

Н. С. Голяк, В. М. Царенков, О. А. Сушинская, О. Г. Сечко, С. С. Мальчёнкова

ДОСТИЖЕНИЯ В ОБЛАСТИ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ мРНК

Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Республика Беларусь

В статье описывается структура естественной эукариотической и синтетической мРНК, влияние модификации составных частей синтетической мРНК на иммуногенность, повышение стабильности и эффективности трансляции. Представлены ключевые открытия и достижения, способствующие появлению мРНК-вакцин как лекарственных препаратов. Описаны этапы производства мРНК вакцин, а также структура липидных наночастиц, как единственно одобренная для клинического использования система доставки мРНК. Представлена краткая характеристика двух первых одобренных мРНК вакцин для профилактики COVID-19: Comirnaty® и Spikevax®. Показано, что обе вакцины имеют оптимизированную структуру мРНК и кодируют S-белок mit, содержащий две мутации K986P и V987P (P2 S, которые гарантируют, что S-белок остается в антигенно оптимальной конформации до слияния. Обе вакцины доставляются в клетки с помощью липидных наночастиц, состоящих из 50% в молярном соотношении ионизированных липидов, 38,5% холестерина, 10% дистеарилфосфотидилхолина и 1,5% пэгиллизованного липида. Производители используют разные ионизированные и пегиллированные липиды. Обе вакцины представляют собой стерильную белую дисперсию, но состав вспомогательных веществ отличается. Одобренные мРНК-вакцины требуют хранения при низких (-20 °C) Spikevax® или сверхнизких температурах (-70 °C) Comirnaty®. В качестве криопротектора используется сахароза. Описаны данные по безопасности применения зарегистрированных вакцин для профилактики COVID-19. Основными нежелательными реакциями являются спайкопатия, неврологические нарушения, возникновение аутоиммунных заболеваний. Показаны перспективы повышения стабильности мРНК вакцин за счет лиофилизации и получения кольцевых мРНК.

Ключевые слова: мРНК, вакцины, структура мРНК, липидные наночастицы (ЛНЧ), катионные липиды, ионизированные липиды, пегиллированные липиды, лиофилизированные мРНК-вакцины, самоамплифицирующиеся мРНК-вакцины, кольцевые мРНК-вакцины, безопасность, эффективность.

ВВЕДЕНИЕ

Вакцинация эффективно снижает заболеваемость и смертность от инфекционных заболеваний. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) вакцины ежегодно предотвращают от 3,5 до 5 миллионов смертей от таких болезней, как дифтерия, столбняк, коклюш, грипп и корь [1]. Для получения вакцин используют различные технологии. Традиционные вакцины представляют собой живые ослабленные (аттенуированные) или инактивированные патогены [2]. Живые вакцины с ослабленной вирулентностью вызывают опасения по поводу их безопасности, поскольку патогены могут вернуться к диким типам и вызвать заболевание у вакцинированных людей, как это было с пероральной вакциной против полиомиелита. Инак-

тированные вакцины более выгодны с точки зрения их более высокой термостабильности и безопасности, но иммунный ответ, который они вызывают, более короткий по продолжительности, чем тот, который вызывают аттенуированные вакцины [3]. Субъединичные вакцины содержат один или несколько антигенов инфекционного патогена вместо целого организма, которые стимулируют иммунный ответ. Такие вакцины обеспечивают повышенную безопасность и стабильность, но требуют адъювантов и/или многократных или бустерных доз для вызова сильного иммунного ответа [2]. В последние несколько десятилетий рекомбинантные вирусные векторы стали многообещающими вакцинными платформами, поскольку они могут вызывать мощные антигенспецифические клеточные и гуморальные иммунные ответы

и не требуют дополнительных адъювантов. Они основаны на доставке вирусных антигенов, вставленных в геном вирусного вектора, который сохранил или утратил способность к репликации. Однако они связаны с высокими рисками для здоровья человека, такими как потенциальная интеграция в геном хозяина или постоянная репликация ослабленной вакцины [4]. Все эти опасения и риски не только требуют дополнительных исследований безопасности, но и задерживают клинические испытания, особенно в разгар пандемии. Отсюда возникает потребность в более безопасных, более эффективных, масштабируемых и быстро разрабатываемых вакцинах.

Матричная рибонуклеиновая кислота (мРНК) широко изучалась с 1989 года в качестве потенциального терапевтического средства для различных заболеваний [5]. Интерес к мРНК обусловлен ее простым и недорогим производством, временной активностью и естественной деградацией в организме человека, а также преимуществами в плане безопасности по сравнению с ДНК-терапией, поскольку она не интегрируется в геном человека и легко доступна для трансляции в белок в цитоплазме клетки. Соответственно, мРНК исследовалась для иммунотерапии рака, замены или дополнения белка *in vivo*, генной инженерии и генетического перепрограммирования, а также вакцин против инфекционных заболеваний. мРНК-вакцины состоят из одноцепочечной мРНК, кодирующей интересующий антиген. Они могут доставляться в виде голый мРНК или быть заключены в системы доставки для облегчения их проникновения в клетки. Попав в цитоплазму, мРНК транслируется в белок, который затем подвергается посттрансляционным модификациям для получения полностью функционального белка. При экспрессии на поверхности клетки он активирует иммунологические реакции и формирует защитный иммунитет [6].

Цель исследования – рассмотреть достижения в области профилактического применения мРНК-вакцин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы формировались на основе официальных литературных источников, опубликованных в базах данных PubMed,

специальных медицинских и фармацевтических изданиях, а также в российской базе научных исследований eLibrary.ru по ключевым словам: мРНК, вакцины, структура мРНК; липидные наночастицы; ионизированные липиды; ПЭГирированные липиды, самоамплифицирующиеся мРНК-вакцины, безопасность мРНК вакцин; эффективность мРНК-вакцин. Методы исследования – обзор, сравнение, анализ и обобщение полученных данных. Всего проанализировали 95 источников, в настоящий обзор включено 66 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идея создания мРНК-вакцин основана на естественных процессах, которые происходят в клетках. Генетическая информация о структуре белков закодирована в ДНК. Как изображено на рисунке 1, ДНК эукариот имеет р-промотор – сайт инициации транскрипции, структурные гены, состоящие из кодирующих областей (экзонов, обозначены цифрами 1,2,3,4,5) и некодирующих областей (интронов, обозначены буквами a,b,c,d), t-терминатор – участок остановки транскрипции [7]. Процесс транскрипции начинается со связывания РНК-полимеразы с промотором, далее по принципу комплементарности копируется весь структурный ген с образованием первичной матричной РНК или пре-мРНК. Во время транскрипции, после образования 25–30 нуклеотидов, происходит кэпирование 5'-конца мРНК. После завершения транскрипции происходит полиаденилирование 3'-конца мРНК. Затем происходит образование функциональной, или зрелой мРНК, которая уже не содержит последовательностей, комплементарных интронам ДНК, а в случае альтернативного сплайсинга не содержит последовательностей, комплементарных интронам и некоторым экзонам ДНК. Зрелая мРНК выходит из ядра клетки в цитоплазму, соединяется с рибосомами, и происходит процесс трансляции – образование белка (рисунок 1). Матричная РНК также может называться информационной РНК (иРНК).

Зрелая мРНК состоит из 5 фрагментов: 5'-кэп, 5'-НТО (нетранслируемая область), кодирующая область (открытая рамка считывания), которая содержит информацию о структуре белка, 3'-НТО, поли(А)хвост. Структура мРНК изображена на рисунке 2.

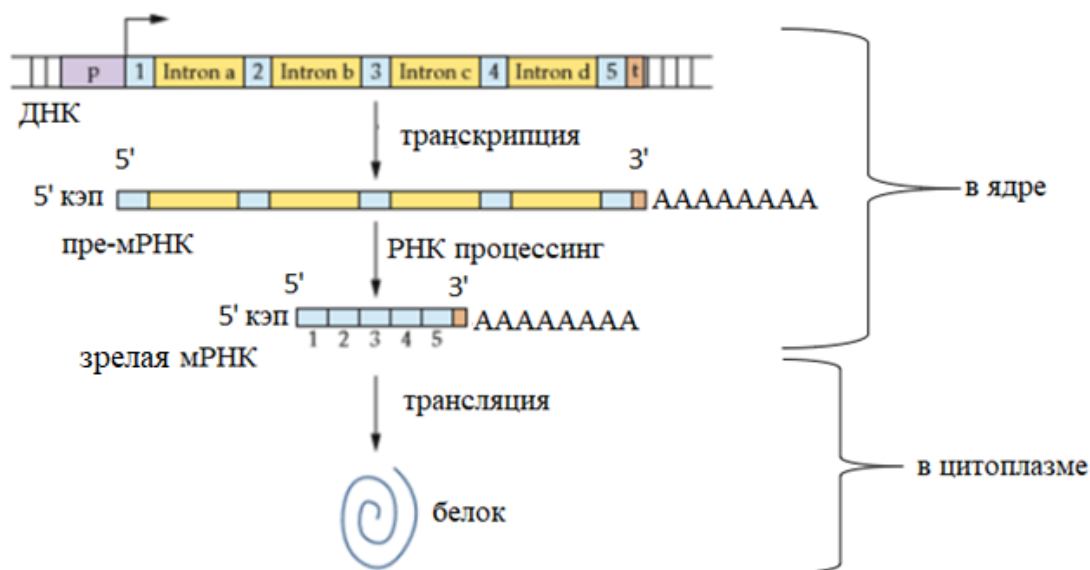


Рисунок 1. – Процесс транскрипции и трансляции в эукариотической клетке

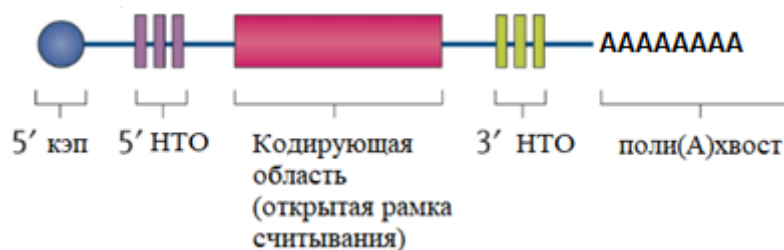


Рисунок 2. – Структура мРНК

Использование мРНК в терапевтических или профилактических целях основано на том, что в кодирующую область мРНК вводится последовательность нуклеотидов, кодирующая желаемый белок. Эта функциональная мРНК доставляется в клетку и является матрицей для синтеза необходимого белка, который оказывает или терапевтическое, или профилактическое действие. Например, белок действует как антиген: его обнаруживает иммунная система организма, и формируется иммунный ответ. Однако от идеи до реализации ее в виде вакцины, одобренной для использования у людей, прошло несколько десятилетий. Этот длительный путь объясняется многочисленными препятствиями. Во-первых, проникновение мРНК в клетки путем пассивной диффузии затруднено из-за высокой молекулярной массы 10^4 - 10^6 Да и высокой плотности отрицательного заряда мРНК. Во-вторых, мРНК характеризуется низкой стабильностью, в организме происходит деградация

