на синтез субгеномной РНК.

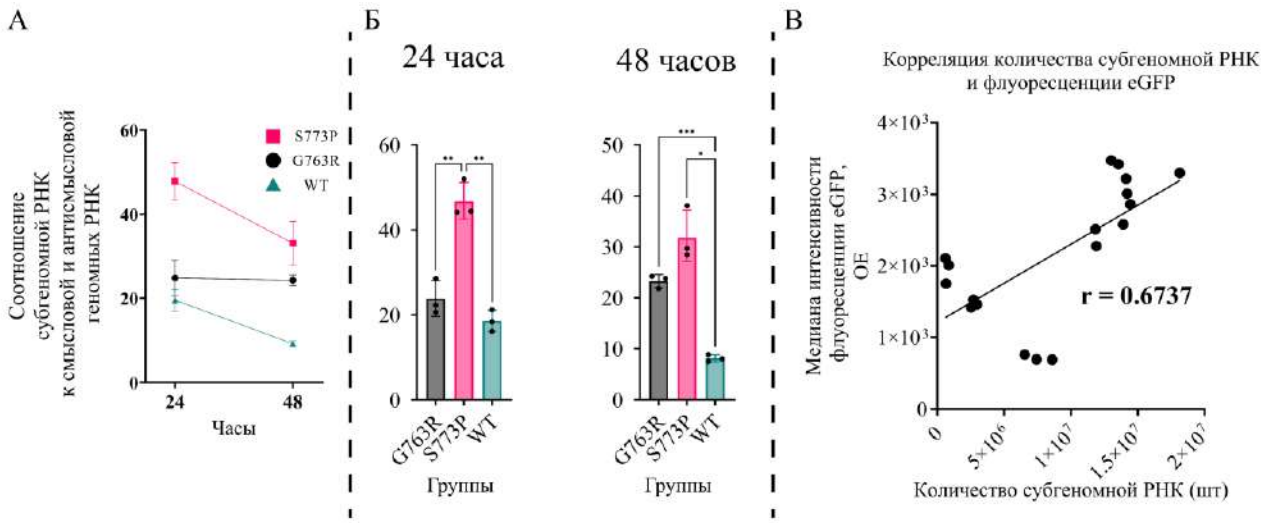


Рисунок 3.13 – Сравнение соотношений форм саРНК по абсолютному числу копий после трансфекции клеток линии HEK293T вариантами саРНК «WT», «G763R» и «S773P». А: динамика изменения соотношения числа копий

(субгеномная РНК/(смысловая+антисмысловая геномная РНК) через 24 и 48 часов. Б: диаграммы соотношения числа копий (субгеномная РНК/(смысловая+антисмысловая геномная РНК) через 24 и 48 часов. Критерий Даннетта Т3; * - *p*-value <0,05; ** - *p*-value <0,01; *** - *p*-value <0,001. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. В: Корреляционная кривая интенсивности флуоресценции eGFP и количества субгеномной РНК, где r – коэффициент Пирсона.

3.2.4. Индукция врожденного иммунного ответа в ответ на доставку саРНК с мутациями в nsP2 белке

Для того чтобы оценить индукцию врожденного иммунного ответа был проведен qPCR анализ на транскрипты генов, кодирующих RIG-I, MDA5, IFIT1 и TNFa. Регистрация уровня экспрессии таких интерферон-стимулируемых генов *RIGI*, *MDA5*, *IFIT1*, а также провоспалительного гена *TNF* дает информацию о возможной реактогенности саРНК, а также вероятных причинах снижения эффективности трансляции целевого белка закодированного в последовательность саРНК. Через 24 часа после трансфекции клеток HEK293T в группе «S773P» наблюдалось достоверное повышение уровня экспрессии *MDA5* (в ~16 раз), *IFIT1* (в ~2,6 раз) и *RIG1* (в ~5 раз) (критерий Данна; *p*-value <0,001) по сравнению с контролем (Рисунок 3.14). В группе «G763R» наблюдалось умеренное повышение мРНК транскриптов *MDA5* (в <10 раз; *p*-value <0,01) и *RIGI* (в ~3 раза; *p*-value <0,01) (Рисунок 3.14). В группе «WT» не было выявлено различий с контрольной группой (Рисунок 3.14).

Через 48 часов после трансфекции в группе «S773P» по-прежнему был достоверно повышен уровень транскрипции мРНК *MDA5* (в ~20 раз), *IFIT1* (в ~15раз) и *RIG1* (в ~5 раз) (критерий Данна; *p*-value <0,001), а также в группе «WT» наблюдалось повышение уровня мРНК *IFIT1* в ~10 раз (критерий Данна; *p*-value <0,05) (Рисунок 3.14). Повышение экспрессии генов *RIGI*, *MDA5*, *IFIT1* не было обнаружено в группе «G763R». Во всех группах РНК через 24 и 48 часов не было

обнаружено значимого повышения экспрессии *TNF*. Таким образом, вариант саРНК «S773P», вероятно, вызывает повышенный интерфероновый ответ, который может приводить к снижению эффективности уровня биосинтеза целевого белка.

При рассмотрении динамики экспрессии генов *RIGI, MDA-5* и *IFIT1* через 1, 2, 3, 4, 5 часов после трансфекции вариантами саРНК в группе «WT» было обнаружено кратковременное повышение уровня экспрессии гена *IFIT1*, достигавшее максимума через 3 часа после трансфекции (Рисунок 3.14). В последующие временные точки уровень экспрессии *IFIT1* снижался и достигал минимального значения через 24 часа, после чего вновь повышался к 48 часам после трансфекции. В группе «S773P» наблюдалась схожая динамика экспрессии гена *IFIT1*. В течение первых 5 часов после трансфекции отмечалось повышение уровня экспрессии *IFIT1*, достигавшее максимума через 5 часов, после чего уровень экспрессии снижался и достигал минимального значения через 24 часа. К 48 часам после трансфекции, аналогично группе «WT», наблюдалось повторное повышение уровня экспрессии *IFIT1*. Таким образом, хотя в обеих группах наблюдалось раннее кратковременное повышение уровня экспрессии *IFIT1*, вероятно связанное с начальной стадией синтеза антисмысловой геномной РНК, в группе «S773P» повышение экспрессии сохранялось в течение более продолжительного периода, что может указывать на более длительное присутствие или образование репликационных промежуточных продуктов саРНК.

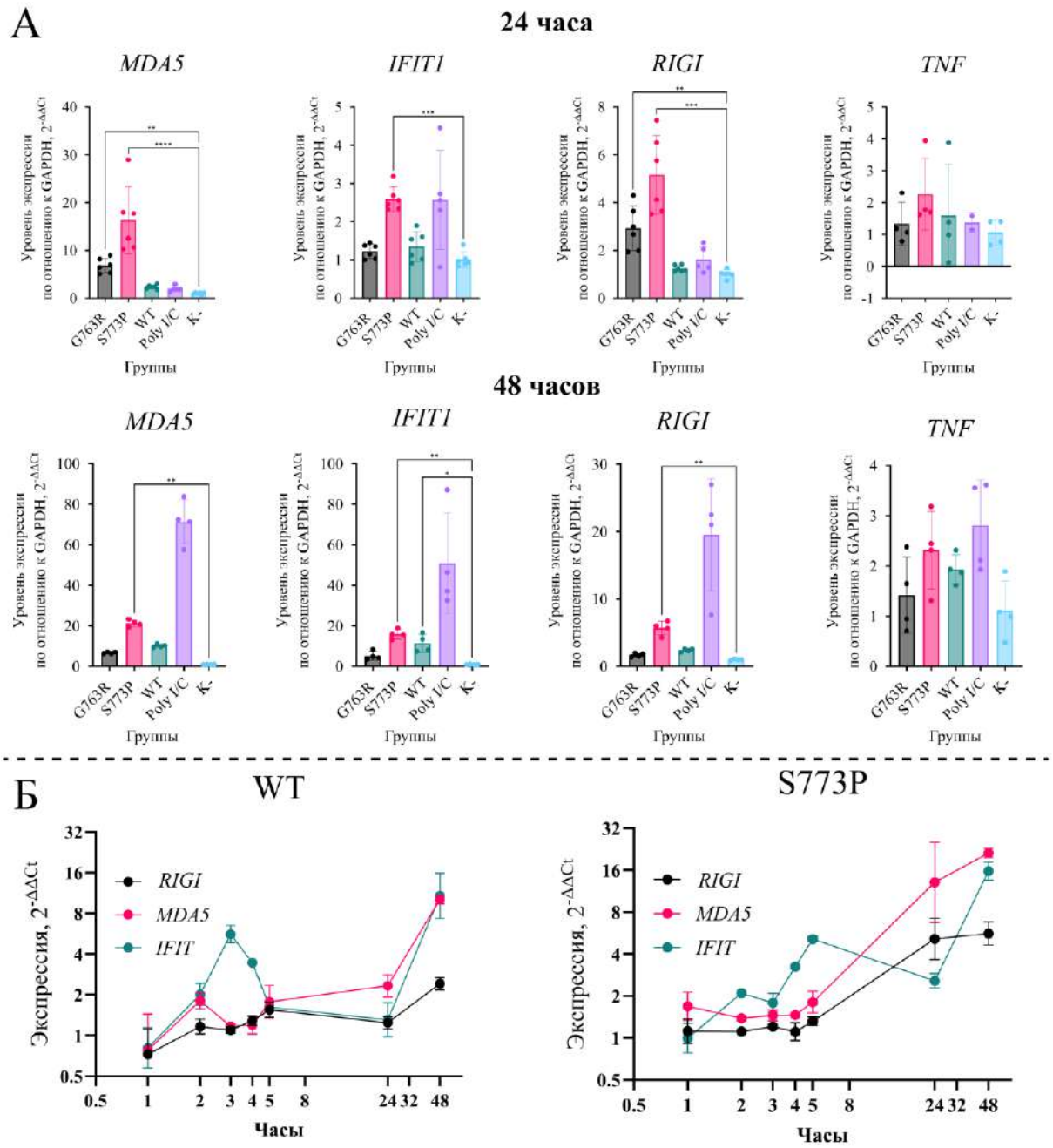


Рисунок 3.14 – Экспрессия *IFIT1*, *MDA5*, *RIGI* и *TNF* после трансфекции клеток различными вариантами саРНК. А: диаграммы, отражающие уровень экспрессии генов врожденного иммунного ответа через 24 и 48 часов после трансфекции вариантами саРНК «WT», «G763R» и «S773P», поли-I/C. K- группа интактных 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.

3.3. Исследование влияния ингибиторов врожденного иммунного ответа на биогенез саРНК и уровень биосинтеза репортерного белка

В связи с повышенной индукцией врожденного иммунного ответа в ответ на биогенез саРНК «S773P» была проведена оценка влияния ингибиторов врожденного иммунного ответа NS1 вируса гриппа А и p4a вируса ближневосточного респираторного синдрома. Для этой цели были созданы варианты саРНК «S773P» кодирующие репортерный белок eGFP вместе с ингибиторами врожденного иммунного ответа NS1 или p4a. Далее группы сравнения и варианты саРНК содержащие вышеуказанные последовательности ингибиторов врожденного иммунного ответа будут называться как «NS1» и «ORF4a» соответственно.

3.3.1. Влияние ингибиторов врожденного иммунного ответа NS1 и p4a на уровень биосинтеза eGFP

Для оценки уровня экспресси репортерного белка клетки линии HEK293T были трансфицированы вариантами саРНК с мутацией S773P и кодирующие ингибиторы врожденного иммунного ответа p4a или NS1 (названия групп «ORF4a» и «NS1» соответственно), а также саРНК «S773P», «WT» и «мРНК». Измерение уровня флуоресценции клеточных популяций осуществляли с помощью проточной цитометрии через 24, 48, 72, 96, 120 и 168 часов.

В группах клеток трансфицированных саРНК «NS1» и «ORF4a» до временной точки 120 часов увеличение среднего геометрического сигнала флуоресценции eGFP (Рисунок 3.15). При этом, как и в предыдущих экспериментах, наблюдалась тенденция к снижению сигнала флуоресценции клеток трансфицированных мРНК и к временной точке 72 часа значимых различий

не было обнаружено. В точке t = 96 часов группы «NS1», «ORF4a» и «S773P» достоверно превышали группу «мРНК» по показателю среднегеометрического значения флуоресценции eGFP (Критерий Даннетта Т3; «NS1»: *p*-value <0,05; «ORF4a»: *p*-value <0,001; «S773P» *p*-value <0,05). В точках t = 120 часов и t = 168 часов различие значимо нарастало, как показано на рисунке 3.15.