мРНК ферментами: 5'-эксонуклеазами, 3'-эксонуклеазами и эндонуклеазами. В-третьих, при распознавании чужеродной мРНК, срабатывает система врожденного иммунитета, которая обеспечивает выработку цитокинов, в результате возникает цитокиновый шторм, который может привести даже к летальному исходу. Все эти явления должны быть учтены при разработке мРНК-вакцины.

В таблице 1 приведена хронология некоторых открытий и достижений, которые сыграли определенную роль в разработке вакцин на основе мРНК.

Структура синтетической мРНК-вакцины

Обычные нереплицирующиеся вакцины на основе мРНК кодируют желаемый антиген для иммуногенной реакции и содержат 5 участков, как и мРНК эукариотической клетки: 5'-кэп, 5'-НТО, кодирующую область, 3'-НТО и поли(А)-хвост (рисунок 2).

Таблица 1. – Хронология некоторых ключевых открытий и достижений в разработке технологии лекарственных средств на основе мРНК

Год	Событие	Источ-ник
1984	Получение синтетической мРНК <i>in vitro</i> . P. Krieg и D. Melton впервые описали метод синтеза микрограммовых количеств эукариотических мРНК путем транскрипции <i>in vitro</i> кДНК и показали, что полученная синтетическая РНК эффективно функционирует как мРНК после инъекции в цитоплазму ооцитов лягушки.	[8]
1989	Осуществление трансфекции мРНК с помощью катионных липидов. R. Malone с соавторами получили липосомы с использованием N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмоний хлорида для трансфекции мРНК люциферазы <i>Photinus pyralis</i> , синтезированной <i>in vitro</i> , в мышинные клетки и показали, что люцифераза проявляет активность. Также авторы продемонстрировали роль 5'-кэп, 5'-НТО и 3'-НТО областей синтезированной мРНК на эффективность трансляции: кэпированная мРНК с 5'-НТО и 3'-НТО бета-глобина продуцировала в 1000 раз больше белка люциферазы, чем мРНК, лишенные этих элементов.	[5]
1993	Открытие того, что мРНК индуцирует клеточный иммунитет. F. Martinon с соавторами иммунизировали мышей липосомами, содержащими мРНК, кодирующую нуклеопротеин вируса гриппа. Эта процедура вызывала индукцию противогриппозных цитотоксических Т-лимфоцитов.	[9]
1995	Открытие того, что мРНК индуцирует гуморальный иммунитет. R. Congy с соавторами сконструировали транскрипты мРНК, кодирующие человеческий карциноэмбриональный антиген (КЭА), которые были кэпированы, полиаденилированы и стабилизированы человеческим β -глобином 5'-НТО и 3'-НТО. Семь мышей получали 50 мкг транскриптов мРНК, кодирующих КЭА, дважды в неделю в течение 5 недель путем внутримышечной инъекции с последующим заражением опухолевыми клетками, экспрессирующими КЭА. Пять из семи мышей, иммунизированных мРНК, продемонстрировали антитела к КЭА через 3 недели после заражения опухолью, тогда как у контрольных мышей не было никаких признаков реакции антител.	[10]
2002	Первое клиническое исследование дендритных клеток, трансфицированных <i>ex vivo</i> мРНК против рака. A. Heiser с соавторами вводили мРНК, кодирующую простат-специфический антиген (ПСА), в аутологичные дендритные клетки (ДК). Возрастающие дозы ДК, трансфицированных мРНК ПСА, вводили 13 субъектам с метастатическим раком предстательной железы. Была доказана безопасность такой вакцины и индукция иммунитета.	[11]
2005	Демонстрация того, что нуклеозидмодифицированные РНК являются не иммуногенными. K. Karikó с коллегами показали, что сигналы РНК передаются через человеческие Toll-подобные рецепторы (TLR): TLR3, TLR7 и TLR8, но включение модифицированных нуклеозидов m5C, m6A, m5U, s2U или псевдоуридина снижает активность. ДК, подвергшиеся воздействию такой модифицированной РНК, экспрессируют значительно меньше цитокинов и маркеров активации, чем те, которые были обработаны немодифицированной РНК. ДК и клетки, экспрессирующие TLR, активно активируются бактериальной и митохондриальной РНК, но не общей РНК млекопитающих, которая в избытке содержится в модифицированных нуклеозидах. Модификация нуклеозидов подавляет потенциал РНК для активации ДК. Поэтому врожденная иммунная система может обнаруживать немодифицированные РНК как средство избирательного реагирования на бактерии или некротическую ткань.	[12]
2008	Доказательство того, что модификация нуклеозидов повышает стабильность РНК и улучшает процесс трансляции. K. Karikó с коллегами обнаружили, что мРНК, содержащие псевдоуридины, обладают более высокой трансляционной способностью, чем немодифицированные мРНК, при тестировании на клетках и лизатах млекопитающих	[13]

Продолжение таблицы 1.

Год	Событие	Источ-ник
	или при внутривенном введении мышам в дозах 0,015–0,15 мг/кг. Даже при более высоких дозах только немодифицированная мРНК была иммуногенной, вызывая высокие уровни интерферона- α в сыворотке. Эти результаты показывают, что модификация нуклеозидов является эффективным подходом для повышения стабильности и трансляционной способности мРНК, одновременно снижая ее иммуногенность <i>in vivo</i> .	
2009	Первое применение прямой инъекции мРНК для лечения рака человека. В. Weide с соавторами вводили внутривенно 21 пациенту с метастатической меланомой стабилизированные протаминам мРНК, кодирующие тирозиназу и еще 5 белков. Была показана низкая токсичность и иммунный ответ на введение. Это исследование было зарегистрировано на сайте www.clinicaltrials.gov под номером #NCT00204607.	[14]
2012	Доказательство того, мРНК-вакцины способны вызвать долгосрочный иммунитет. В. Petsch с коллегами продемонстрировали, что вакцины мРНК вызывают долгосрочный иммунитет к инфекциям вируса гриппа А даже у очень молодых и очень старых мышей и что вакцина остается стабильной при тепловом стрессе. Этот формат вакцины вызывает защиту, зависящую от В- и Т-клеток, и нацелен на несколько антигенов, включая высококонсервативный вирусный нуклеопротеин гриппа.	[15]
2017	Получение персонифицированных мРНК-вакцин. U. Sahin, с соавторами внедрили основанный на РНК полинеоэпитопный подход для мобилизации иммунитета против спектра раковых мутаций. Авторы создали процесс, включающий комплексную идентификацию индивидуальных мутаций, вычислительное прогнозирование неоэпитопов и разработку и производство вакцины, уникальной для каждого пациента и доказали его эффективность на 3 пациентах.	[16]
2020	10 января в сети Интернет была опубликована первая последовательность генома SARS-Cov-2.	[17]
2020	Одобрение для использования у людей двух мРНК-вакцин. Вакцина Spikevax [®] (производитель Moderna) и Comirnaty [®] (производитель Pfizer/BioNTech) в декабре 2020 одобрены FDA для использования у людей для профилактики COVID-19.	[18]
2023	Нобелевская премия по медицине и физиологии вручена Каталин Карико и Дрю Вайсману за исследования по модификации нуклеотидов мРНК, которые позволили создать мРНК-вакцины.	[19]
2023	Разрешены к применению еще две мРНК-вакцины: китайская вакцина AWcorna (производитель Walvax Biotechnology) и индийская HGC019 (производитель Gennova Biopharmaceuticals и HDT Bio Corp).	[20, 21]

5'-конец мРНК содержит фрагмент 7-метилгуанозина (m7G), за которым следует трифосфатный мостик к первому нуклеотиду (m7GpppN). m7GpppN называется 5'-кэпом, который является защитной структурой, защищающей РНК от расщепления экзонуклеазой, регулирует сплайсинг первичной мРНК и иницирует трансляцию мРНК и экспорт мРНК в цитоплазму [22]. 5'-кэп также необходим для распознавания чужеродной мРНК или экзогенной мРНК от собственной мРНК или эндогенной мРНК врож-

денной иммунной системой [23]. мРНК можно модифицировать для повышения ее эффективности и стабильности путем введения множества посттранскрипционных модификаций. Некоторые из них включают 2'-О-метилирование в положении 2'-рибозного кольца в первом нуклеotide (Cap 1, m7GpppN1m) и втором нуклеotide (Cap 2, m7GpppN1mN2m). Эти модификации в структуре 5'-кэпа не только повышают эффективность трансляции мРНК, но и останавливают активацию эндосомальных и цитозольных рецепто-

Таблица 2. – Аналоги, которые могут быть использованы для кэпирования

Аналог кэп	Описание	Преимущества	Недостатки
Первое поколение: метил7гуанозин Кэп (Кэп 0) Эффективность кэпирования 40%.	Самая базовая форма аналогов кэпа, характеризующаяся структурой 7-метилгуанозина (m7G).	Фундаментальная защита и улучшение трансляции мРНК.	мРНК имеет ограниченную стабильность и подвержена деградации РНКазой.
Второе поколение: антиреверсивный аналог кэпа (ARCA) Эффективность кэпирования 80%.	Улучшенная версия кэпа m7G с функциями, препятствующими обратной ориентации, обеспечивающая правильное присоединение к 5'-концу мРНК.	Лучшая стабильность и эффективность перевода по сравнению с первым поколением.	Потенциал для дальнейшего улучшения.
Третье поколение: CleanCap® Эффективность кэпирования до 99,5%.	Последнее поколение аналогов колпачков, использующих передовые методы синтеза для более эффективной и чистой структуры колпачка.	Повышение эффективности и стабильности трансляции, что приводит к сокращению образования побочных продуктов.	Рост затрат и усложнение производственных процессов.