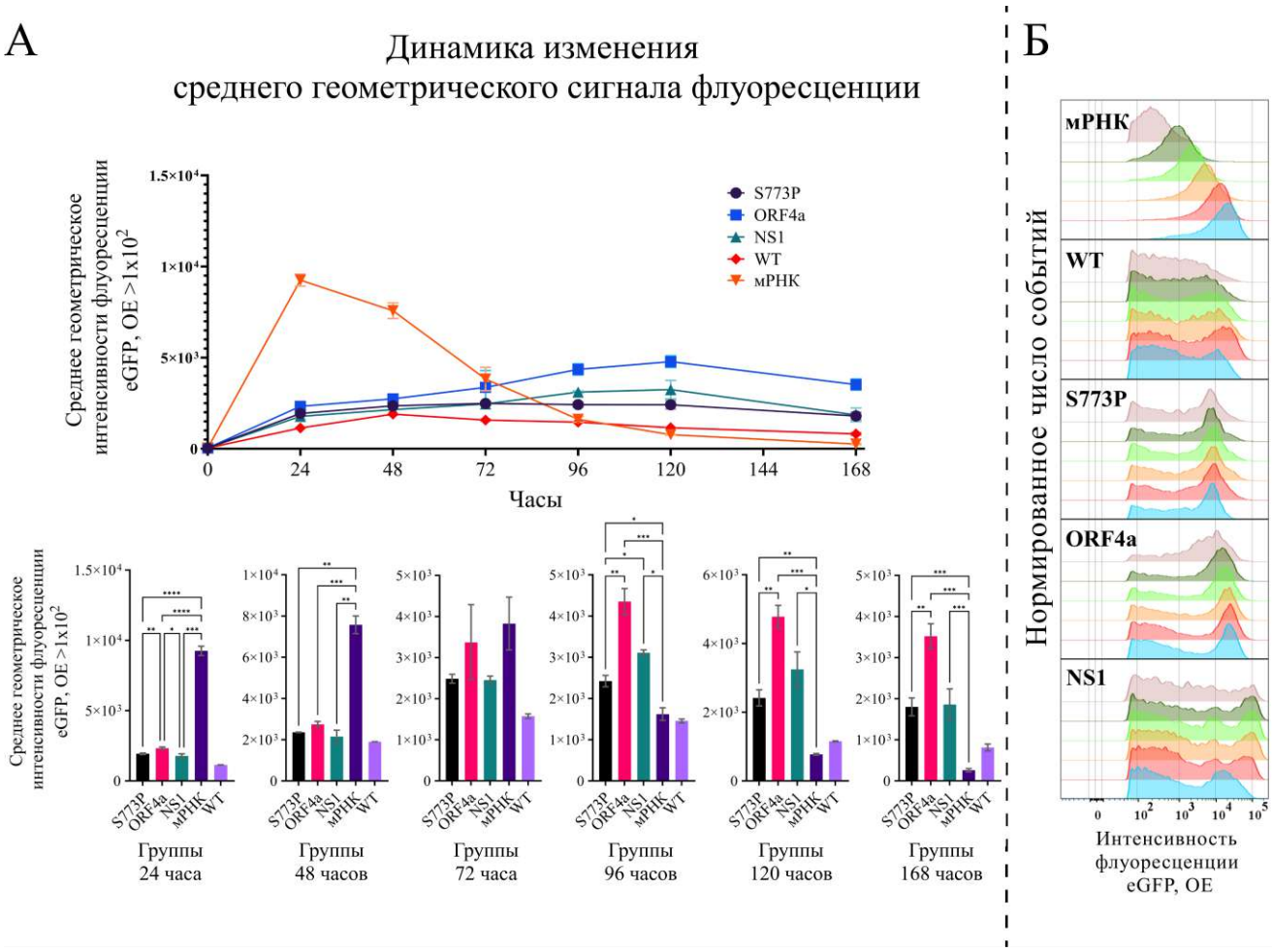


Рисунок 3.15 – Динамика изменения уровня eGFP после трансфекции клеток HEK293T саРНК с включением последовательностей ингибиторов врожденного иммунного ответа NS1 и p4a. А: динамика изменения среднего геометрического значения интенсивности флуоресценции субпопуляций GFP-положительных событий, превышающих пороговое значение интенсивности флуоресценции $1x10^2$ OE. 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.

При сравнении среднегеометрического значения сигнала флуоресценции eGFP вариантов саРНК «NS1», «ORF4a» и «S773P» было установлено, что во временных точках 24, 96, 120 и 168 часов наблюдались достоверные различия между группами «ORF4a» и «S773P» (Критерий Даннетта Т3; 24 часа: *p*-value <0,01; 96 часов: *p*-value <0,01; 120 часов: *p*-value <0,01; 168 часов: *p*-value <0,01) (Рисунок 3.15). Во всех указанных выше моментах времени, «ORF4a» имела повышенный сигнал флуоресценции. В группе «NS1» через 24 часа наблюдался более низкий уровень флуоресценции по сравнению с группой «ORF4a» (Критерий Даннетта Т3; *p*-value <0,05) и лишь в точке 96 часов среднегеометрические значения флуоресценции в группе NS1 были выше, чем в контрольной группе «S773P» (Критерий Даннетта Т3; *p*-value <0,05) (Рисунок 3.15). Эти данныемогут свидетельствовать о положительных эффектах применения ингибитора ORF4a на уровень биосинтеза целевого белка. Однако, как показано на рисунке 3.15 распределение GFP положительных событий по уровню флуоресценции в группах «ORF4a» и «NS1» существенно различается. В группе «ORF4a» гистограмма имеет сходство с логнормальным распределением, в то время как группа «NS1» демонстрирует моно- би- и тримодальное распределение. Также в группе «NS1» наблюдается популяция событий, имеющих уровень сигнала флуоресценции больше, чем 1×10^5 ОЕ.

Для того чтобы оценить влияние способа доставки закодированных ингибиторов врожденного иммунного ответа в последовательности РНК мы трансфицировали кльтуру клеток линии HEK293T вариантами саРНК «S773P» и «ORF4a», а также саРНК «S773P» вместе с мРНК, кодирующей белок p4a (Рисунок 3.16). Через 24 часа после трансфекции было обнаружено, что как при использовании саРНК, так и при котрансфекционной доставке мРНК кодирующих белок p4a наблюдалось значимое повышение медианы флуоресценции белка eGFP

по сравнению с контрольной группой «S773P» (Тест Тьюки; *p*-value <0.01). С другой стороны, наблюдалась сниженная жизнеспособность клеток HEK293T по сравнению с контрольной группой (Критерий Даннетта T3; «саРНК(S773P) + мРНК(ORF4a)» - *p*-value < 0.01; «ORF4a» - *p*-value < 0.05). Через 48 часов после трансфекции значения медианы флуоресценции в группе «ORF4a» превышало значения в группах «S773P» и «саРНК(S773P) + мРНК(ORF4a)» (Тест Тьюки; S773P: *p*-value < 0.01; «саРНК(S773P) + мРНК(ORF4a)»: *p*-value < 0.05), при этом достоверные различия в жизнеспособности клеток наблюдались только между группами «ORF4a» и «саРНК(S773P) + мРНК(ORF4a)» (Критерий Даннетта T3; *p*-value < 0.05). Исходя из этих данных можно заключить, что использование мРНК для доставки ингибитора врожденного иммунного ответа p4a, оказывает короткий эффект, который постепенно нивелируется к 48 часам.

В целом, полученные данные, с одной стороны, отражают, что ингибитор врожденного иммунного ответа p4a вируса ближневосточного респираторного синдрома повышает уровень биосинтеза флуоресцентного белка eGFP, который проявляется в виде близкого к логнормальному распределению паттерну флуоресценции, являясь более предпочтительным по сравнению с ингибитором врожденного иммунного ответа NS1. С другой стороны, хотя среднее геометрическое значение сигнала флуоресценции в группе «NS1» достоверно ниже по сравнению с группой «ORF4a», при визуальной оценке событий на гистограммах распределения событий с высокой интенсивностью флуоресцентного сигнала, превышающего 3×10^3 оптических единиц, группа «NS1» продемонстрировала наиболее высокий уровень сигнала флуоресценции, который усиливался до 120 часов после трансфекции.

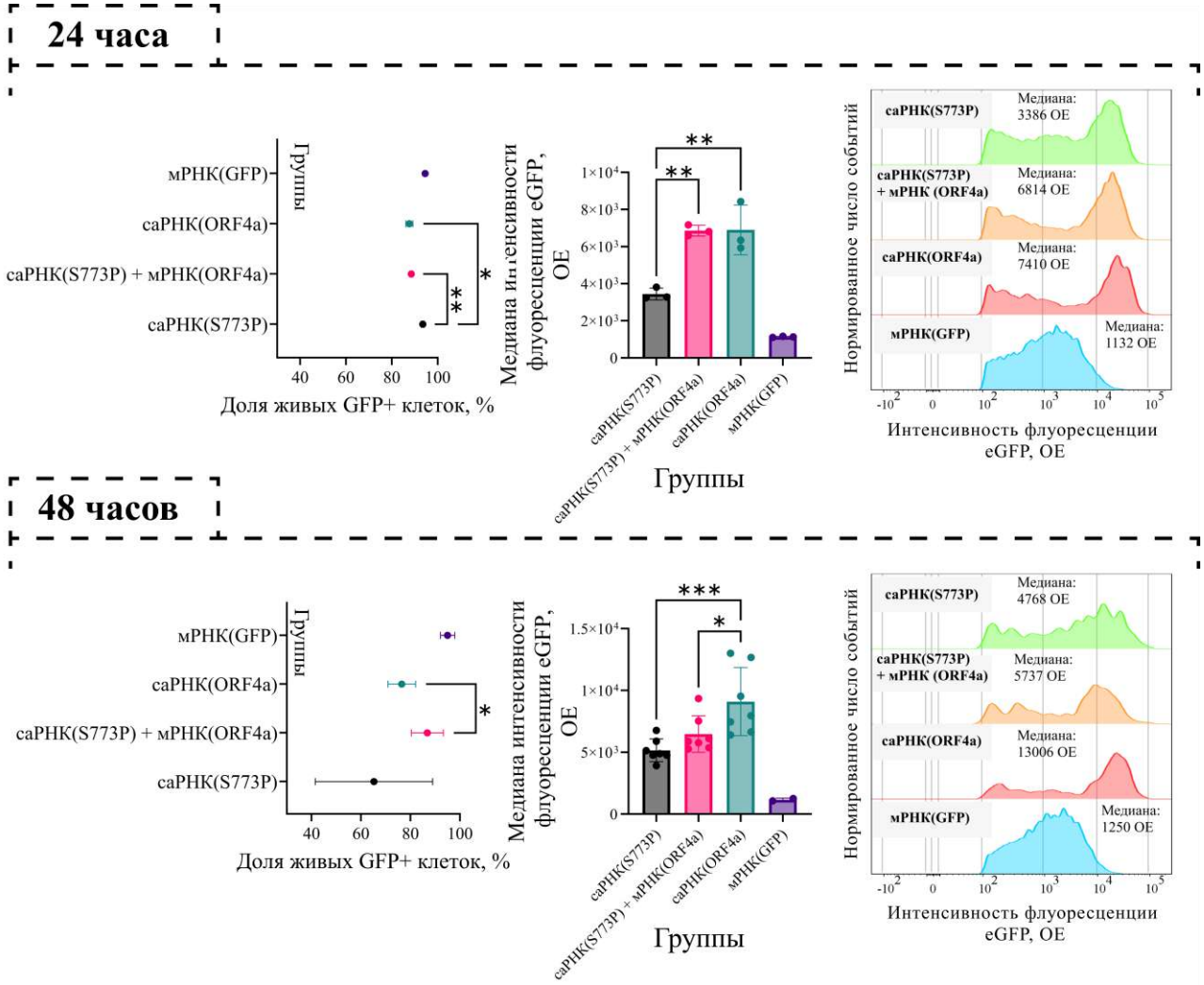


Рисунок 3.16 – Влияние ингибитора врожденного ответа p4a, доставляемого в формате мРНК и саРНК, на выживаемость клеток и интенсивность флуоресценции репортерного белка через 24 и 48 часов после трансфекции клеток линии HEK293T. В условиях котрансфекции использовали мРНК, кодирующую ингибитор врожденного ответа p4a. Для оценки достоверности результатов сравнения использовались критерии: Критерий Даннетта Т3 (выживаемость) и Тьюки (интенсивность флуоресценции репортерного белка); * - *p*-value <0.05; ** - *p*-value <0.01; *** - *p*-value <0.001. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

3.3.2. Влияние индукции врожденного иммунного ответа на биогенез саРНК с ингибиторами врожденного иммунного ответа

Для того чтобы выяснить как ингибиторы врожденного ответа влияют на индукцию экспрессии генов врожденного иммунного ответа, был выполнен анализ с помощью метода qPCR клеток HEK293T через 24 часа после трансфекции. Мы наблюдали высокую вариабельность в экспрессии генов врожденного ответа, однако, нами было обнаружено достоверное снижение экспрессии *MDA5* в группе «ORF4a» при сравнении с группами «S773P» (*p*-value <0,01) и «NS1» (*p*-value <0,05). Также в группе «ORF4a» наблюдался сниженный уровень экспрессии *IFIT1* по сравнению с группами «S773P» (*p*-value <0,05) и «NS1» (*p*-value <0,05) (Рисунок 3.17).