ров, включая RIG-I и MDA5, которые действуют как защитные механизмы против вирусной мРНК [23, 24]. Следовательно, 2'-О-метилование структуры 5'-кэпа является крайне желательным свойством для увеличения и усиления продукции белка из мРНК после ее транскрипции и для блокирования любых нежелательных иммунных реакций со стороны иммунной системы хозяина на антигенную мРНК IVT (*in vitro* транскрибированная). Так как наличие 5'-кэп структуры значимо для эффективности мРНК-вакцин, в таблице 2 приведены подходы, которые могут быть использованы для создания 5'-кэп мРНК-вакцин.

Для добавления 5'-кэпа к молекулам мРНК используются два основных метода, которые могут повысить стабильность мРНК, эффективность трансляции и снизить иммуногенность. Первый подход включает двухэтапную мультиферментную реакцию, где отдельные кэпирующие ферменты обрабатывают некэпированную мРНК IVT [22]. Несмотря на эффективность, этот метод является трудоемким, занимает много времени и может привести к переменной эффективности кэпирования. Второй и более продвинутый подход представляет собой метод ко-транскрипции с использованием технологии CleanCap AG в сочетании с РНК-полимеразой T7 [25]. Этот метод включает структуру кэпа во время синтеза мРНК, устраняя необходимость в каких-либо дополнительных фер-

ментативных этапах. Технология CleanCap AG достигает замечательной эффективности, производя мРНК после реакций IVT с концентрациями до 5 мг/мл и высокой долей (94%) желаемой структуры кэпа 1, что имеет решающее значение для повышенной стабильности и трансляционной активности.

5'- и 3'-НТО

Хотя НТО не транслируются в желаемый антиген или белок, они участвуют в регуляции экспрессии мРНК. Эти НТО содержат регуляторные последовательности, которые связаны со стабильностью мРНК и эффективной и правильной трансляцией мРНК. Они также помогают в распознавании мРНК рибосомами и помогают в посттранскрипционной модификации мРНК [26]. Трансляцию мРНК и ее период полураспада можно улучшить путем включения цис-регуляторных последовательностей в НТО. Кроме того, включение естественных последовательностей, таких как полученные из альфа- и бета-глобинов, широко использовалось для разработки конструкций мРНК для вакцин [27, 28]. С. Zeng и др. спроектировали *de novo* последовательности 5'-НТО на основе содержания гуанина-цитозина (GC) и его (GC) длины для разработки мРНК-вакцин [29].

Открытая рамка считывания (ОРС)
ОРС является критическим фактором

иммуногенности и трансляционной эффективности вакцин мРНК. Кодированная последовательность для целевого антигена тщательно оптимизирована для облегчения сворачивания белка и регуляции эффективности трансляции, при этом оптимизация кодонов играет ключевую роль. Этот процесс вводит функциональные пептиды и обеспечивает совместимость с человеческим трансляционным аппаратом, улучшая синтез белка. Для защиты мРНК от деградации экзонуклеазой увеличивают содержание гуанина и цитозина (GC) и избегают включения редких кодонов в ORC [30].

К. Karikó и D. Weissman показали, что модификация нуклеотидов позволяет избежать распознавания мРНК врожденной иммунной системой, тем самым уменьшив нежелательные иммунные реакции [31]. К. Karikó с соавт. обнаружили, что мРНК, содержащие псевдоуридины, обладают более высокой трансляционной способностью, чем немодифицированные мРНК [13]. В. R. Anderson с соавт. доказали, что усиленная трансляция мРНК, содержащая псевдоуридин, по сравнению с мРНК, содержащей уридин, опосредована сниженной активацией РНК-зависимой протеинкиназы [32].

О. Andries с соавт. продемонстрировали, что мРНК, содержащие модификацию N¹-метилпсевдоуридина (m1Ψ) отдельно и в сочетании с модификацией 5-метилцитидином (m5C), превзошли платформу мРНК, модифицированную только псевдоуридином (Ψ). При этом дважды модифицированные мРНК обеспечили примерно в 44 раза более высокую, а одиночно модифицированные мРНК – в 13 раз более высокую экспрессию репортерного гена при трансфекции в клеточные линии [33]. Авторы также продемонстрировали, что (m5C/) m1Ψ-модифицированная мРНК привела к снижению внутриклеточной врожденной иммуногенности при трансфекции *in vitro* [33].

Модифицированные нуклеотиды могут быть включены во время транскрипции *in vitro* (IVT) для повышения функциональности мРНК. Эти модификации помогают мРНК IVT избежать обнаружения врожденной иммунной системой, тем самым снижая риск неблагоприятных иммунных реакций. Кроме того, они повышают эффективность трансляции мРНК,

обеспечивая более эффективное производство желаемого антигена [34].

Поли(А)-хвост

IVT мРНК имеет полиаденилированную часть на своем 3'-конце, которая известна как поли(А)-хвост. Этот полиаденилированный хвост необходим для определения продолжительности жизни мРНК. Поли(А)-хвосты молекул мРНК, встречающихся в природе в клетках млекопитающих, имеют большую длину, приблизительно 250 нуклеотидов (нт), которая постепенно укорачивается на протяжении всей продолжительности жизни мРНК в цитозоле [35]. Поскольку размер хвоста влияет на деградацию мРНК, включение поли(А)-хвостов желательно при производстве мРНК-вакцин с более длительным периодом полураспада. Добавление приблизительно 100 нт к поли(А)-хвосту может привести к производству мРНК с желаемым продлением деградации [36].

Для синтеза поли(А)-хвостов *in vitro* можно использовать две основные стратегии. Одна из них использует ферменты, такие как поли(А) полимеразы, для синтеза поли(А)-хвостов после завершения транскрипции мРНК, а другая использует ко-транскрипционный синтез, где последовательность поли(А), которая уже присутствует на плазмидной ДНК, напрямую транскрибируется [37].

Производство мРНК-вакцин

Производство мРНК-вакцины состоит из следующих этапов (рисунок 3) [38]:

1) Секвенирование генома патогена, разработка последовательности для целевого антигена и клонирование этой последовательности в плазмидную ДНК после промотора бактериофага.

2) Транскрибирование плазмидной ДНК в мРНК с помощью РНК-полимераз бактериофагов *in vitro*.

3) Очистка транскриптов мРНК с помощью различных видов хроматографии для удаления загрязнений и реагентов.

4) Смешивание очищенной мРНК с липидами в микрофлюидном смесителе для образования липидных наночастиц. Быстрое смешивание заставляет липиды мгновенно инкапсулировать мРНК и осаждаться в виде самоорганизующихся наночастиц.

5) Диализ или фильтрация дисперсии наночастиц для удаления неводных рас-



Рисунок 3. – Схема производства мРНК-вакцины

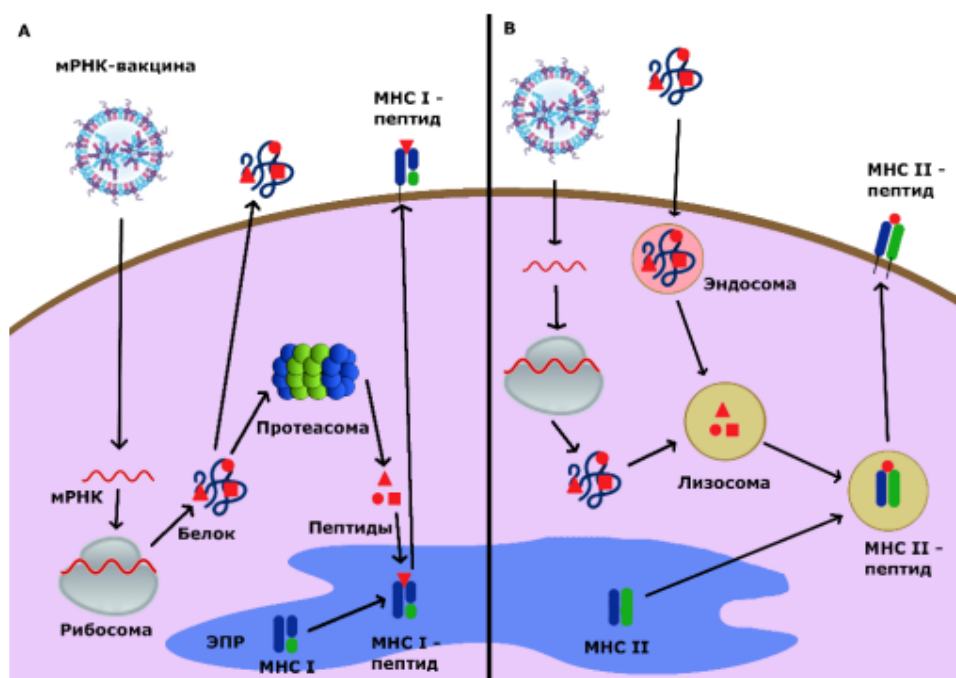
творителей и любой неинкапсулированной мРНК.

б) Хранение очищенных ЛНП во флаконах и использование для вакцинации.