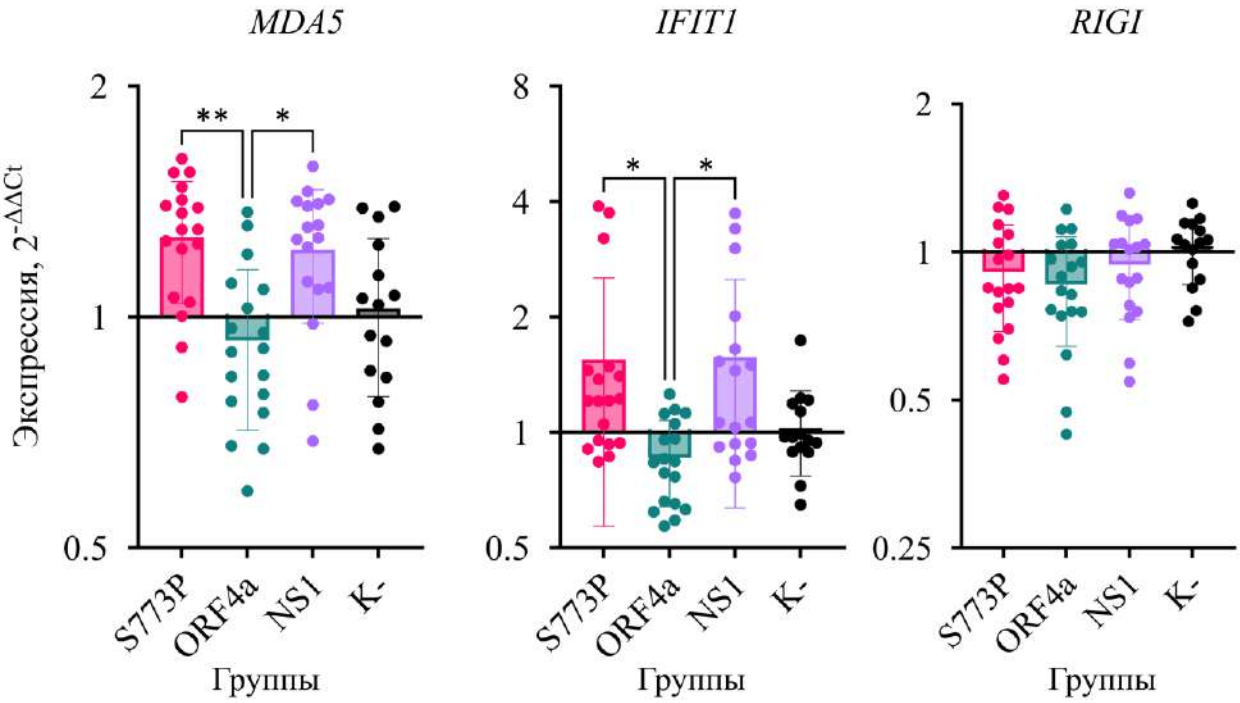


Рисунок 3.17 – Относительная экспрессия генов *MDA5*, *RIGI* и *IFIT1* через 24 часа после трансфекции клеток линии HEK293T вариантами саРНК «S773P», «ORF4a» и «NS1». Регистрация данных проводилась методом количественной ПЦР. Критерий Данна; * - *p*-value <0,05; ** - *p*-value <0,01; **** - *p*-value <0,0001. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

Эти данные могут указывать на подавление врожденного иммунного ответа посредством белка p4a. Как известно белок p4a маскирует дцРНК от внутриклеточных рецепторов врожденного иммунного ответа, а также блокирует активацию PKR, что выключает механизм фосфорилирования eIF4a. Блокирование сигналлинга приводит к снижению индукции транскрипции интерферон-стимулированных генов [185]. В данном случае наши результаты могут косвенно свидетельствовать о возможной секвестрации белком p4a дцРНК, что снижает активацию врожденного иммунного ответа.

3.3.3. Влияние ингибиторов врожденного иммунного ответа на уровень репликации саРНК

Для того чтобы оценить влияние кодирующих ингибиторов врожденного иммунного ответа последовательностей на уровень репликации саРНК был проведен анализ методом qPCR через 24 часа после трансфекции. Был выявлен аналогичный паттерн в соотношениях форм РНК как было показано в исследовании биогенеза саРНК, содержащей различные мутации. Группы «ORF4a» и «S773P» не имели достоверных различий в соотношениях между количеством копий субгеномной РНК к смысловой РНК и антисмысловой РНК, при этом в этих группах имелось сходное повышение доли субгеномной РНК относительно группы «WT» (Критерий Даннетта T3; «ORF4a»: *p*-value <0,05; «S773P»: *p*-value <0,01). Однако, как видно из рисунка 3.18 в группе «NS1» наблюдается отсутствие значимых различий в соотношении форм саРНК с группой «WT», что косвенно может указывать на снижение эффективности образования субгеномной РНК из-за воздействия белка NS1 на клетку. Как известно белок NS1 блокирует полиаденилирование клеточных мРНК, нарушая ядерно-цитоплазматический транспорт за счет секвестрации белка CPSF30, а также напрямую взаимодействует с факторами трансляции, что вызывает избирательную остановку данного процесса

[186]. Таким образом, вероятно, снижение эффективности образования субгеномной РНК может быть связано с воздействием на метаболические процессы в части клеток, что проявляется в мультимодальности и неравномерности распределения GFP положительных событий.

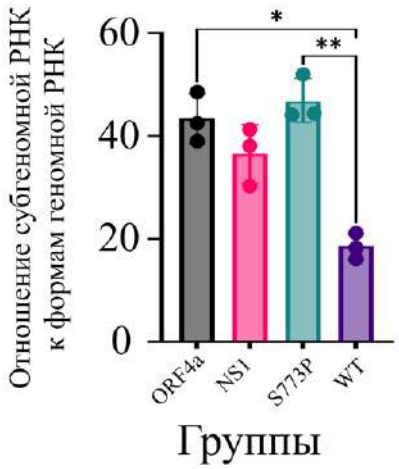


Рисунок 3.18 – Сравнение соотношений форм субгеномная РНК/(смысловая и антисмысловая) геномная РНК по абсолютному числу копий. Критерий Даннетта Т3; *- *p*-value <0,05; *- *p*-value <0,01. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

В целом белки p4a и NS1 действуя по совершенно разным механизмам повышают экспрессию белка eGFP, при этом белок p4a приводит к стабильному урвню биосинтеза репортерного белка, снижает индукцию транскрипции генов врожденного иммунного ответа и не влияет на биогенез форм саРНК. Напротив, белок NS1, хотя и повышает уровень репортерного белка, но его эффект имеет стохастический характер, что является нежелательным для дальнейшей разработки препаратов на основе саРНК.

3.4. Исследование влияния синтетического 5’НТО в области субгеномного промотора на биогенез саРНК и уровень биосинтеза репортерного белка

В связи с необходимостью повышения эффективности трансляции субгеномной РНК была проведена оценка влияния замены нативного 5’НТО после субгеномного промотора на синтетический аналог. Для этой цели был создан вариант саРНК «S773P» с синтетическим НТО («Synt1»).

3.4.1. Влияние синтетического НТО на уровень биосинтеза eGFP

Для оценки уровня биосинтеза репортерного белка культура клеток линии HEK293T была трансфицирована вариантом саРНК «Synt1», а также контрольными саРНК «S773P» и «мРНК». Измерение уровня флуоресценции клеточных популяций осуществляли с помощью проточной цитометрии через 24, 48, 72, 96, 120 и 168 часов.

В группе клеток, трансфицированных саРНК «Synt1», наблюдалась выраженная динамика накопления сигнала флуоресценции eGFP, качественно отличающаяся от контрольных групп (Рисунок 3.19). Как и в предыдущих экспериментах, в группе «мРНК» наблюдалась тенденция к снижению сигнала флуоресценции после 24 часов, и к временной точке 96 часов значимых различий с группами саРНК не обнаруживалось. Группа «S773P» демонстрировала стабильный уровень экспрессии на протяжении всего периода наблюдения.

При сравнении группы «Synt1» с контрольной группой «S773P» по показателю среднегеометрического значения сигнала флуоресценции eGFP было установлено, что во всех временных точках наблюдались достоверные различия между группами (Критерий Даннетта T3; 24 часа: p-value <0,05; 48 часов: p-value <0,05; 72 часа: p-value <0,01; 96 часов: p-value <0,05; 120 часов: p-value <0,01; 168

часов: *p*-value <0,05) (Рисунок 3.19). Во всех указанных моментах времени группа «Synt1» имела повышенный сигнал флуоресценции, достигая пиковых значений (~4×10³ ОЕ) на 96–120 часах, что почти в 2 раза превышает показатели группы «S773P».

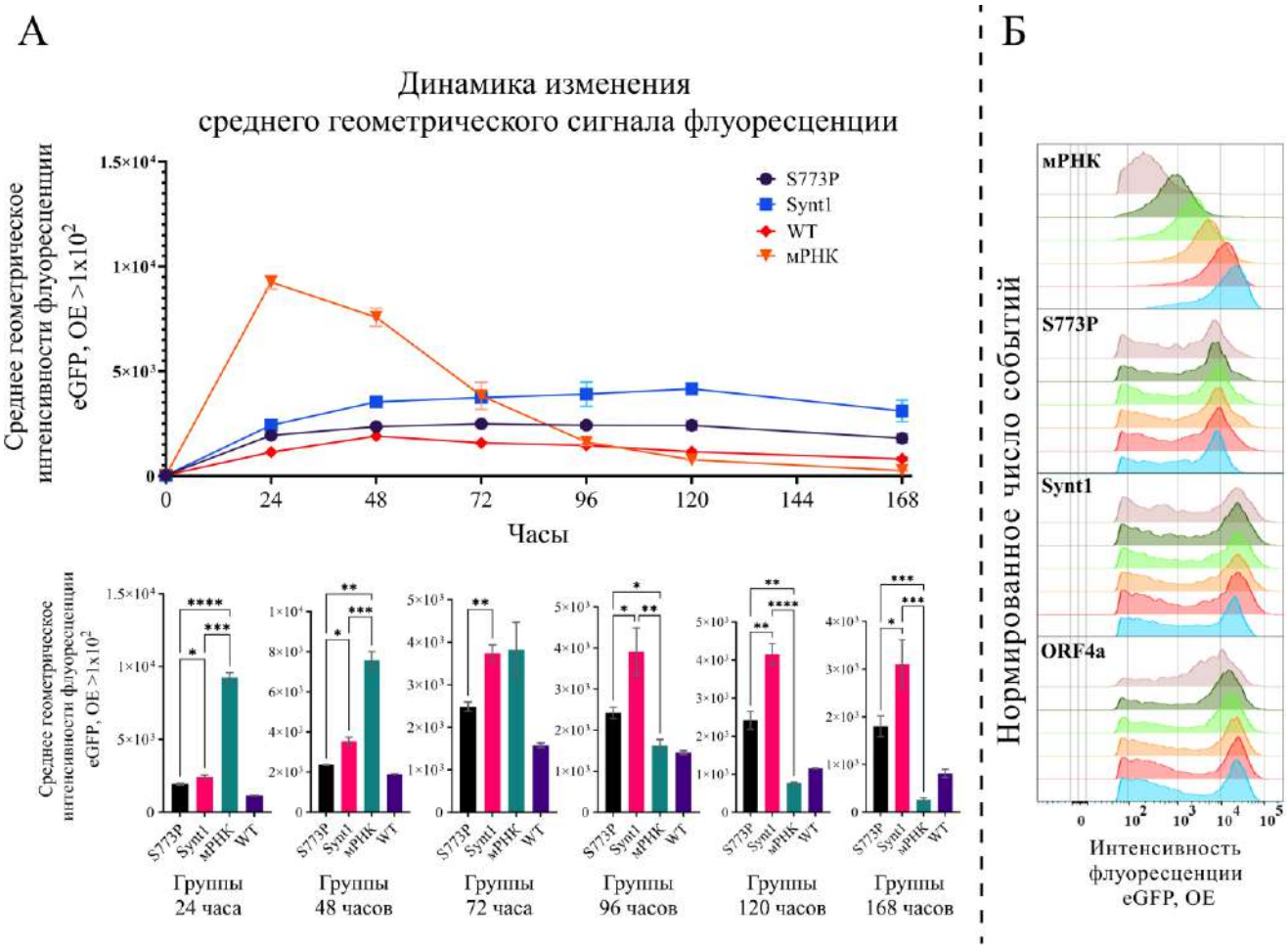


Рисунок 3.19 – Влияние включения синтетической последовательности 5’ НТО на уровень биосинтеза eGFP в различных временных точках. А: динамика изменения среднего геометрического значения интенсивности флуоресценции субпопуляций GFP-положительных событий, превышающих пороговое значение интенсивности флуоресценции 1x10^2 ОЕ. 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.