Фармакологический механизм адаптивного иммунного ответа, индуцируемого мРНК-вакцинами

ЛНЧ с мРНК проникают в клетку, где происходит трансляция мРНК рибосомами клетки-хозяина в желаемый антиген-

ный белок (рисунок 4). Синтезированный антигенный белок может реализоваться несколькими путями. В первом случае он поступает в протеасому, где подвергается процессингу и расщепляется на пептиды – антигенные эпитопы. Эти эпитопы переносятся в просвет эндоплазматического ретикулума с помощью транспортных белков ТАР (transporter associated with antigen processing), где связываются с образующимися молекулами МНС I клас-



А – клетки мышц; Б – антигенпрезентирующие клетки
Рисунок 4. – мРНК-вакцинация и презентация антигена

са. Образовавшийся комплекс в составе везикулы направляется к плазматической мембране клетки и экспонируется на поверхности клетки, где распознается рецепторами CD8+Т-лимфоцитов, что приводит к стимуляции специфического цитотоксического клеточного ответа. Во втором случае синтезированный белок может попасть в лизосомы, где антиген расщепляется на пептидные фрагменты под действием кислых протеаз. Лизосома сливается с везикулой, которая несет молекулу МНС II класса. Внутри этой структуры образуется комплекс эпитопа с МНС II. Комплекс транспортируется к мембране клетки и выносится на поверхность, где распознается рецепторами CD4+Т-лимфоцитов. В третьем случае белок может секретироваться из клетки и, встречаясь с В-лимфоцитом, активировать гуморальный иммунный ответ, т. е. синтез антител [39].

Липидные наночастицы

Хотя голая мРНК, липосомы и полиплексы показали клиническую эффективность у людей, ЛНЧ для вакцин мРНК являются единственной системой доставки лекарственных средств, которая продемонстрировала клиническую эффективность и была одобрена для использования человеком. Клиническая эффективность ЛНЧ была впервые продемонстрирована, когда лекарственный препарат Onpattro® (патисиран) был одобрен FDA США для лечения наследственного транстретин-опосредованного амилоидоза в 2018 году [40]. Вакцины мРНК COVID-19 против SARS-CoV-2, разработанные Moderna и Pfizer/BioNTech, используют ЛНЧ для доставки мРНК в организм [40]. Формулы ЛНЧ являются наиболее успешным, эффективным и безопасным методом доставки вакцин мРНК для иммунизации людей. ЛНЧ предлагают многочисленные преимущества для доставки мРНК к месту действия, включая простоту получения и масштабирования, высокоэффективную способность трансфекции, низкий профиль токсичности, модульность, компактность с различными типами и размерами нуклеиновых кислот, защиту мРНК от внутренней деградации и увеличение периода полураспада мРНК-вакцин [41].

Роль ЛНЧ можно разбить на 3 этапа:

1) связывание, конденсация и инкапсуляция молекул мРНК;

2) защита мРНК от рибонуклеаз, присутствующих в организме и окружающей среде;

3) помощь в проникновении в антиген-презентирующие клетки (АПК), пересечении липидной мембраны и достижении цитоплазмы, где может происходить трансляция белка для содействия презентации антигена и формирование иммунного ответа. Обычно ЛНЧ, содержащие мРНК, попадают в АПК, такие как дендритные клетки, посредством эндоцитоза оказываются захваченными внутри эндосомальной везикулы. В отличие от экзогенных антигенов, ЛНЧ-мРНК необходимо покинуть эндосому, чтобы высвободить мРНК в цитоплазму и способствовать трансляции через рибосомы. Когда рН в эндосоме снижается ниже рКа ионизируемых липидов ЛНЧ, эти липиды приобретают положительный заряд и взаимодействуют с анионными липидами в эндосомальной мембране. Пара катионных и анионных липидов принимает форму, известную как пористая гексагональная фаза, которая разрушает эндосому и облегчает высвобождение мРНК в цитоплазму (рисунок 5).

В большинстве случаев молекулы мРНК захватываются в ЛНЧ путем смешивания водной фазы, содержащей мРНК, с этанольной фазой, содержащей липиды, с помощью микрофлюидного смешительного устройства. Органическая фаза обычно состоит из 4 различных типов липидов: ионизированного катионного липида, вспомогательного фосфолипида, холестерина и пегилированного липида в молярном соотношении 50 : 10 : 38,5 : 1,5. Ионизированный катионный липид положительно заряжен при низком рН, что позволяет образовывать комплексы с отрицательно заряженной мРНК, и нейтрален при физиологическом рН, снижая, таким образом, потенциальные цитотоксические эффекты. Выбор ионизируемого липида в составе ЛНЧ играет ключевую роль, так как именно ионизируемый липид влияет на эффективность доставки и экспрессии выбранного антигена, а также на эффективность и переносимость ЛНЧ. Было обнаружено, что ЛНЧ, связанные с ионизируемым катионным аминокислотным липидом, содержащим этаноламинный линкер и кислоточувствительный гидрофобный хвост, вызывают самую высокую экспрессию иммуногена и самые сильные гуморальные и клеточные ответы

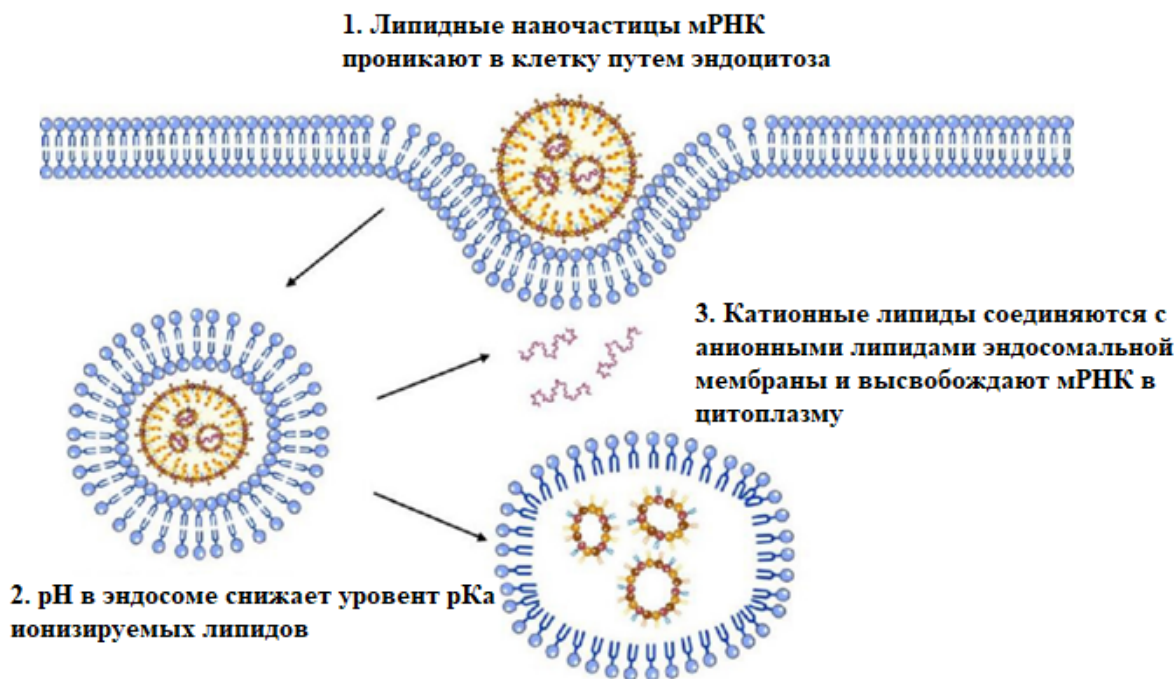
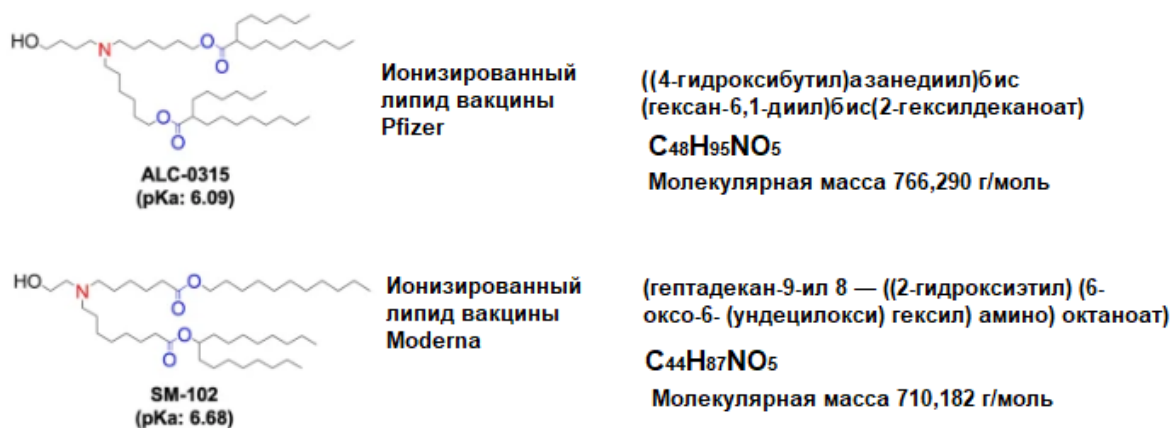


Рисунок 5. – Механизм проникновения липидных наночастиц мРНК в клетку и эндосомального выхода мРНК

[42]. Кроме того, ионизируемые липиды с биоразлагаемыми свойствами и pKa между 6,2 и 6,8 подходят для внутримышечного введения, обеспечения высокой экспрессии антигена, снижения иммуногенности, что в совокупности улучшает переносимость липидных наночастиц.

Множество соединений было протестировано в разных исследованиях, поэтому опишем лишь ионизированные липиды, которые были использованы для получения ЛНЧ в одобренных вакцинах для профилактики COVID-19 (рисунок 6) [43].