Как показано на рисунке 3.19Б, распределение GFP положительных событий по уровню флуоресценции в группах «Synt1» и «S773P» существенно различается на поздних временных точках измерений В группе «Synt1» к 24-48 часам формируется выраженный сдвиг всей популяции клеток в область высокой флуоресценции (10^4 ОЕ и выше), который сохраняется вплоть до 168 часа. В то же время, группа «S773P» характеризуется более узким распределением с максимумом в области средних значений (~1×10^3 ОЕ), что соответствует более низкому среднегеометрическому показателю.

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что замена нативного 5’НТО на синтетический «Synt1» является эффективной стратегией для пролонгации и усиления уровня биосинтеза целевого белка. Синтетический НТО обеспечивает стабильно высокий уровень трансляции субгеномной РНК на протяжении 7 дней.

Анализ среднего геометрического значения флуоресценции подтверждает, что повышение уровня экспрессии в группе «Synt1» обусловлено увеличением интенсивности флуоресценции единичных клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что синтетический НТО повышает эффективность трансляции субгеномной РНК на уровне отдельной клетки.

3.4.2. Влияние синтетического 5’НТО на уровень репликации саРНК и индукцию транскрипции генов врожденного иммунного ответа

Для того чтобы оценить различия в биогенезе саРНК, имеющей синтетический 5’НТО «Synt1» и нативной саРНК «S773P» был проведен qPCR анализ тотальной РНК, выделенной из клеток HEK293T через 24 часа после трансфекции. На рисунке 3.20 отображены соотношения форм РНК. Как видно на рисунке 3.20, хотя в группе «Synt1» наблюдаются более высокие показатели содержания субгеномной РНК по отношению к смысловой и антисмысловой

геномной РНК, значимых различий не было обнаружено. Сопоставимый уровень субгеномной РНК может свидетельствовать о повышении трансляционной эффективности саРНК с синтетическим 5’НТО.

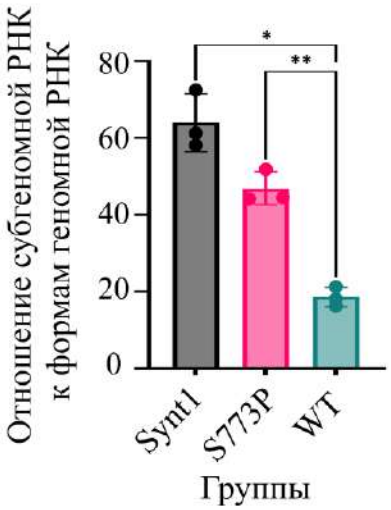


Рисунок 3.20 – Сравнение соотношений форм саРНК по абсолютному числу копий через 24 часа после трансфекции клеточной культуры линии HEK293T. Критерий Даннетта Т3; *p*-value <0,05; *p*-value <0,01. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе была проведена оценка эффективности биосинтеза белка платформы саРНК на основе репликона вируса венесуэльского энцефалита в сравнении с классической мРНК. Оценка паттерна накопления репортерного белка в процессе биогенеза саРНК выявила различия с платформой нереплецирующейся мРНК как в продолжительности, так и амплитуде биосинтеза белка. На основе полученных данных были исследованы молекулярные стратегии оптимизации саРНК, направленные на повышение уровня и продолжительности биосинтеза целевого белка. Проведенные исследования позволили выявить ключевые факторы, определяющие характер биогенеза саРНК в клетке, включая влияние аминокислотных замен в последовательностях неструктурных белков nsP2 и nsP3, роль врожденного иммунного ответа, а также возможности оптимизации трансляции субгеномной РНК посредством инженерии 5'-нетранслируемых регионов субгеномной РНК.

4.1. 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, накопление целевого белкового продукта с нереплицирующейся мРНК в значительной степени определяется количеством функциональных молекул РНК, их стабильностью и особенностями регуляторных последовательностей [187]. 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. Подобный паттерн был недавно продемонстрирован в другой работе, где для саРНК была описана нелинейная зависимость уровня целевого белка от дозы саРНК, где наблюдался максимум значений при использовании средних доз саРНК [188]. 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, в результате чего могут формироваться дцРНК. Образование дцРНК приводит к активации 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 выраженность иммунного ответа, что может объяснять наблюдаемую нелинейность зависимости «доза–уровень белка».

При рассмотрении динамики уровня биосинтеза репортерного белка, в случае мРНК характерно снижение уровня биосинтеза репортерного белка по степенному закону (Рисунок 3.10), что приводит к достижению максимального уровня интенсивности флуоресценции в точке 24 часа и последующему его снижению [187,189]. В отличие от этого, репликация саРНК позволяет компенсировать деградацию исходных молекул за счет синтеза новых копий РНК, вследствие чего кинетика уровня биосинтеза репортерного белка 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, а далее 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. Наблюдаемая нами динамика в целом согласуется с

опубликованными ранее данными, демонстрировавшими сходный характер изменения уровня биосинтеза целевого белка при использовании самореплицирующейся и нереплицирующейся РНК [190].

4.2. 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 эффективность биосинтеза 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 [116]. 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. Как показал анализ qPCR замена S773P сместила баланс в сторону образования субгеномной РНК.

Одновременное использование замен Q739L и G763R было описано в другой работе, где показано, что они приводят к повышению образования субгеномной РНК [5]. В нашей работе вариант Q739L приводил к значимому снижению флуоресцентного сигнала eGFP, после чего данный вариант был исключен из исследования. Замена G763R хотя и повышала максимальное значение

интенсивности флуоресценции некоторых единичных клеток, однако вызывала гетерогенность распределения сигнала флуоресценции. При исследовании соотношений межу формами РНК только через 48 часов наблюдался достоверный положительный эффект мутации G763R на образование субгеномной РНК. Можно предположить, что данные мутации влияют на этап протеолитического расщепления белка nsP1234 и nsP123, описанного ранее [191].

Повышение образования субгеномной РНК, ассоциированное с заменой S773P, приводило к увеличению флуоресценции репортерного белка, но вместе с тем нами было обнаружено повышение уровня транскрипции генов *RIGI, MDA5* и *IFIT1*. С учетом того, что суммарное количество антисмысловой и смысловой форм саРНК в контрольной группе и в группах саРНК, содержащих мутации было сходным, повышение образования субгеномной РНК, вероятно, являлось фактором реактогенности саРНК «S773P» и «G763R». Известно, что неструктурный белок nsP1 осуществляет процесс кэпирования как субгеномной, так и геномной РНК [99,100]. В процессе кэпирования форм саРНК образуется структура кэп-0 [99], которая опознается рецепторами врожденного иммунного ответа RIG-I и MDA5 как «чужое», стимулируя транскрипцию интерферон-стимулированных генов [192]. Более того, было показано, что белок nsP1 кэпирует не абсолютно все молекулы субгеномной РНК, что повышает вероятность распознавания ПРР с последующей активацией врожденного иммунного ответа [193]. Эти данные подчеркивают специфику саРНК – повышение эффективности репликации и образования субгеномной РНК может приводить к нежелательному иммунному ответу и снижению эффективности биосинтеза целевого белка [194].

4.3. 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 и NS1 на биосинтез целевого белка и стимуляции врожденного иммунного ответа.

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 [195], протеинкиназой PKR [196], а также, вероятно, белками семейства OAS (Рисунок 4.1). 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 [7]. Здесь мы показали, что при сопоставимом уровне форм саРНК наблюдается подавление транскрипции интерферон-стимулированных генов, что подчеркивает связь реакции врожденного иммунного ответа и эффективности биосинтеза белка.

С другой стороны, белок NS1 в нашем исследовании не снижал транскрипцию интерферон-стимулированных генов. Хотя повышенный уровень экспрессии *MDA5* и *IFIT1* в группе «NS1» может свидетельствовать об отсутствии ингибирования интерферон-стимулированных генов, механизм ингибирования реакции врожденной иммунной системы, опосредованный белком NS1, отличается от механизма действия p4a. Так, было показано, что NS1 вируса гриппа А способен повышать эффективность продукции белка по матрице экзогенной мРНК даже при сохранении активации транскрипции интерферон-стимулированных генов [8]. 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 (Рисунок 4.1).

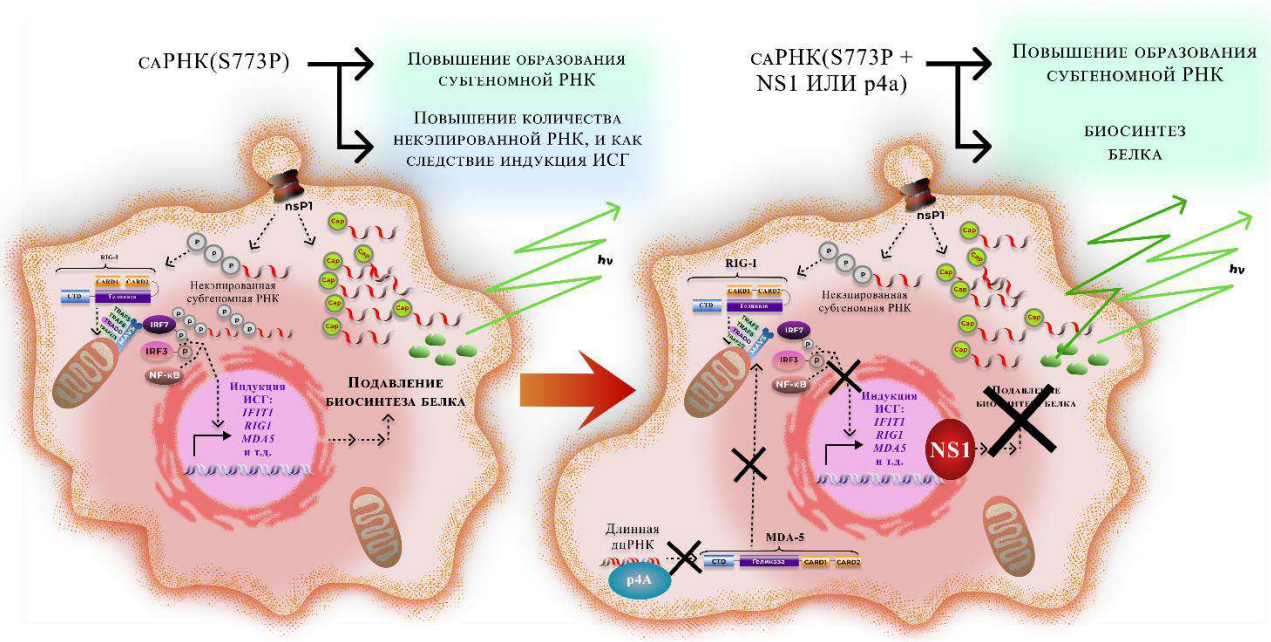


Рисунок 4.1 – Вероятные механизмы влияния ингибиторов врожденного иммунного ответа NS1 и p4a на повышение биосинтеза целевого белка.

Стоит также отметить, что в нашем исследовании при влиянии ингибиторов врожденного иммунного ответа наблюдалось повышение экспрессии *MDA5*. Такая избирательность транскрипционного ответа может отражать различия в регуляции компонентов систем распознавания РНК, что согласуется с возможным преимущественным вовлечением MDA5-зависимого пути в распознавании интермедиатов репликации саРНК. При этом повышение экспрессии *MDA5* не обязательно обусловлено исключительно IFN-зависимой регуляцией, поскольку для данного гена описан также IRF3-зависимый, IFN-независимый механизм транскрипционной активации. [197].

Таким образом, сохранение повышенной транскрипции *MDA5* и *IFIT1* при наличии 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.

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

Помимо влияния врожденного иммунного ответа на уровень биосинтеза целевого белка по матрице 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 трансляции [198,199]. 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 флуоресценции eGFP популяции клеток по сравнению с исходной конструкцией «S773P». 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.