Содержание липидов в ЛНЧ (%)

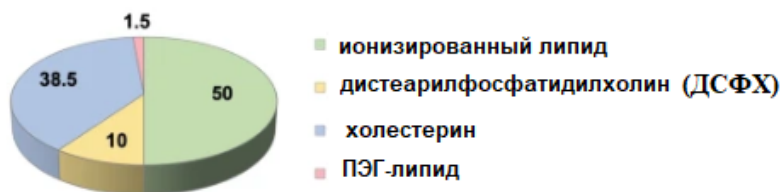


Рисунок 6. – Формулы ионизированных липидов в одобренных вакцинах и соотношение липидов в ЛНЧ

Как видно на рисунке 6, липидные наночастицы, состоят из 50% в молярном соотношении ионизированных липидов, 38,5% холестерина, 10% дистеарилфосфотидилхолина и 1,5% пегилированного липида. ДСФХ обеспечивает стабильную двухслойную структуру липидной наночастицы. Холестерин включен в состав для заполнения пробелов между липидами, поддержания двухслойной структуры и обеспечения подвижности липидных компонентов. Основная функция пегилированного липида заключается в формировании защитного гидрофильного слоя, который стабилизирует ЛНЧ, что обеспечивает

устойчивость во время хранения и снижает опсонизацию сывороточными белками и ретикулоэндотелиальной системой. Поскольку высокое содержание ПЭГлипида может снизить поглощение ЛНЧ клеткой и взаимодействие с эндосомальной мембраной, количественное содержание ПЭГлипида контролируется.

Из-за пандемии COVID-19 исследования в области разработки мРНК-вакцин продвигались очень быстро, и две вакцины были одобрены для использования. В таблице 3 описана краткая характеристика одобренных мРНК-вакцин для профилактики COVID-19 [44, 45].

Таблица 3. – Краткая характеристика мРНК-вакцин для профилактики COVID-19

Производитель	Pfizer/BioNTech	Moderna
Торговое наименование	Comirnaty®	Spikevax®
Лекарственная форма и путь введения	Суспензия (дисперсия) для внутримышечного введения	Суспензия (дисперсия) для внутримышечного введения
Название действующего вещества	Тозинамеран, BNT162b2	Эласомеран, mRNA-1273
Структура действующего вещества	Одноцепочечная мРНК длиной 4284 нуклеотида с 5'-колпачком, полученная путем транскрипции <i>in vitro</i> с матриц ДНК, кодирующих белок вирусного шипа S SARS-CoV-2 (рисунок 7)	Одноцепочечная мРНК длиной 4284 нуклеотида с 5'-колпачком, полученная путем транскрипции <i>in vitro</i> с матриц ДНК, кодирующих белок вирусного шипа S SARS-CoV-2
Состав ЛНЧ: 1. ионизируемый липид 2. вспомогательный фосфолипид 3. вспомогательный липид 4. ПЭГлипид	ALC-0315 дистеарилфосфотидилхолин (ДСФХ) холестерин ALC-0159	SM-102 дистеарилфосфотидилхолин (ДСФХ) холестерин 1,2-димиристоилглицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000 (PEG2000-DMG)
Другие вспомогательные вещества	Калия хлорид, калия дигидрофосфат, натрия хлорид, динатрий фосфат дигидрат, сахароза, вода для инъекций	Трометамол, трометамола гидрохлорид, уксусная кислота, натрия ацетат тригидрат, сахароза, вода для инъекций
Температура хранения	-70 °С (хранить 9 месяцев в морозильной камере при температуре от -90 °С до -60 °С)	-20 °С (хранить 9 месяцев при температуре от -50 °С до -15 °С)
Внешний вид	Белая или беловатая дисперсия рН 6,9–7,9	Белая или беловатая дисперсия рН 7,0–8,0
Способ введения и частота	Вводится внутримышечно, 2 дозы с интервалом 3 недели	Вводится внутримышечно, 2 дозы с интервалом 1 месяц

На рисунке 7 представлена структура мРНК-вакцины Comirnaty®. Она включает оптимальный 5'-кэп, 5'-НТО (3–54

нуклеотиды), сигнальную область (5'–55) (55–102 нуклеотиды), область, кодирующую S-белок mut (103–3879 нуклеотиды),

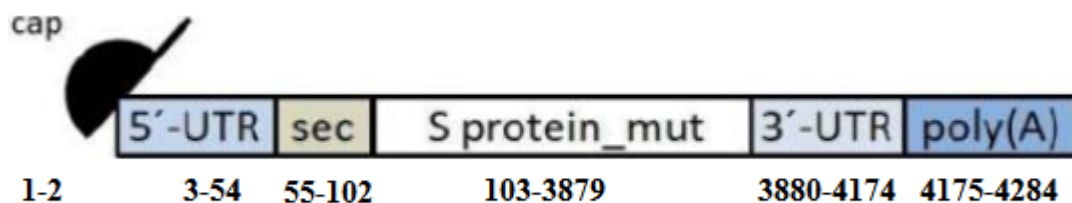


Рисунок 7. – Структура мРНК-вакцины Comirnaty®

3'-НТО (3880–4174 нуклеотиды) и поли(А)-хвост (последние 110 нуклеотидов). ОРС включает S-белок mut – последовательность S-белка, содержащая две мутации K986P и V987P (P2 S). Это означает, что в положении 986 и 987 S-белка образуется два пролина. Эти две мутации гарантируют, что S-белок остается в антигенно оптимальной конформации до слияния. Уридин заменен на метилпсевдоуридин [44].

В структуре мРНК-вакцины Spikevax® также используется оптимизация кодонов ОРС с мутацией K986P и V987P (P2 S) и замена уридина на метилпсевдоуридин [45].

На конец 2023 года было разрешено к применению еще две мРНК-вакцины для профилактики COVID-19. Это китайская

вакцина AWcorna от Walvax Biotechnology и индийская HGC019 от Gennova Biopharmaceuticals и HDT Bio Corp. В отличие от первых двух вакцин, вакцина AWcorna кодирует в себе последовательность RBD белка S коронавируса, а вакцина HGC019 представляет собой самореплицирующуюся мРНК [20, 21].

Безопасность мРНК-вакцин

Несмотря на большое количество научных публикаций, касающихся эффективности использования мРНК-вакцин, вопрос их безопасности остается открытым. На сегодняшний день выделяют несколько патогенетических механизмов возникновения всех нежелательных реакций, связанных с вакцинацией мРНК-вакцинами (таблица 4).

Таблица 4. – Патогенетические механизмы возникновения нежелательных реакций при использовании мРНК-вакцин

Фактор	Механизм
«Спайкопатия»	Прямая токсичность S-белка, экспрессия которого индуцируется вакцинами.
Технология производства	Химическая токсичность липидных наночастиц, которые используются в технологии производства мРНК-вакцин и для их доставки.
Иммунный ответ	Разрушительные эффекты иммунного ответа на S-белок.

Одной из основных теорий возникновения нежелательных реакций на современные вакцины является «спайкопатия» [46]. Спайкопатия – это патогенетический эффект от действия S-белка (шипа) коронавируса, причем данный белок может быть патогенным как из вируса, так и из мРНК-вакцины [47]. Чаще всего спайкопатия проявляется в виде повреждения тканей, воспаления и тромбообразования, что оказывает влияние на сердечно-сосудистую систему. Наиболее частыми нежелательными реакциями являются миокардиты, кардиомиопатии, перикардиты и гипертония, что связано со взаимодействием S-белка с рецептором АПФ2 при проникновении в клетку и брадикининовым штормом

[48]. По информации FDA, возможен риск развития миокардита и перикардита от мРНК-вакцин у молодых мужчин после введения повторной дозы, либо в течение 2 недель после вакцинации, при этом информация о возможных рисках внесена в информационные бюллетени зарегистрированных вакцин [49]. Также имеются данные о возникновении ВИИТ (вакцино-индуцированной иммунной тромботической тромбоцитопении) при использовании векторных вакцин на основе аденовирусов [50].

На основании данных из различных баз по безопасности вакцин неврологические симптомы являются еще одной группой частых побочных эффектов при использовании мРНК-вакцин против COVID-19.

Данные симптомы связаны с ухудшением когнитивных функций и являются характерным поствакцинальным эффектом [51]. Возникновение неврологических нарушений связывают и с особенностями технологии мРНК-вакцин, и с иммунным ответом на них. Поскольку для доставки генных вакцин используют технологию липосом, то в дополнение к отрицательно заряженной мРНК они имеют четыре других компонента, таких как ионизируемые катионные фосфолипиды, нейтральные вспомогательные фосфолипиды, холестерин и модифицированные полиэтиленгликолем фосфолипиды [52]. Ввиду того, что липидные наночастицы проходят через гематоэнцефалический барьер, возможны проявления прямых нейротоксических эффектов, которые тесно связаны с сосудистой и аутоиммунной патологией в нервной системе [53]. В некоторых исследованиях также показано увеличение уровня провоспалительных цитокинов под влиянием модифицированных фосфолипидов [54].

Нельзя не отметить данные об иммунных нарушениях, связанных с использованием мРНК-вакцин. Из-за молекулярной гомологии, S-белок имеет сходное строение с различными белками человека, что может приводить к возникновению аутоиммунных заболеваний, например, таких как синдром Гийена-Барре, либо к их рецидиву [51, 54].

Глобальная сеть данных о вакцинах (GVVDN) оценила неврологические и сердечно-сосудистые заболевания, чтобы выяснить, повышается ли риск их возникновения после вакцинации от COVID-19. Это было одно из восьми исследований в рамках проекта Global COVID Vaccine Safety (GCoVS). Опубликованное по данным этого проекта исследование наблюдаемых и ожидаемых показателей включало 99 миллионов человек из 10 сотрудничающих сайтов в восьми странах. Исследование выявило повышенные риски развития миокардита и перикардита после мРНК-вакцинации, а также синдрома Гийена-Барре, тромбоза церебрального венозного синуса, поперечного миелита и рассеянного энцефаломиелита после применения вакцин на основе вирусного вектора [55, 56].