Подобный эффект согласуется с ранее полученными нами результатами для мРНК, где использование последовательности «Synt1» также приводило к повышению биосинтеза репортерного белка [200]. Это позволяет предположить, что выявленные свойства данной 5’НТО не зависят исключительно от контекста репликации саРНК и могут быть связаны с присущими самой последовательности особенностями регуляции трансляции. Вместе с тем в случае саРНК интерпретация данного эффекта является нетривиальной, 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 платформы саРНК может определяться не только эффективностью ее репликации и интенсивностью активации врожденного иммунного ответа, но и свойствами последовательности 5’НТО субгеномной РНК. Введение синтетической 5’НТО позволило увеличить уровень биосинтеза целевого белка без выявленного 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 целевго 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЕ – агглютинирующие единицы

ГИ – последовательность, кодирующая целевые белки

ДИ – доверительный интервал

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дцРНК – двуцепочечная РНК

кРНК – кольцевая РНК

ЛНЧ – липидные наночастицы

мРНК – матричная РНК (классическая, неамплифицирующаяся)

НМРЛ – немелкоклеточный рак лёгкого

н.о. – нуклеотидные остатки

НС – неструктурный (в контексте белков)

НТО – нетранслируемая область (5'-НТО, 3'-НТО)

оцРНК – одноцепочечная РНК

п.о. – пары оснований

ПЭИ – полиэтиленимин

ПРР – паттерн-распознающие рецепторы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

РНК – рибонуклеиновая кислота

саРНК – самоамплифицирующаяся РНК

СГП – субгеномный промотор

т.п.н. – тысячи пар нуклеотидов

ЦТЭ – цитотоксический эффект

5meC – 5-метилцитидин

ALC-0315 – ионизируемый катионный липид

AmpR – ген устойчивости к ампициллину

ANOVA – дисперсионный анализ

ApoE – аполипопротеин E

ARCA – anti-reverse cap analog (аналог кэпа для ко-транскрипционного кэпирования)

BHK – линия клеток почки детеныша хомяка

Cap0, Cap1, Cap2 – типы структур 5'-кэпа мРНК

CHIKV – вирус Чикунгунья (*Chikungunya virus*)

CMV – цитомегаловирус

CSE – консервативные элементы последовательности (Conserved Sequence Elements)

DMG-PEG2000 – пегилированный липид

DOTMA – катионный липид (N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмоний хлорид)

DSPC – 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (вспомогательный фосфолипид)

EEEV – вирус восточного лошадиного энцефалита (*Eastern Equine Encephalitis Virus*)

eGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок (enhanced Green Fluorescent Protein)

EKB – комплекс белков коровьей оспы (E3, K3, B18R)

eIF – фактор инициации трансляции (eIF2α, eIF3, eIF4E, eIF4a)

EVEV – вирус Эверглейдс (*Everglades virus*)

FADD – проапоптотический фактор

FBS – фетальная бычья сыворотка (fetal bovine serum)

FLuc / Fluc – люцифераза светлячка (Firefly luciferase)

GJ – GenJect-40 (трансфекционный реагент)

GMT – средний геометрический титр

HA – гемагглютинин (Hemagglutinin)

HR – отношение рисков (Hazard Ratio)

HVD – гипервариабельный домен (Hypervariable Domain)

IFIT1, IFIT3 – IFN-индуцированные белки с тетратрикопептидными повторами

IFN-I, IFN-α, IFN-β – интерфероны I типа, альфа, бета

IIP – innate inhibiting proteins (белки-ингибиторы активации систем врожденного иммунного ответа)

IRES – внутренние сайты посадки рибосомы (Internal Ribosome Entry Site)

ISG – IFN-стимулированные гены (Interferon-Stimulated Genes)

ITAFs – клеточные факторы трансактивации

IVIS – система in vivo визуализации (биолюминесценции)

IVT – транскрипция in vitro (*in vitro* transcription)

m1Ψ – N1-метилпсевдоуридин

m6A – N6-метиладенозин

MDA5 – меланома-дифференцированный ассоциированный белок 5

MDPV – вирус Моссо-дас-Педрас (*Mossoro das Pedras virus*)

MERS-CoV – вирус ближневосточного респираторного синдрома

ns – статистически незначимые различия (not significant)

nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 – неструктурные белки (non-structural proteins) альфавирусов

OAS – 2′-5′-олигоаденилатсинтаза

ORF – открытая рамка считывания (Open Reading Frame)

PABP – поли(A)-связывающий белок

PBMC – периферические мононуклеарные клетки крови

PERK – PKR-подобная киназа эндоплазматического ретикулума

PI – пропидия йодид

PKR – протеинкиназа R

qPCR – количественная ПЦР в реальном времени

RDE – рецептор-разрушающий фермент

RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза

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

RNV – вирус Рио-Негро (*Rio Negro virus*)

RNase L – рибонуклеаза L

RRV – вирус Росс-Ривер (*Ross River virus*)

SIE – суперинфекционное исключение (Superinfection Exclusion)

SINV – вирус Синдбис (*Sindbis virus*)

SM-102 – ионизируемый катионный липид

SORT – selective organ-targeting (селективно распределяющиеся компоненты ЛНЧ)

T2A – сайт расщепления пептида (пептид 2A, обеспечивающий ко-трансляционное разделение белков)

TAE – трис-ацетат-ЭДТА (буфер для электрофореза)

TLR3, TLR7, TLR8 – толл-подобные рецепторы

TMEV L – лидерный белок вируса энцефаломиелита мышей Телера

VEEV – вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (*Venezuelan Equine Encephalitis Virus*)

WEEV – вирус западного лошадиного энцефалита (*Western Equine Encephalitis Virus*)

Ψ – псевдоуридин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maruggi G. и др. A self-amplifying mRNA SARS-CoV-2 vaccine candidate induces safe and robust protective immunity in preclinical models // Molecular Therapy. 2022. Т. 30, № 5. С. 1897–1912.
2. Zhou W. и др. Vaccines' New Era-RNA Vaccine // Viruses. 2023. Т. 15, № 8. С. 1760.
3. Gong Y. и др. A Novel Self-Amplifying mRNA with Decreased Cytotoxicity and Enhanced Protein Expression by Macrodomain Mutations // Advanced Science. 2024. Т. 11, № 43. С. 2402936.
4. Vanluchene H. и др. Less is more: Self-amplifying mRNA becomes self-killing upon dose escalation in immune-competent retinal cells // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2024. Т. 196. С. 114204.
5. Lin G., Zhang Y. Mutations in the non-structural protein coding region regulate gene expression from replicon RNAs derived from Venezuelan equine encephalitis virus // Biotechnol Lett. 2023. Т. 45, № 8. С. 1029–1038.
6. Petrakova O. и др. Noncytopathic Replication of Venezuelan Equine Encephalitis Virus and Eastern Equine Encephalitis Virus Replicons in Mammalian Cells // J Virol. 2005. Т. 79, № 12. С. 7597–7608.
7. Blakney A. K. и др. Innate Inhibiting Proteins Enhance Expression and Immunogenicity of Self-Amplifying RNA // Molecular Therapy. 2021. Т. 29, № 3. С. 1174–1185.
8. Phua K. K. L., Liu Y., Sim S. H. Non-linear enhancement of mRNA delivery efficiencies by influenza A derived NS1 protein engendering host gene inhibition property // Biomaterials. 2017. Т. 133. С. 29–36.
9. Wojcechowskyj J. A. и др. Controlling reactogenicity while preserving immunogenicity from a self-amplifying RNA vaccine by modulating nucleocytoplasmic transport // npj Vaccines. 2025. Т. 10, № 1. С. 85.

10. Casmil I. C. и др. The advent of clinical self-amplifying RNA vaccines // Molecular Therapy. 2025. Т. 33, № 6. С. 2565–2582.
11. Minnaert A.-K. и др. Strategies for controlling the innate immune activity of conventional and self-amplifying mRNA therapeutics: Getting the message across // Advanced Drug Delivery Reviews. 2021. Т. 176. С. 113900.
12. Watson J. D., Crick F. H. C. THE STRUCTURE OF DNA // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1953. Т. 18, № 0. С. 123–131.
13. Palade G. E. A SMALL PARTICULATE COMPONENT OF THE CYTOPLASM // The Journal of Cell Biology. 1955. Т. 1, № 1. С. 59–68.
14. Brenner S., Jacob F., Meselson M. An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis // Nature. 1961. Т. 190, № 4776. С. 576–581.
15. Gros F. и др. Unstable Ribonucleic Acid Revealed by Pulse Labelling of Escherichia Coli // Nature. 1961. Т. 190, № 4776. С. 581–585.
16. Nirenberg M. W., Matthaei J. H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1961. Т. 47, № 10. С. 1588–1602.
17. Lockard R. E., Lingrel J. B. The synthesis of mouse hemoglobin chains in a rabbit reticulocyte cell-free system programmed with mouse reticulocyte 9S RNA // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1969. Т. 37, № 2. С. 204–212.
18. Ostro M. J. и др. Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposomemediated insertion into a human cell line // Nature. 1978. Т. 274, № 5674. С. 921–923.
19. Dimitriadis G. J. Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes // Nature. 1978. Т. 274, № 5674. С. 923–924.
20. Melton D. A. и др. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter // Nucl Acids Res. 1984. Т. 12, № 18. С. 7035–7056.

21. Milligan J. F. и др. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates // Nucl Acids Res. 1987. Т. 15, № 21. С. 8783–8798.
22. Straubinger R. M., Papahadjopoulos D. [32] Liposomes as carriers for intracellular delivery of nucleic acids // Methods in Enzymology. Elsevier, 1983. Т. 101. С. 512–527.
23. Felgner P. L. и др. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987. Т. 84, № 21. С. 7413–7417.
24. Felgner P. L., Ringold G. M. Cationic liposome-mediated transfection // Nature. 1989. Т. 337, № 6205. С. 387–388.
25. Malone R. W., Felgner P. L., Verma I. M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1989. Т. 86, № 16. С. 6077–6081.
26. Wolff J. A. и др. Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo // Science. 1990. Т. 247, № 4949. С. 1465–1468.
27. Martinon F. и др. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo* by liposome-entrapped mRNA // Eur J Immunol. 1993. Т. 23, № 7. С. 1719–1722.
28. Boczkowski D. и др. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. // The Journal of experimental medicine. 1996. Т. 184, № 2. С. 465–472.
29. Diebold S. S. и др. Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA // Science. 2004. Т. 303, № 5663. С. 1529–1531.
30. Hoerr I. и др. *In vivo* application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies // Eur J Immunol. 2000. Т. 30, № 1. С. 1–7.
31. Read M. L., Farrow P. J., Seymour L. W. Emerging Developments in RNA Therapeutics // Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2003. Т. 7, № 2. С. 299–303.
32. Sullenger B. A., Gilboa E. Emerging clinical applications of RNA // Nature. 2002. Т. 418, № 6894. С. 252–258.
33. Karikó K. и др. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA // Immunity. 2005. Т. 23, № 2. С. 165–175.

34. Mascola J. R., Fauci A. S. Novel vaccine technologies for the 21st century // Nat Rev Immunol. 2020. Т. 20, № 2. С. 87–88.
35. Qin S. и др. mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases // Sig Transduct Target Ther. 2022. Т. 7, № 1. С. 166.
36. Pardi N. и др. mRNA vaccines – a new era in vaccinology // Nat Rev Drug Discov. 2018. Т. 17, № 4. С. 261–279.
37. Breaker R. R. The Biochemical Landscape of Riboswitch Ligands // Biochemistry. 2022. Т. 61, № 3. С. 137–149.
38. Deal C. E., Carfi A., Plante O. J. Advancements in mRNA Encoded Antibodies for Passive Immunotherapy // Vaccines. 2021. Т. 9, № 2. С. 108.
39. Adebanjo E. A. и др. Messenger ribonucleic acids (mRNA) technology for future applications in cancer treatment // DT. 2024. С. 20–31.
40. Chaudhary N., Weissman D., Whitehead K. A. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation // Nat Rev Drug Discov. 2021. Т. 20, № 11. С. 817–838.
41. Adebanjo E. A. и др. Novel therapeutic approaches to cancer immunotherapy and mRNA vaccines technology: a review // Holist Integ Oncol. 2025. Т. 4, № 1. С. 75.
42. Shatkin A. J., Manley J. L. [No title found] // Nat. Struct Biol. 2000. Т. 7, № 10. С. 838–842.
43. Devarkar S. C. и др. Structural basis for m7G recognition and 2′-O-methyl discrimination in capped RNAs by the innate immune receptor RIG-I // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2016. Т. 113, № 3. С. 596–601.
44. Kirshina A. и др. Effects of Combinations of Untranslated-Region Sequences on Translation of mRNA // Biomolecules. 2023. Т. 13, № 11. С. 1677.
45. Wang Y.-S. и др. mRNA-based vaccines and therapeutics: an in-depth survey of current and upcoming clinical applications // J Biomed Sci. 2023. Т. 30, № 1. С. 84.
46. Kukushkin I. и др. Effects of Various Poly(A) Tails on Luciferase Expression // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. 2024. Т. 18, № 3. С. 263–274.
47. Ward M., Richardson M., Metkar M. mRNA folding algorithms for structure and codon optimization // Briefings in Bioinformatics. 2025. Т. 26, № 4. С. bbaf386.