Кроме специфических нежелательных реакций, для мРНК-вакцин характерно проявление и общих с другими вакцина-

ми симптомов, таких как жар и лихорадка, головная боль, миалгия и артралгия, тошнота, отсутствие аппетита, анафилактический шок.

Несмотря на различный риск возникновения описанных нежелательных реакций, вакцины от COVID-19 прошли самый обширный анализ безопасности, в частности, в истории США. Сайт вакцин FDA, посвященный вакцинам от COVID-19, постоянно обновляется и содержит важные рекомендации по проведению постоянной оценки безопасности после того, как любая вакцина от COVID-19 становится доступной на основании разрешения на экстренное использование (EUA) или получает полное одобрение FDA [57].

Проблемы стабильности мРНК-вакцин

Одобрённые мРНК-вакцины требуют хранения при низких (-20 °C) Spikevax® или сверхнизких температурах (-70 °C) Comirnaty®, что усложняет распространение мРНК-вакцин в условиях ограниченных ресурсов [58]. В результате строгие требования к логистике холодной цепи и хранению этих вакцин значительно ограничивают клиническое применение и распространение мРНК-вакцин из-за отсутствия транспортных связей, холодильных установок или стабильных источников питания [59]. Нестабильность мРНК-ЛНЧ во время хранения в основном вызвана химической деградацией посредством реакций гидролиза и окисления [59]. Когда мРНК хранятся в водной среде в течение длительного времени, остов мРНК будет расщеплен, нарушая ее вторичную структуру. Чтобы преодолеть эту проблему, используют лиофилизацию. Лيوфилизируемая вакцина мРНК цитомегаловируса (ЦМВ) (мРНК-1647) компании Moderna в настоящее время находится на 3-й фазе клинических испытаний и гарантирует срок годности до 18 месяцев при хранении при температуре 5 °C. Исследования A. Gerhardt и соавт. [60] показали, что мРНК-1647 остается стабильной в течение более 8 месяцев при комнатной температуре и более 21 месяца при хранении при температуре 4 °C. L. Ai и соавт. [61] продемонстрировали, что лиофилизованные и восстановленные вакцины мРНК-LNP обеспечивают сопоставимую защиту против варианта COVID-19 Оми-

крон у мышей по сравнению со свежеприготовленными мРНК-ЛНЧ, даже после 6 месяцев хранения при температуре 4 °С или 25 °С. Примечательно, что длительное хранение лиофилизированных мРНК-ЛНЧ не привело к каким-либо значительным изменениям ключевых параметров, включая размер наночастиц, индекс полидисперсности, эффективность инкапсуляции, целостность мРНК или стабильность липидов. Это открытие подчеркивает потенциал лиофилизации как преобразующего подхода для продления срока годности вакцины мРНК, минимизации зависимости от логистики холодовой цепи и облегчения глобального распространения вакцины, особенно в регионах с ограниченной холодильной инфраструктурой.

Лиофилизация включает в себя сублимационную сушку мРНК-ЛНЧ с криопротекторами для предотвращения структурных повреждений, вызванных образованием кристаллов льда. Наиболее распространенными криопротекторами являются сахара, поскольку они образуют защитные матрицы вокруг микрочастиц и поддерживают стабильность [62]. мРНК-вакцины Pfizer-BioNTech и Moderna COVID-19 включают сахарозу, для поддержания целостности ЛНЧ во время замораживания [60]. М. Li и др. [63] показали, что смесь криопротекторов, содержащая 8,8% сахарозы, 2% трегалозы и 0,04% маннита, может улучшить структурную целостность мРНК-ЛНЧ, позволяя им лучше выдерживать колебания температуры, при этом значительно сокращая время лиофилизации. Эти результаты подчеркивают потенциал лиофилизации как критической стратегии для решения проблемы нестабильности мРНК-ЛНЧ, повышения долгосрочной стабильности и устранения зависимости от логистики холодовой цепи.

Другой подход, который может быть реализован для улучшения стабильности и эффективности мРНК, – это самоамплифицирующая мРНК (saRNAs) и кольцевые мРНК (circRNAs). Как saRNAs, так и circRNAs обладают значительным потенциалом для будущей технологии мРНК. SaRNAs получены из геномов альфа-вирусов и содержат репликационный аппарат для амплификации мРНК, что позволяет использовать более низкие дозы для достижения терапевтического эффекта, снижать производственные затраты

и улучшать масштабируемость [64]. Эта способность к амплификации делает их особенно выгодными для усилий по массовой иммунизации. CircRNAs, в отличие от линейных мРНК, не имеют 5'- и 3'-концов, что делает их высокоустойчивыми к деградации, опосредованной экзонуклеазой, и обеспечивает стабильность и длительную экспрессию белка [65]. Ковалентно замкнутая кольцевая структура дополнительно повышает стабильность, что делает их особенно перспективными для вакцин, которым необходимо выдерживать переменные условия хранения [65]. L. Qu и др. продемонстрировали, что инкапсулированные в LNP circRNAs, кодирующие рецептор-связывающий домен (RBD) варианта Omicron, вызывали более сильные иммунные ответы и поддерживали устойчивую экспрессию RBD после двух недель хранения при комнатной температуре (~ 25 °С) по сравнению с обычными линейными мРНК-вакцинами, инкапсулированными в ЛНЧ [66].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структура синтетической мРНК, используемая в качестве вакцины, должна иметь те же составные части, что и зрелая эукариотическая мРНК: 5'-кэп, 5'-НТО, кодирующую область, 3'-НТО и поли(А)-хвост. Каждую составную часть синтетической мРНК необходимо модифицировать для снижения иммуногенности, повышения стабильности и эффективности трансляции. Производство мРНК-вакцин включает такие операции, как секвенирование генома патогена, разработку последовательности для целевого антигена и клонирование этой последовательности в плазмидную ДНК после промотора бактериофага, транскрипцию плазмидной ДНК *in vitro* в мРНК с помощью РНК полимераз бактериофагов, очистку полученных транскриптов и их смешивание с липидами в микрофлюидном смесителе для образования липидных наночастиц, диализ или фильтрацию полученной дисперсии для удаления неводных растворителей и неинкапсулированной мРНК. Липидные наночастицы защищают мРНК от ферментативного разрушения и обеспечивают проникновение в антигенпрезентирующие и

дендритные клетки. Для профилактики COVID-19 одобрены мРНК-вакцины: Spikevax® (производитель Moderna) и Comirnaty® (производитель Pfizer/BioNTech), AWcorna (производитель Walvax Biotechnology) и HGC019 (производитель Gennova Biopharmaceuticals и HDT Bio Corp). Все эти вакцины представлены линейными мРНК: три вакцины нереплицирующиеся и самореплицирующаяся AWcorna. Spikevax® и Comirnaty® показали эффективность в клинической практике, однако среди нежелательных реакций можно отметить спайкопатию, неврологические нарушения, возникновение аутоиммунных заболеваний. Также эти вакцины требуют низких температур хранения -20 °С и -70 °С. Для повышения стабильности перспективно использовать лиофилизацию и разрабатывать кольцевые мРНК-вакцины.

SUMMARY

N. S. Golyak, V. M. Tsarenkov,
O. A. Sushinskaya, O. G. Sechko,
S. S. Malchenkova

ADVANCES IN THE DEVELOPMENT OF mRNA-VACCINES

The article describes the structure of natural eukaryotic and synthetic mRNA, the effect of modification of the components of synthetic mRNA on immunogenicity, increasing stability and translation efficiency. Key discoveries and achievements that contribute to the emergence of mRNA vaccines as drugs are presented. The stages of mRNA vaccine production are described, as well as the structure of lipid nanoparticles as the only mRNA delivery system approved for clinical use. A brief description of the first two approved mRNA vaccines for the prevention of COVID-19: Comirnaty® and Spikevax® is presented. Both vaccines have been shown to have an optimized mRNA structure and encode the S protein mut containing two mutations, K986P and V987P (P2 S, which ensure that the S protein remains in an antigenically optimal conformation prior to fusion. Both vaccines are delivered to cells using lipid nanoparticles composed of 50% molar ionized lipids, 38.5% cholesterol, 10% distearylphosphatidylcholine and 1.5% pegylated lipid. The ionized and pegylated lipids used by the manufacturers differ. Both vaccines are a sterile white dispersion, but the excipient composi-

tion differs. The approved mRNA-vaccines require storage at low (-20 °C) Spikevax® or ultra-low temperatures (-70 °C) Comirnaty®. Sucrose is used as a cryoprotectant. The safety data for the use of registered vaccines for the prevention of COVID-19 are described. The main adverse reactions are adhesion disease, neurological disorders, and the occurrence of autoimmune diseases. The prospects for increasing the stability of mRNA vaccines through lyophilization and obtaining circular mRNA are shown.

Keywords: mRNA, vaccines, mRNA structure, lipid nanoparticles (LNPs), cation lipids, ionized lipids, pegylated lipids, lyophilized mRNA vaccines, self-amplifying mRNA-vaccines, safety, efficacy

ЛИТЕРАТУРА

1. Вакцины и иммунизация / Всемирная организация здравоохранения. – URL: https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab_1 (дата обращения: 12.03.2025).
2. Vaccine technologies and platforms for infectious diseases: current progress, challenges, and opportunities / M. Ghattas, G. Dwivedi, M. Lavertu, M. G. Alameh // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9, N 12. – P. 1490. – DOI: 10.3390/vaccines9121490.
3. Pliaka, V. Risks associated with the use of live-attenuated vaccine poliovirus strains and the strategies for control and eradication of paralytic poliomyelitis / V. Pliaka, Z. Kyriakopoulou, P. Markoulatos // *Expert review of vaccines*. – 2012. – Vol. 11, N 5. – P. 609–628. – DOI: 10.1586/erv.12.28.
4. Humphreys, I. R. Novel viral vectors in infection diseases / I. R. Humphreys, S. Sebastian // *Immunology*. – 2018. – Vol. 153, N 1. – P. 1–9. – DOI: 10.1111/imm.12829.
5. Malone, R. W. Cationic liposome-mediated RNA transfection / R. W. Malone, P. L. Felgner, I. M. Verma // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1989. – Vol. 86, N 16. – P. 6077–6081. – DOI: 10.1073/pnas.86.16.6077.
6. Sahin, U. mRNA-based therapeutics developing a new class of drugs / U. Sahin, K. Karikó, O. Tureci // *Nature reviews. Drug discovery*. – 2014. – Vol. 13, N 10. – P. 759–780. – DOI: 10.1038/nrd4278.
7. Глик, Б. Молекулярная биотехнология / Б. Глик, Дж. Пастернак. – Москва: Мир, 2006. – 588 с.
8. Krieg, P. Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs / P. Krieg, D. A. Melton // *Nucleic acids research*. – 1984. – Vol. 12, N 18. – P. 7057–7070. – DOI: 10.1093/nar/12.18.7057.

9. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA / F. Martinon, S. Krishnan, G. Lenzen [et al.] // *European journal of immunology*. – 1993. – Vol. 23, N 7. – P. 1719–1722. – DOI: 10.1002/eji.1830230749.
10. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector / R. M. Conry, A. F. LoBuglio, M. Wright [et al.] // *Cancer research*. – 1995. – Vol. 55, N 7. – P. 1397–1400.
11. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors / A. Heiser, D. Coleman, J. Dannull [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2002. – Vol. 109, N 3. – P. 409–417. – DOI: 10.1172/JCI14364.
12. Suppression of RNA recognition by Toll-like Receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA / K. Karikó, M. Buckstein, H. Ni, D. Weissman // *Immunity*. – 2005. – Vol. 23, N 2. – P. 165–175. – DOI: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.
13. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability / K. Karikó, H. Muramatsu, F. A. Welsh [et al.] // *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2008. – Vol. 16, N 11. – P. 1833–1840. – DOI: 10.1038/mt.2008.200.
14. Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients / B. Weide, S. Pascolo, B. Scheel [et al.] // *Journal of immunotherapy*. – 2009. – Vol. 32, N 5. – P. 498–507. – DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181a00068.
15. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection / B. Petsch, M. Schnee, A. B. Vogel [et al.] // *Nature biotechnology*. – 2012. – Vol. 30, N 12. – P. 1210–1216. – DOI: 10.1038/nbt.2436.
16. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer / U. Sahin, E. Derhovanessian, M. Miller [et al.] // *Nature*. – 2017. – Vol. 547, N 7662. – P. 222–226. – DOI: 10.1038/nature23003.
17. Holmes, E. C. Novel 2019 coronavirus genome / E. C. Holmes. – 2020. – URL: <http://virological.org/t/novel-2019-coronavirus-genome/319> (date of access: 14.03.2025).
18. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based COVID-19 Vaccine Candidates / E. E. Walsh, R. W. Jr Frenck, A. R. Falsey [et al.] // *The New England journal of medicine*. – 2020. – Vol. 383, N 25. – P. 2439–2450. – DOI: 10.1056/NEJMoa2027906.
19. Nobel Prize in Physiology or Medicine 2023. – URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2023/summary/> (date of access: 16.03.2025).
20. Efficacy and safety of the CVnCoV SARS-CoV-2 mRNA vaccine candidate in ten countries in Europe and Latin America (HERALD): a randomised, observer-blinded, placebo-controlled, phase 2b/3 trial / P. G. Kremsner, R. A. Ahuad Guerrero, E. Arana-Arri [et al.] // *The Lancet. Infectious diseases*. – 2022. – Vol. 22, N 3. – P. 329–340. – DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00677-0.
21. Clinical trial A Phase III Clinical Study of a SARS-CoV-2 Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Vaccine Candidate Against COVID-19 in Population Aged 18 Years and Above. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04847102> (date of access: 12.03.2025).
22. Ramanathan, A. mRNA Capping: biological functions and applications / A. Ramanathan, G. B. Robb, S. H. Chan // *Nucleic acids research*. – 2016. – Vol. 44, N 16. – P. 7511–7526. – DOI: 10.1093/nar/gkw551.
23. 2'-O Methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members / S. Daffis, K. J. Szretter, J. Schriewer [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 468, N 7322. – P. 452–456. – DOI: 10.1038/nature09489.
24. Cowling, V. H. Regulation of mRNA Cap Methylation / V. H. Cowling // *The Biochemical journal*. – 2009. – Vol. 425, N 2. – P. 295–302. – DOI: 10.1042/BJ20091352.
25. Cap 1 messenger RNA synthesis with co-transcriptional CleanCap® analog by in vitro transcription / J. M. Henderson, A. Ujita, E. Hill [et al.] // *Current protocols*. – 2021. – Vol. 1, N 2. – DOI: 10.1002/cpz1.39.
26. Chatterjee, S. Role of 5'- and 3'-Untranslated Regions of mRNAs in human diseases / S. Chatterjee, J. K. Pal // *Biology of the cell*. – 2009. – Vol. 101, N 5. – P. 251–262. – DOI: 10.1042/BC20080104.
27. Polarization of Immunity Induced by Direct Injection of Naked Sequence-Stabilized mRNA Vaccines / J. P. Carralot, J. Probst, I. Hoerr [et al.] // *Cellular and molecular life sciences*. – 2004. – Vol. 61, N 18. – P. 2418–2424. – DOI: 10.1007/s00018-004-4255-0.
28. Control of mammalian translation by mRNA structure near caps / J. R. Babendure, J. L. Babendure, J. H. Ding, R. Y. Tsien // *RNA*. – 2006. – Vol. 12, N 5. – P. 851–861. – DOI: 10.1261/ma.2309906.
29. Leveraging mRNA sequences and nanoparticles to deliver SARS-CoV-2 antigens *in vivo* / C. Zeng, X. Hou, J. Yan [et al.] // *Advanced materials*. – 2020. – Vol. 32, N 40. – P. e2004452. – DOI: 10.1002/adma.202004452.
30. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: structure and stability / L. Schoenmaker, D. Witzigmann, J. A. Kulkarni [et al.] // *International journal of pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 601. – P. 120586. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120586.
31. Karikó, K. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development / K. Karikó, D. Weissman //

Current opinion in drug discovery & development. – 2007. – Vol. 10, N 5. – P. 523–532.

32. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation / B. R. Anderson, H. Muramatsu, S. R. Nallagatla [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2010. – Vol. 38, N 17. – P. 5884–5892. – DOI: 10.1093/nar/gkq347.

33. N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice / O. Andries, S. Mc Cafferty, S. C. De Smedt [et al.] // *Journal of controlled release*. – 2015. – Vol. 217. – P. 337–344. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.08.051.

34. Synthesis of point-modified mRNA / J. Hertler, K. Slama, B. Schober [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2022. – Vol. 50, N 20. – P. e115. – DOI: 10.1093/nar/gkac719.

35. Linear Plasmid Vector for Cloning of Repetitive or Unstable Sequences in *Escherichia coli* / R. Godiska, D. Mead, V. Dhodda [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2010. – Vol. 38, N 6. – P. e88. – DOI: 10.1093/nar/gkp1181.

36. Eckmann, C. R. Control of Poly(A) Tail Length / C. R. Eckmann, C. Rammelt, E. Wahle // *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*. – 2011. – Vol. 2, N 3. – P. 348–361. – DOI: 10.1002/wrna.56.

37. Measuring the tail: Methods for poly(A) tail profiling / A. Brouze, P. S. Krawczyk, A. Dziembowski, S. Mroczek // *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*. – 2023. – Vol. 14, N 1. – P. e1737. – DOI: 10.1002/wrna.1737.

38. Chaudhary, N. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation / N. Chaudhary, D. Weissman, K. A. Whitehead // *Nature reviews. Drug discovery*. – 2021. – Vol. 20, N 11. – P. 817–838. – DOI: 10.1038/s41573-021-00283-5.

39. mRNA technology as one of the promising platforms for the SARS-CoV-2 vaccine development / A. A. Ilyichev, L. A. Orlova, S. V. Sharabrin, L. I. Karpenko // *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii*. – 2020. – Vol. 24, N 7. – P. 802–807. – DOI: 10.18699/VJ20.676.

40. Suzuki, Y. Difference in the lipid nanoparticle technology employed in three approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 vaccine) drugs / Y. Suzuki, H. Ishihara // *Drug metabolism and pharmacokinetics*. – 2021. – Vol. 41. – DOI: 10.1016/j.dmpk.2021.100424.

41. Karam, M. mRNA vaccines: Past, present, future / M. Karam, G. Daoud // *Asian journal of pharmaceutical sciences*. – 2022. – Vol. 17, N 4. – P. 491–522. – DOI: 10.1016/j.ajps.2022.05.003.

42. Lipids and Lipid Derivatives for RNA Delivery / Y. Zhang, C. Sun, C. Wang [et al.] // *Chemical reviews*. – 2021. – Vol. 121, N 20. – P. 12181–12277. – DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00244.

43. Effect of mRNA-LNP components of two globally-marketed COVID-19 vaccines on efficacy and stability / L. Zhang, K. R. More, A. Ojha

[et al.] // *NPJ vaccines*. – 2023. – Vol. 8, N 1. – P. 156. – DOI: 10.1038/s41541-023-00751-6.

44. Public Assessment Report. Authorisation for Temporary Supply. COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 (BNT162b2 RNA) concentrate for solution for injection. – URL: https://assets.publishing.service.gov.uk/media/63529601e90e07768265c115/COVID-19_mRNA_Vaccine_BNT162b2_UK-PFIZER_BIONTECH_ext_of_indication_11.6.2021.pdf (date of access: 12.03.2025).

45. Assessment report COVID-19 Vaccine Moderna. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-previously-COVID-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf (date of access: 12.03.2025).

46. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis / I. P. Trougakos, E. Terpos, H. Alexopoulos [et al.] // *Trends in molecular medicine*. – 2022. – Vol. 28, N 7. – P. 542–554. – DOI: 10.1016/j.molmed.2022.04.007.