48. Hou X. и др. Lipid nanoparticles for mRNA delivery // Nat Rev Mater. 2021. Т. 6, № 12. С. 1078–1094.
49. Vasileva O. и др. Composition of lipid nanoparticles for targeted delivery: application to mRNA therapeutics // Front. Pharmacol. 2024. Т. 15. С. 1466337.
50. Zhang X., Barraza K. M., Beauchamp J. L. Cholesterol provides nonsacrificial protection of membrane lipids from chemical damage at air–water interface // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2018. Т. 115, № 13. С. 3255–3260.
51. Singh R. и др. Synergistic approach of salt formation and polymer-mediated stabilization to enhance the biopharmaceutical performance of Mebendazole // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2025. Т. 214. С. 114809.
52. Polack F. P. и др. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine // N Engl J Med. 2020. Т. 383, № 27. С. 2603–2615.
53. Weber J. S. и др. Individualised neoantigen therapy mRNA-4157 (V940) plus pembrolizumab versus pembrolizumab monotherapy in resected melanoma (KEYNOTE-942): a randomised, phase 2b study // The Lancet. 2024. Т. 403, № 10427. С. 632–644.
54. Zoroddu S., Bagella L. Next-Generation mRNA Vaccines in Melanoma: Advances in Delivery and Combination Strategies // Cells. 2025. Т. 14, № 18. С. 1476.
55. Laczkó D. и др. A Single Immunization with Nucleoside-Modified mRNA Vaccines Elicits Strong Cellular and Humoral Immune Responses against SARS-CoV-2 in Mice // Immunity. 2020. Т. 53, № 4. С. 724-732.e7.
56. Vlatkovic I. Non-Immunotherapy Application of LNP-mRNA: Maximizing Efficacy and Safety // Biomedicines. 2021. Т. 9, № 5. С. 530.
57. Ju Y. и др. Anti-PEG Antibodies Boosted in Humans by SARS-CoV-2 Lipid Nanoparticle mRNA Vaccine // ACS Nano. 2022. Т. 16, № 8. С. 11769–11780.
58. Münter R. и др. Studying how administration route and dose regulates antibody generation against LNPs for mRNA delivery with single-particle resolution // Molecular Therapy - Methods & Clinical Development. 2023. Т. 29. С. 450–459.

59. Akinc A. и др. Targeted Delivery of RNAi Therapeutics With Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms // Molecular Therapy. 2010. Т. 18, № 7. С. 1357–1364.
60. Suzuki T. и др. PEG shedding-rate-dependent blood clearance of PEGylated lipid nanoparticles in mice: Faster PEG shedding attenuates anti-PEG IgM production // International Journal of Pharmaceutics. 2020. Т. 588. С. 119792.
61. Wang X. и др. Preparation of selective organ-targeting (SORT) lipid nanoparticles (LNPs) using multiple technical methods for tissue-specific mRNA delivery // Nat Protoc. 2023. Т. 18, № 1. С. 265–291.
62. Miyasaki K. и др. Formulation methods for peptide-modified lipid nanoparticles // Journal of Controlled Release. 2025. Т. 385. С. 114030.
63. Qu F. и др. Post-Conjugation Process for Antibody-Conjugated Lipid Nanoparticles Enabling Tunable Antibody Surface Density for Targeted RNA Delivery // ACS Nano. 2026. Т. 20, № 21. С. 15092–15102.
64. Shah S. и др. Lipid nanoparticles with aptamers enable targeted mRNA delivery to $CD4^+$ T cells // Drug Delivery. 2026. Т. 33, № 1. С. 2637266.
65. Liu C.-X., Chen L.-L. Circular RNAs: Characterization, cellular roles, and applications // Cell. 2022. Т. 185, № 12. С. 2016–2034.
66. Hansen T. B. и др. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges // Nature. 2013. Т. 495, № 7441. С. 384–388.
67. Kristensen L. S. и др. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs // Nat Rev Genet. 2019. Т. 20, № 11. С. 675–691.
68. Chen R. и др. Engineering circular RNA for enhanced protein production // Nat Biotechnol. 2023. Т. 41, № 2. С. 262–272.
69. Wesselhoeft R. A. и др. RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In Vivo // Molecular Cell. 2019. Т. 74, № 3. С. 508-520.e4.
70. Qu L. и др. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants // Cell. 2022. Т. 185, № 10. С. 1728-1744.e16.

71. Legnini I. и др. Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis // Molecular Cell. 2017. Т. 66, № 1. С. 22-37.e9.
72. Yang Y. и др. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine // Cell Res. 2017. Т. 27, № 5. С. 626–641.
73. Abdullah S. W. и др. Advances and Breakthroughs in IRES-Directed Translation and Replication of Picornaviruses // mBio / под ред. Prasad V. R. 2023. Т. 14, № 2. С. e00358-23.
74. Wesselhoeft R. A., Kowalski P. S., Anderson D. G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells // Nat Commun. 2018. Т. 9, № 1. С. 2629.
75. Pamudurti N. R. и др. Translation of CircRNAs // Molecular Cell. 2017. Т. 66, № 1. С. 9-21.e7.
76. Pepini T. и др. Induction of an IFN-Mediated Antiviral Response by a Self-Amplifying RNA Vaccine: Implications for Vaccine Design // The Journal of Immunology. 2017. Т. 198, № 10. С. 4012–4024.
77. Deviatkin A. A. и др. Cap-Independent Circular mRNA Translation Efficiency // Vaccines. 2023. Т. 11, № 2. С. 238.
78. Chen X., Lu Y. Circular RNA: Biosynthesis in vitro // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. Т. 9. С. 787881.
79. Shen Y. и др. Self-splicing RNA circularization facilitated by intact group I and II introns // Nat Commun. 2025. Т. 16, № 1. С. 7376.
80. Broset E. и др. A Complete Approach for circRNA Therapeutics from Purification to Lyophilized Delivery Using Novel Ionizable Lipids // IJMS. 2025. Т. 26, № 11. С. 5138.
81. Xiao M.-S., Wilusz J. E. An improved method for circular RNA purification using RNase R that efficiently removes linear RNAs containing G-quadruplexes or structured 3′ ends // Nucleic Acids Research. 2019. Т. 47, № 16. С. 8755–8769.
82. Alshehry Y. и др. Investigation of the impact of lipid nanoparticle compositions on the delivery and T cell response of circRNA vaccine // Journal of Controlled Release. 2025. Т. 381. С. 113617.

83. Wu K. и др. Optimized Lipid Nanoparticles Delivery Enables Efficient Circular RNA-Mediated Forward Programming and Lineage Specification of Induced Pluripotent Stem Cells // Adv Funct Materials. 2026. Т. 36, № 19. С. e20042.
84. Singh O. N. и др. Comparison of immunogenicity and protection efficacy of self-amplifying and circular mRNA vaccines against SARS-CoV-2 // iScience. 2025. Т. 28, № 10. С. 113498.
85. Zhao Y.-Y. и др. Harnessing the Loop: The Perspective of Circular RNA in Modern Therapeutics // Vaccines. 2025. Т. 13, № 8. С. 821.
86. Hwang H. J., Kim Y. K. Molecular mechanisms of circular RNA translation // Exp Mol Med. 2024. Т. 56, № 6. С. 1272–1280.
87. Zhen X. и др. Unlocking the potential of engineered circular RNA therapeutics // Med-X. 2026. Т. 4, № 1. С. 7.
88. Liu C.-X. и др. Structure and Degradation of Circular RNAs Regulate PKR Activation in Innate Immunity // Cell. 2019. Т. 177, № 4. С. 865-880.e21.
89. Tong M. и др. Robust genome and cell engineering via in vitro and in situ circularized RNAs // Nat. Biomed. Eng. 2024. Т. 9, № 1. С. 109–126.
90. Strauss J. H., Strauss E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution // Microbiol Rev. 1994. Т. 58, № 3. С. 491–562.
91. Kulasegaran-Shylini R. и др. Structural and Functional Elements of the Promoter Encoded by the 5′ Untranslated Region of the Venezuelan Equine Encephalitis Virus Genome // J Virol. 2009. Т. 83, № 17. С. 8327–8339.
92. Frolov I., Hardy R., Rice C. M. Cis-acting RNA elements at the 5′ end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis // RNA. 2001. Т. 7, № 11. С. 1638–1651.
93. Michel G. и др. Adaptation of Venezuelan equine encephalitis virus lacking 51-nt conserved sequence element to replication in mammalian and mosquito cells // Virology. 2007. Т. 362, № 2. С. 475–487.
94. Lemm J. A. и др. Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. // The EMBO Journal. 1994. Т. 13, № 12. С. 2925–2934.

95. Shirako Y., Strauss J. H. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis // J Virol. 1994. Т. 68, № 3. С. 1874–1885.
96. Laurent T. и др. Architecture of the chikungunya virus replication organelle // eLife. 2022. Т. 11. С. e83042.
97. Rupp J. C. и др. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions // Journal of General Virology. 2015. Т. 96, № 9. С. 2483–2500.
98. Tan Y. B. и др. Molecular architecture of the Chikungunya virus replication complex // Sci. Adv. 2022. Т. 8, № 48. С. eadd2536.
99. Ahola T., Kääriäinen L. Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1995. Т. 92, № 2. С. 507–511.
100. Vasiljeva L. и др. Identification of a Novel Function of the AlphavirusCapping Apparatus // Journal of Biological Chemistry. 2000. Т. 275, № 23. С. 17281–17287.
101. Rausalu K. и др. Chikungunya virus infectivity, RNA replication and non-structural polyprotein processing depend on the nsP2 protease’s active site cysteine residue // Sci Rep. 2016. Т. 6, № 1. С. 37124.
102. Das P. K., Merits A., Lulla A. Functional Cross-talk between Distant Domains of Chikungunya Virus Non-structural Protein 2 Is Decisive for Its RNA-modulating Activity // Journal of Biological Chemistry. 2014. Т. 289, № 9. С. 5635–5653.
103. Karpe Y. A., Aher P. P., Lole K. S. NTPase and 5′-RNA Triphosphatase Activities of Chikungunya Virus nsP2 Protein // PLoS ONE / под ред. Ng Fong Poh L. 2011. Т. 6, № 7. С. e22336.
104. Rikkonen M., Peränen J., Kääriäinen L. ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2 // J Virol. 1994. Т. 68, № 9. С. 5804–5810.
105. Akhrymuk I., Kulemzin S. V., Frolova E. I. Evasion of the Innate Immune Response: the Old World Alphavirus nsP2 Protein Induces Rapid Degradation of Rpb1, a Catalytic Subunit of RNA Polymerase II // J Virol. 2012. Т. 86, № 13. С. 7180–7191.

106. Meshram C. D. и др. Mutations in Hypervariable Domain of Venezuelan Equine Encephalitis Virus nsP3 Protein Differentially Affect Viral Replication // J Virol / под ред. López S. 2020. Т. 94, № 3. С. e01841-19.
107. Hick T. A. H. и др. Venezuelan equine encephalitis virus non-structural protein 3 dictates superinfection exclusion in mammalian cells // npj Viruses. 2024. Т. 2, № 1. С. 43.
108. Rubach J. K. и др. Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro // Virology. 2009. Т. 384, № 1. С. 201–208.
109. Rupp J. C., Jundt N., Hardy R. W. Requirement for the Amino-Terminal Domain of Sindbis Virus nsP4 during Virus Infection // J Virol. 2011. Т. 85, № 7. С. 3449–3460.
110. Tomar S. и др. Catalytic Core of Alphavirus Nonstructural Protein nsP4 Possesses Terminal Adenylyltransferase Activity // J Virol. 2006. Т. 80, № 20. С. 9962–9969.
111. Akhrymuk I. и др. Novel Mutations in nsP2 Abolish Chikungunya Virus-Induced Transcriptional Shutoff and Make the Virus Less Cytopathic without Affecting Its Replication Rates // J Virol / под ред. López S. 2019. Т. 93, № 4. С. e02062-18.
112. Frolov I. и др. Random Insertion Mutagenesis of Sindbis Virus Nonstructural Protein 2 and Selection of Variants Incapable of Downregulating Cellular Transcription // J Virol. 2009. Т. 83, № 18. С. 9031–9044.
113. Garmashova N. и др. Analysis of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid Protein Function in the Inhibition of Cellular Transcription // J Virol. 2007. Т. 81, № 24. С. 13552–13565.
114. Garmashova N. и др. The Old World and New World Alphaviruses Use Different Virus-Specific Proteins for Induction of Transcriptional Shutoff // J Virol. 2007. Т. 81, № 5. С. 2472–2484.
115. Li Y. и др. In vitro evolution of enhanced RNA replicons for immunotherapy // Sci Rep. 2019. Т. 9, № 1. С. 6932.
116. Petrakova O. и др. Noncytopathic Replication of Venezuelan Equine Encephalitis Virus and Eastern Equine Encephalitis Virus Replicons in Mammalian Cells // J Virol. 2005. Т. 79, № 12. С. 7597–7608.

117. Li D., Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases // Sig Transduct Target Ther. 2021. Т. 6, № 1. С. 291.
118. Kawai T., Akira S. TLR signaling // Cell Death Differ. 2006. Т. 13, № 5. С. 816–825.
119. Kumar H., Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and innate immunity // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2009. Т. 388, № 4. С. 621–625.
120. Takeda K. Toll-like receptors in innate immunity // International Immunology. 2004. Т. 17, № 1. С. 1–14.
121. Santoro M. G. NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: NF-kappaB and virus infection: who controls whom // The EMBO Journal. 2003. Т. 22, № 11. С. 2552–2560.
122. Vercammen E., Staal J., Beyaert R. Sensing of Viral Infection and Activation of Innate Immunity by Toll-Like Receptor 3 // Clin Microbiol Rev. 2008. Т. 21, № 1. С. 13–25.
123. Devoldere J. и др. Evading innate immunity in nonviral mRNA delivery: don't shoot the messenger // Drug Discovery Today. 2016. Т. 21, № 1. С. 11–25.
124. Takeuchi O., Akira S. Recognition of viruses by innate immunity // Immunological Reviews. 2007. Т. 220, № 1. С. 214–224.
125. Yoneyama M., Fujita T. Structural Mechanism of RNA Recognition by the RIG-I-like Receptors // Immunity. 2008. Т. 29, № 2. С. 178–181.
126. Barral P. M. и др. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: Key regulators of innate immunity // Pharmacology & Therapeutics. 2009. Т. 124, № 2. С. 219–234.
127. Tregoning J. S. и др. Formulation, inflammation, and RNA sensing impact the immunogenicity of self-amplifying RNA vaccines // Molecular Therapy - Nucleic Acids. 2023. Т. 31. С. 29–42.
128. Ueta M. и др. Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005. Т. 331, № 1. С. 285–294.

129. Gong Y. и др. A Novel Self-Amplifying mRNA with Decreased Cytotoxicity and Enhanced Protein Expression by Macrodomain Mutations // Advanced Science. 2024. Т. 11, № 43. С. 2402936.
130. Nikonov A. и др. RIG-I and MDA-5 Detection of Viral RNA-dependent RNA Polymerase Activity Restricts Positive-Strand RNA Virus Replication // PLoS Pathog / под ред. Sherry B. 2013. Т. 9, № 9. С. e1003610.
131. Akhrymuk I., Frolov I., Frolova E. I. Both RIG-I and MDA5 detect alphavirus replication in concentration-dependent mode // Virology. 2016. Т. 487. С. 230–241.
132. McDougal M. B. и др. Interferon inhibits a model RNA virus via a limited set of inducible effector genes // EMBO Reports. 2023. Т. 24, № 9. С. e56901.
133. Rutherford M. N., Hannigan G. E., Williams B. R. Interferon-induced binding of nuclear factors to promoter elements of the 2-5A synthetase gene. // The EMBO Journal. 1988. Т. 7, № 3. С. 751–759.
134. Dey M. и др. Mechanistic Link between PKR Dimerization, Autophosphorylation, and eIF2α Substrate Recognition // Cell. 2005. Т. 122, № 6. С. 901–913.
135. García M. A., Meurs E. F., Esteban M. The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control // Biochimie. 2007. Т. 89, № 6–7. С. 799–811.
136. Corbet G. A. и др. dsRNA-induced condensation of antiviral proteins modulates PKR activity // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2022. Т. 119, № 33. С. e2204235119.
137. Yu H. и др. Protein Kinase R (PKR) as a Novel dsRNA Sensor in Antiviral Innate Immunity // Antiviral Innate Immunity / под ред. Zheng C. New York, NY: Springer US, 2025. Т. 2854. С. 265–282.
138. Balachandran S. и др. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling // EMBO J. 1998. Т. 17, № 23. С. 6888–6902.
139. Thapa R. J. и др. Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2013. Т. 110, № 33.

140. Dahal B. и др. EGR1 upregulation following Venezuelan equine encephalitis virus infection is regulated by ERK and PERK pathways contributing to cell death // Virology. 2020. Т. 539. С. 121–128.
141. Harding H. P., Zhang Y., Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase // Nature. 1999. Т. 397, № 6716. С. 271–274.
142. Holm L. DNA polymerase β belongs to an ancient nucleotidyltransferase superfamily // Trends in Biochemical Sciences. 1995. Т. 20, № 9. С. 345–347.
143. Kristiansen H. и др. The Oligoadenylate Synthetase Family: An Ancient Protein Family with Multiple Antiviral Activities // Journal of Interferon & Cytokine Research. 2011. Т. 31, № 1. С. 41–47.
144. Ibsen M. S. и др. Structural and functional analysis reveals that human OASL binds dsRNA to enhance RIG-I signaling // Nucleic Acids Research. 2015. Т. 43, № 10. С. 5236–5248.
145. Tanaka N. и др. Structural basis for recognition of 2′,5′-linked oligoadenylates by human ribonuclease L // EMBO J. 2004. Т. 23, № 20. С. 3929–3938.
146. Zhou A. Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: A uniquely regulated mediator of interferon action // Cell. 1993. Т. 72, № 5. С. 753–765.
147. Bisbal C., Silverman R. H. Diverse functions of RNase L and implications in pathology // Biochimie. 2007. Т. 89, № 6–7. С. 789–798.
148. Kubota K. и др. Identification of 2′-Phosphodiesterase, Which Plays a Role in the 2-5A System Regulated by Interferon // Journal of Biological Chemistry. 2004. Т. 279, № 36. С. 37832–37841.
149. Schmidt A. и др. An interferon-induced phosphodiesterase degrading (2’-5’) oligoisoadenylate and the C-C-A terminus of tRNA. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1979. Т. 76, № 10. С. 4788–4792.
150. Silverman R. H. и др. Synthesis, Characterization and Properties of ppp(A2′p)nApCp and Related High-Specific-Activity 32P-Labelled Derivatives of ppp(A2′p)nA // European Journal of Biochemistry. 2005. Т. 115, № 1. С. 79–85.
151. Takata M. A. и др. CG dinucleotide suppression enables antiviral defence targeting non-self RNA // Nature. 2017. Т. 550, № 7674. С. 124–127.

152. Johnson B. и др. Human IFIT3 Modulates IFIT1 RNA Binding Specificity and Protein Stability // Immunity. 2018. Т. 48, № 3. С. 487-499.e5.
153. Maruggi G. и др. Engineered alphavirus replicon vaccines based on known attenuated viral mutants show limited effects on immunogenicity // Virology. 2013. Т. 447, № 1–2. С. 254–264.
154. Beitzel B. F. и др. High-Resolution Functional Mapping of the Venezuelan Equine Encephalitis Virus Genome by Insertional Mutagenesis and Massively Parallel Sequencing // PLoS Pathog / под ред. Weaver S. C. 2010. Т. 6, № 10. С. e1001146.
155. Quintana V. и др. Improvement in the potency of a N1-methylpseudouridine-modified self-amplifying RNA through mutations in the RNA-dependent RNA polymerase // Journal of Biological Chemistry. 2025. Т. 301, № 8. С. 110487.
156. Chamberlain J. и др. Attenuation of Chikungunya Virus by a Single Amino Acid Substitution in the nsP1 Component of a Non-Structural Polyprotein // Viruses. 2025. Т. 17, № 2. С. 281.
157. Utt A. и др. Mutations Conferring a Noncytotoxic Phenotype on Chikungunya Virus Replicons Compromise Enzymatic Properties of Nonstructural Protein 2 // J Virol / под ред. Perlman S. 2015. Т. 89, № 6. С. 3145–3162.
158. Dominguez F. и др. Alphavirus-based replicons demonstrate different interactions with host cells and can be optimized to increase protein expression // J Virol / под ред. Heise M. Т. 2023. Т. 97, № 11. С. e01225-23.
159. Garmashova N. и др. Sindbis Virus Nonstructural Protein nsP2 Is Cytotoxic and Inhibits Cellular Transcription // J Virol. 2006. Т. 80, № 12. С. 5686–5696.
160. Akhrymuk I., Frolov I., Frolova E. I. Sindbis Virus Infection Causes Cell Death by nsP2-Induced Transcriptional Shutoff or by nsP3-Dependent Translational Shutoff // J Virol / под ред. López S. 2018. Т. 92, № 23. С. e01388-18.
161. Guerrero-Arguero I. и др. Alphaviruses: Host pathogenesis, immune response, and vaccine & treatment updates // Journal of General Virology. 2021. Т. 102, № 8.
162. Kafai N. M., Diamond M. S., Fox J. M. Distinct Cellular Tropism and Immune Responses to Alphavirus Infection // Annu. Rev. Immunol. 2022. Т. 40, № 1. С. 615–649.

163. Leung J. Y.-S., Ng M. M.-L., Chu J. J. H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells // Advances in Virology. 2011. Т. 2011. С. 1–9.
164. Sun Z. и др. Next-Generation saRNA Platforms: Systematic Screening and Engineering Enhances Superior Protein Expression and Organ-Specific Targeting for RNA Therapeutics. Molecular Biology, 2025.
165. Karikó K. и др. Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability // Molecular Therapy. 2008. Т. 16, № 11. С. 1833–1840.
166. Azizi H. и др. Self-amplifying RNAs generated with the modified nucleotides 5-methylcytidine and 5-methyluridine mediate strong expression and immunogenicity *in vivo* // NAR Molecular Medicine. 2024. Т. 1, № 2. С. ugae004.
167. Miyazato P. и др. m1Ψ influences the performance of various positive-stranded RNA virus-based replicons // Sci Rep. 2024. Т. 14, № 1. С. 17634.
168. Komori M. и др. Incorporation of 5 methylcytidine alleviates innate immune response to self-amplifying RNA vaccine. Immunology, 2023.
169. Aboshi M. и др. Safety and immunogenicity of VLPCOV-02, a SARS-CoV-2 self-amplifying RNA vaccine with a modified base, 5-methylcytosine // iScience. 2024. Т. 27, № 2. С. 108964.
170. McGee J. E. и др. Complete substitution with modified nucleotides in self-amplifying RNA suppresses the interferon response and increases potency // Nat Biotechnol. 2024.
171. Poleganov M. A. и др. Efficient Reprogramming of Human Fibroblasts and Blood-Derived Endothelial Progenitor Cells Using Nonmodified RNA for Reprogramming and Immune Evasion // Human Gene Therapy. 2015. Т. 26, № 11. С. 751–766.
172. Ohto T. и др. Inhibition of the Inflammatory Pathway Enhances Both the *in Vitro* and *in Vivo* Transfection Activity of Exogenous *in Vitro*-Transcribed mRNAs Delivered by Lipid Nanoparticles // Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2019. Т. 42, № 2. С. 299–302.

173. Devasthanam A. S. Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses // Virulence. 2014. Т. 5, № 2. С. 270–277.

174. Beissert T. и др. Improvement of *In Vivo* Expression of Genes Delivered by Self-Amplifying RNA Using Vaccinia Virus Immune Evasion Proteins // Human Gene Therapy. 2017. Т. 28, № 12. С. 1138–1146.

175. Liu Y. и др. Messenger RNA translation enhancement by immune evasion proteins: a comparative study between EKB (vaccinia virus) and NS1 (influenza A virus) // Sci Rep. 2019. Т. 9, № 1. С. 11972.

176. Perdiguero B., Esteban M. The Interferon System and Vaccinia Virus Evasion Mechanisms // Journal of Interferon & Cytokine Research. 2009. Т. 29, № 9. С. 581–598.

177. Hale B. G. и др. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses // Journal of General Virology. 2008. Т. 89, № 10. С. 2359–2376.

178. Krug R. M. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense // Current Opinion in Virology. 2015. Т. 12. С. 1–6.

179. Blakney A. K. и др. Big Is Beautiful: Enhanced saRNA Delivery and Immunogenicity by a Higher Molecular Weight, Bioreducible, Cationic Polymer // ACS Nano. 2020. Т. 14, № 5. С. 5711–5727.

180. Wojcechowskyj J. A. и др. Controlling reactogenicity while preserving immunogenicity from a self-amplifying RNA vaccine by modulating nucleocytoplasmic transport // npj Vaccines. 2025. Т. 10, № 1. С. 85.

181. Borghese F. и др. The Leader Protein of Theiler's Virus Prevents the Activation of PKR // J Virol / под ред. Williams B. R. G. 2019. Т. 93, № 19. С. e01010-19.

182. De Beuckelaer A. и др. Type I Interferons Interfere with the Capacity of mRNA Lipoplex Vaccines to Elicit Cytolytic T Cell Responses // Molecular Therapy. 2016. Т. 24, № 11. С. 2012–2020.

183. Van Hoecke L. и др. The Opposing Effect of Type I IFN on the T Cell Response by Non-modified mRNA-Lipoplex Vaccines Is Determined by the Route of Administration // Molecular Therapy - Nucleic Acids. 2020. Т. 22. С. 373–381.

184. Zhong Z. и др. Immunogenicity and Protection Efficacy of a Naked Self-Replicating mRNA-Based Zika Virus Vaccine // Vaccines. 2019. Т. 7, № 3. С. 96.

185. Rabouw H. H. и др. Middle East Respiratory Coronavirus Accessory Protein 4a Inhibits PKR-Mediated Antiviral Stress Responses // PLoS Pathog / под ред. Frieman M. B. 2016. Т. 12, № 10. С. e1005982.

186. Khaperskyy D. A., McCormick C. Timing Is Everything: Coordinated Control of Host Shutoff by Influenza A Virus NS1 and PA-X Proteins // J Virol / под ред. Sullivan C. S. 2015. Т. 89, № 13. С. 6528–6531.

187. Phua K. K. L., Leong K. W., Nair S. K. Transfection efficiency and transgene expression kinetics of mRNA delivered in naked and nanoparticle format // Journal of Controlled Release. 2013. Т. 166, № 3. С. 227–233.

188. Bathula N. V. и др. Formulation and administration timing of lipid derivatized JAK-inhibitor and corticosteroid modulate saRNA-LNP inflammation and expression // Journal of Controlled Release. 2026. Т. 392. С. 114736.

189. Pardi N. и др. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes // Journal of Controlled Release. 2015. Т. 217. С. 345–351.

190. Huysmans H. и др. Expression Kinetics and Innate Immune Response after Electroporation and LNP-Mediated Delivery of a Self-Amplifying mRNA in the Skin // Molecular Therapy - Nucleic Acids. 2019. Т. 17. С. 867–878.

191. Kunyk D. и др. The Interplay Between Therapeutic Self-Amplifying RNA and the Innate Immune System: Balancing Efficiency and Reactogenicity // IJMS. 2025. Т. 26, № 18. С. 8986.

192. Tsukamoto Y., Igarashi M., Kato H. Targeting cap1 RNA methyltransferases as an antiviral strategy // Cell Chemical Biology. 2024. Т. 31, № 1. С. 86–99.

193. LaPointe A. T. и др. Production of Noncapped Genomic RNAs Is Critical to Sindbis Virus Disease and Pathogenicity // mBio / под ред. Patton J. T. 2020. Т. 11, № 6. С. e02675-20.

194. Lozhkov A. A. и др. Simultaneous Detection of RIG-1, MDA5, and IFIT-1 Expression Is a Convenient Tool for Evaluation of the Interferon-Mediated Response // Viruses. 2022. Т. 14, № 10. С. 2090.
195. Niemeyer D. и др. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Accessory Protein 4a Is a Type I Interferon Antagonist // J Virol. 2013. Т. 87, № 22. С. 12489–12495.
196. Li Y.-H. и др. Molecular Characteristics, Functions, and Related Pathogenicity of MERS-CoV Proteins // Engineering. 2019. Т. 5, № 5. С. 940–947.
197. Yount J. S., Moran T. M., López C. B. Cytokine-Independent Upregulation of MDA5 in Viral Infection // J Virol. 2007. Т. 81, № 13. С. 7316–7319.
198. Berkhout B., Arts K., Abbink T. E. M. Ribosomal scanning on the 5′-untranslated region of the human immunodeficiency virus RNA genome // Nucleic Acids Research. 2011. Т. 39, № 12. С. 5232–5244.
199. Leppek K., Das R., Barna M. Functional 5′ UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them // Nat Rev Mol Cell Biol. 2018. Т. 19, № 3. С. 158–174.
200. Mazunina E. P. и др. Identification of novel 5’ UTR variants for enhanced mRNA translation and vaccine immunogenicity // Sci Rep. 2026.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Нуклеотидные последовательности целевых генов

Название гена	Последовательность 5’-3’	Длина фрагмента, п.о.
NS1	ATGAATTCCAACACAATAACCTCGTTTCAGGTAGATTGTTATCTAT GGCAAATAAGAAAGCTACTCAGCATGAGAGACATGTGTGATGCTC CCTTTGATGACAGGCTCCGAAGAGACCAAAAGGCATTAAAGGGGA GAGGCAGCACACTTGGACTCGATCTAAGGGTGGCTACAATGGAGG GAAAAAAGATCGTTGAGGACATCTTGAAGAGTGAAACAGATGAAA ACCTCAAAATAGCCATTGCTTCCAGTCCTGCTCCTCGGTATATCACT GATATGAGCATAGAGGAGATGAGCCGAGAATGGTACATGCTGATG CCTAGGCAGAAAGTAACTGGAGGCCTTATGGTGAAAATGGACCAA GCCATAATGGATAAGAGAATTATCCTTAAAGCTAATTTCTCGGTAC TATTTGATCAACTAGAGACATTAGTCTCTCTGAGGGCATTCACAGA AGATGGTGCAATTGTGGCTGAAATATCTCCCATTCCCTCCATGCCA GGACATTCTACAGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGAATCCTCATCG GTGGACTTGAATGGAATGATAACTCAATTCGAGCGTCTGAAAATAT ACAGAGATTCGCTTGGGGAATCCGTGATGAGAATGGGGGACCTCC ACTCCCTCCAAAGCAGAAACGCTACATGGCGAGACGAGTTGAGTC AGAAGTT	690
ORF4a	ATGGATTACGTGTCTCTGCTTAATCAAATTTGGCAGAAGTACCTTA ACTCACCGTATACTACTTGTTTGTACATCCCTAAACCCACAGCTAA GTATACACCTTTAGTTGGCACTTCATTGCACCCTGTGCTGTGGAACT GTCAGCTATCCTTTGCTGGTTATACTGAATCTGCTGTTAATTCTACA AAAGCTTTGGCCAAACAGGACGCAGCTCAGCGAATCGCTTGGTTGC TACATAAGGATGGAGGAATCCCTGATGGATGTTCCCTCTACCTCCG GCACTCAAGTTTATTCGCGCAAAGCGAGGAAGAGGAGCCATTCTCC AAC	327
EGFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATC CTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTG TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTG AAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCC TCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC CGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACT ACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGA ACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACA TCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCT ATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCA AGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACC ACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCC CGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCC AACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCG CCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG	717

FLuc	ATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAAGGCCCAGCGCCATTCTAC CCACTCGAAGACGGGACCGCTGGCGAGCAGCTGCATAAAGCCATG AAGCGCTACGCCCTGGTGCCCGGCACCATCGCCTTTACCGACGCAC ATATCGAGGTGGACATTACCTACGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGT TCGGCTGGCAGAAGCTATGAAGCGCTATGGGCTGAATACAAACCA TCGGATCGTGGTGTGTAGCGAGAATAGCTTGCAGTTCTTCATGCCC GTGTTGGGTGCCCTGTTCATCGGTGTGGCTGTGGCCCCAGCTAACG ACATCTACAACGAGCGCGAGCTGCTGAACAGCATGGGCATCAGCC AGCCCACCGTCGTATTCGTGAGCAAGAAAGGGCTGCAAAAGATCC TCAACGTGCAAAAGAAGCTACCGATCATACAAAAGATCATCATCAT GGATAGCAAGACCGACTACCAGGGCTTCCAAAGCATGTACACCTTC GTGACTTCCCATTTGCCACCCGGCTTCAACGAGTACGACTTCGTGC CCGAGAGCTTCGACCGGGACAAAACCATCGCCCTGATCATGAACA GTAGTGGCAGTACCGGATTGCCCAAGGGCGTAGCCCTACCGCACCG CACCGCTTGTGTCCGATTCAGTCATGCCCGCGACCCCATCTTCGGC AACCAGATCATCCCCGACACCGCTATCCTGAGCGTGGTGCCATTTC ACCACGGCTTCGGCATGTTCACCACGCTGGGCTACTTGATCTGCGG CTTTCGGGTCGTGCTCATGTACCGCTTCGAGGAAGAGCTATTCTTGC GCAGCTTGCAAGACTATAAGATTCAATCTGCCCTGCTGGTGCCCAC ACTATTTAGCTTCTTCGCTAAGAGCACTCTCATCGACAAGTACGAC CTAAGCAACTTGCACGAGATCGCCAGCGGCGGGGCGCCGCTCAGC AAGGAGGTAGGTGAGGCCGTGGCCAAACGCTTCCACCTACCAGGC ATCCGCCAGGGCTACGGCCTGACAGAAACAACCAGCGCCATTCTG ATCACCCCCGAAGGGGACGACAAGCCTGGCGCAGTAGGCAAGGTG GTGCCCTTCTTCGAGGCTAAGGTGGTGGACTTGGACACCGGTAAGA CACTGGGTGTGAACCAGCGCGGCGAGCTGTGCGTCCGTGGCCCCAT GATCATGAGCGGCTACGTTAACAACCCCGAGGCTACAAACGCTCTC ATCGACAAGGACGGCTGGCTGCATAGCGGCGACATCGCCTACTGG GACGAGGACGAGCACTTCTTCATCGTGGACCGGCTGAAGAGCCTG ATCAAATACAAGGGCTACCAGGTAGCCCCAGCCGAACTGGAGAGC ATCCTGCTGCAACACCCCAACATCTTCGACGCCGGGGTCGCCGGCC TGCCCGACGACGATGCCGGCGAGCTGCCCGCCGCAGTCGTCGTGCT GGAACACGGTAAAACCATGACCGAGAAGGAGATCGTGGACTATGT GGCCAGCCAGGTTACAACCGCCAAGAAGCTGCGCGGTGGTGTTGT GTTCGTGGACGAGGTGCCTAAAGGACTGACCGGCAAGTTGGACGC CCGCAAGATCCGCGAGATTCTCATTAAGGCCAAGAAGGGCGGCAA GATCGCCGTCTGATAA	1656
Synt1	GATCGGATATCCGCTAACGTAGCTTAACGGATCGTATACGGTAACT GTGTATATAGCCGCCAGTGTCGCACTGTAGACCGAGGTCTGATCTA GTAGGCAGA	101

HA	ATGAAGGCGATACTCGTGGTTATGCTGTACACATTTACCACCGCAA ATGCAGACACGTTATGTATCGGTTATCATGCGAACAATTCAACCGA CACTGTGGACACAGTTCTTGAGAAGAATGTCACCGTGACACACTCT GTCAATCTTCTGGAAGACAAGCATAACGGGAAACTATGCAAGCTCC GCGGGGTAGCACCTTTGCATCTTGGCAAATGTAACATTGCTGGCTG GATCCTGGGAAATCCAGAGTGCGAATCCCTCTCCACAGCTCGAAGT TGGTCCTACATTGTGGAGACATCGAATTCAGACAACGGCACGTGCT ACCCAGGAGATTTCATCAATTATGAGGAGCTGCGGGAGCAGCTTAG CTCCGTGTCATCCTTTGAAAGGTTTGAAATCTTCCCCAAGACAAGT AGCTGGCCTAATCACGACTCGGACAATGGCGTCACGGCAGCATGTC CTCACGCTGGAGCCAAGAGCTTCTACAAGAACCTGATCTGGCTGGT TAAGAAAGGAAAGTCTTACCCAAAGATCAACCAAACCTACATTAA TGATAAAGGGAAAGAGGTCCTCGTGCTGTGGGGCATTCACCATCCT CCTACTATTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCCT ATGTGTTTGTGGGGACAAGTCGTTACAGCAAGAAGTTCAAGCCAGA GATAGCAACCCGGCCCAAGGTGCGGGATCAGGAAGGCAGAATGAA CTATTACTGGACACTCGTGGAACCGGGAGACAAAATAACCTTCGAA GCAACTGGAAACCTGGTGGCGCCCAGATATGCCTTTACCATGGAGC GCGATGCTGGCTCTGGTATTATCATTTCAGATACGCCCGTCCACGA TTGCAATACCACTTGTCAGACGCCCGAGGGTGCTATAAACACCAGC CTGCCCTTTCAGAATGTGCATCCAATCACCATTGGCAAATGTCCAA AGTACGTGAAAAGCACAAAATTGCGCCTGGCCACCGGATTGAGGA ATGTCCCTTCTATCCAGTCTCGTGGCCTGTTCGGGGCCATTGCTGGC TTCATCGAGGGTGGCTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTT ATCACCATCAGAATGAGCAAGGGAGCGGCTATGCCGCCGACCTGA AGAGCACTCAGAATGCCATTGATAAGATTACTAACAAAGTAAACTC TGTTATCGAAAAGATGAATACACAGTTTACCGCCGTTGGTAAGGAG TTCAACCACCTTGAGAAACGGATCGAGAATCTAAACAAGAAGGTT GATGATGGCTTCCTGGACATTTGGACTTACAATGCCGAACTGTTGG TTCTACTGGAAAACGAACGAACTCTTGACTATCACGATTCCAACGT GAAGAACTTGTATGAGAAAGTCAGGAACCAGTTAAAGAACAACGC CAAGGAGATTGGAAACGGCTGCTTTGAATTCTACCACAAATGCGAC AACACCTGCATGGAAAGTGTCAAGAACGGGACTTATGACTACCCG AAATACTCAGAGGAAGCTAAATTAAACAGAGAGAAAATCGATGGA GTGAAGCTGGACTCCACCAGGATCTACCAGATACTCGCGATCTATT CCACTGTGGCCAGTTCATTGGTGCTGGTAGTCTCCCTGGGTGCTATC AGCTTCTGGATGTGCTCTAATGGTTCTCTTCAGTGTAGAATATGTAT CTGA	1701