47. «Spikeopathy»: COVID-19 spike protein is pathogenic, from both virus and vaccine mRNA / P. I. Parry, A. Lefringhausen, C. Turni [et al.] // *Biomedicine*. – 2023. – Vol. 11, N 8. – P. 2287. – DOI: 10.3390/biomedicine11082287.

48. Potential role of ACE2 in coronavirus disease 2019 (COVID-19) prevention and management / M. Liu, T. Wang, Y. Zhou [et al.] // *Journal of translational internal medicine*. – 2020. – Vol. 8, N 1. – P. 9–19. – DOI: 10.2478/jtim-2020-0003.

49. Coronavirus (COVID-19) | CBER-Regulated Biologics. – URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/industry-biologics/coronavirus-COVID-19-cber-regulated-biologics> (date of access: 12.03.2025).

50. Сугралиев, А. Б. COVID-19-вакциноиндуцированная иммунная тромбоцитопения / А. Б. Сугралиев, П. Чирилло // *Атеротромбоз*. – 2022. – Т. 12, № 1. – С. 114–126. – DOI: 10.21518/2307-1109-2022-12-1-114-126.

51. Колеватых, М. А. МРНК-вакцины: обобщенная озабоченность последствиями на примере вакцин против COVID-19 / М. А. Колеватых // *Медицина*. – 2024. – Т. 12, № 4. – С. 69–84. – DOI: 10.29234/2308-9113-2024-12-4-69-84.

52. The nano delivery systems and applications of mRNA / L. Mingyuan, Y. Li, S. Li [et al.] // *European journal of medicinal chemistry*. – 2022. – Vol. 227. – P. 1–14. – DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113910.

53. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory / S. Ndeupen, Z. Qin, S. Jacobsen [et al.] // *iScience*. – 2021. – Vol. 24, N 12. – P. 1–15. – DOI: 10.1016/j.isci.2021.103479.

54. Autoimmune and autoinflammatory con-

ditions after COVID-19 vaccination. New case reports and updated literature review / Y. Rodríguez, M. Rojas, S. Beltrán [et al.] // *Journal of autoimmunity*. – 2022. – Vol. 132. – P. 1–21. – DOI: 10.1016/j.jaut.2022.102898.

55. Глобальная безопасность вакцин COVID (GCoVS). – URL: https://www.globalvaccinedatanetwork.org/news/99_million_people_included_in_largest_global_vaccine_safety_study (дата обращения: 12.03.2025).

56. COVID-19 vaccines and adverse events of special interest: A multinational Global Vaccine Data Network (GVDN) cohort study of 99 million vaccinated individuals / K. Faksova, D. Walsh, Y. Jiang [et al.] // *Vaccine*. – 2024. – Vol. 42, N 9. – P. 2200–2211. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2024.01.100.

57. Системы отчетности о безопасности вакцин против COVID-19. – URL: <https://www.cdc.gov/vaccine-safety-systems/monitoring/COVID-19.html> (дата обращения: 12.03.2025).

58. Young, R. E. Overcoming the challenge of long-term storage of mRNA-lipid nanoparticle vaccines / R. E. Young, S. I. Hofbauer, R. S. Riley // *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2022. – Vol. 30, N 5. – P. 1792–1793. – DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.04.004.

59. Current landscape of mRNA technologies and delivery systems for new modality therapeutics / R. M. Lu, H. E. Hsu, S. J. L. Perez [et al.] // *Journal of biomedical science*. – 2024. – Vol. 31, N 1. – P. 89. – DOI: 10.1186/s12929-024-01080-z.

60. A flexible, thermostable nanostructured lipid carrier platform for RNA vaccine delivery / A. Gerhardt, E. Voigt, M. Archer M [et al.] // *Molecular therapy. Methods & clinical development*. – 2022. – Vol. 25, N 9. – P. 205–214. – DOI: 10.1016/j.omtm.2022.03.009.

61. Lyophilization mRNA-lipid nanoparticle vaccines with long-term stability and high antigenicity against SARS-CoV-2 / L. Ai, Y. Li, L. Zhou [et al.] // *Cell discovery*. – 2023. – Vol. 9, N 1. – P. 9. – DOI: 10.1038/s41421-022-00517-9.

62. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: structure and stability / L. Schoenmaker, D. Witzgmann, J. A. Kulkarni [et al.] // *International journal of pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 601. – P. 120586. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120586.

63. Lyophilization process optimization and molecular dynamics simulation of mRNA-LNPs for SARSCoV-2 vaccine / M. Li, L. Jia, Y. Xie [et al.] // *NPJ vaccines*. – 2023. – Vol. 8, N 1. – P. 153. – DOI: 10.1038/s41541-023-00732-9.

64. A self-amplifying mRNA SARS-CoV-2 vaccine candidate induces safe and robust protective immunity in preclinical models / G. Maruggi, C. P. Mallett, J. W. Westerbeck [et al.] // *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2022. – Vol. 30, N 5. – P. 1897–1912. – DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.01.001.

65. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs / L. S. Kristensen, M. S. Andersen, L. V. Stagsted [et al.] // *Nature reviews. Genetics*. – 2019. – Vol. 20, N 11. – P. 675–691. – DOI: 10.1038/s41576-019-0158-7.

66. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants / L. Qu, Z. Yi, Y. Shen [et al.] // *Cell*. – 2022. – Vol. 185, N 10. – P. 1728–1744. – DOI: 10.1016/j.cell.2022.03.044.

REFERENCES

1. Vsemirnaia organizatsiia zdravookhraneniia. Vaccines and immunization. URL: https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab_1. (data obrashcheniia: 12.03.2025). (In Russ.)

2. Ghattas M, Dwivedi G, Lavertu M, Alameh MG. Vaccine technologies and platforms for infectious diseases: current progress, challenges, and opportunities. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(12):1490. doi: 10.3390/vaccines9121490

3. Pliaka V, Kyriakopoulou Z, Markoulatos P. Risks associated with the use of live-attenuated vaccine poliovirus strains and the strategies for control and eradication of paralytic poliomyelitis. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(5):609–28. doi: 10.1586/erv.12.28

4. Humphreys IR, Sebastian S. Novel viral vectors in infection diseases. *Immunology*. 2018;153(1):1–9. doi: 10.1111/imm.12829

5. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(16):6077–81. doi: 10.1073/pnas.86.16.6077

6. Sahin U, Karikó K, Tureci O. mRNA-based therapeutics developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(10):759–80. doi: 10.1038/nrd4278

7. Glik B, Pasternak Dzh. *Molecular biotechnology*. Moskva, RF: Mir; 2006. 588 s. (In Russ.)

8. Krieg P, Melton DA. Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res*. 1984;12(18):7057–70. doi: 10.1093/nar/12.18.7057

9. Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, Magné R, Gomard E, Guillet JG, et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol*. 1993;23(7):1719–22. doi: 10.1002/eji.1830230749

10. Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, Sumerel L, Pike MJ, Johanning, F, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res*. 1995;55(7):1397–400

11. Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice MA, Lallas CD, et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest*. 2002;109(3):409–17. doi: 10.1172/JCI14364

12. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman

- D. Suppression of RNA recognition by Toll-like Receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*. 2005;23(2):165–75. doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.008
13. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, S. Akira S, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*. 2008;16(11):1833–40. doi: 10.1038/mt.2008.200
14. Weide B, Pascolo S, Scheel B, Derhovnessian E, Pflugfelder A, Eigentler TK, et al. Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J Immunother*. 2009;32(5):498–507. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181a00068
15. Petsch B, Schnee M, Vogel AB, Lange E, Hoffmann B, Voss D, et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat Biotechnol*. 2012;30(12):1210–6. doi: 10.1038/nbt.2436
16. Sahin U, Derhovnessian E, Miller M, Kloke BP, Simon P, Löwer M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*. 2017;547(7662):222–6. doi: 10.1038/nature23003
17. Holmes EC. Novel 2019 coronavirus genome. 2020. URL: <http://virological.org/t/novel-2019-coronavirus-genome/319> (date of access: 14.03.2025)
18. Walsh EE, Frenck RW Jr, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based COVID-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med*. 2020;383(25):2439–50. doi: 10.1056/NEJMoa2027906
19. Nobel Prize in Physiology or Medicine 2023. URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2023/summary/> (date of access: 16.03.2025)
20. Kremsner PG, Ahuad Guerrero RA, Arana-Arri E, Aroca Martinez GJ, Bonten M, Chandler R, et al. Efficacy and safety of the CVnCoV SARS-CoV-2 mRNA vaccine candidate in ten countries in Europe and Latin America (HERALD): a randomised, observer-blinded, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(3):329–40. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00677-0
21. Clinical trial A Phase III Clinical Study of a SARS-CoV-2 Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Vaccine Candidate Against COVID-19 in Population Aged 18 Years and Above. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04847102> (date of access: 12.03.2025)
22. Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. mRNA Capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(16):7511–26. doi: 10.1093/nar/gkw551
23. Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, Li J, Youn S, Errett J, et al. 2'-O Methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*. 2010;468(7322):452–6. doi: 10.1038/nature09489
24. Cowling VH. Regulation of mRNA Cap Methylation. *Biochem J*. 2009;425(2):295–302. doi: 10.1042/BJ20091352
25. Henderson JM, Ujita A, Hill E, Yousif-Rosales S, Smith C, Ko N, et al. Cap 1 messenger RNA synthesis with co-transcriptional Clean-Cap® analog by in vitro transcription. *Curr Protoc*. 2021;1(2). doi: 10.1002/cpz1.39
26. Chatterjee S, Pal JK. Role of 5'- and 3'-Untranslated Regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell*. 2009;101(5):251–62. doi: 10.1042/BC20080104
27. Carralot JP, Probst J, Hoerr I, Scheel B, Teufel R, Jung G, et al. Polarization of Immunity Induced by Direct Injection of Naked Sequence-Stabilized mRNA Vaccines. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(18):2418–24. doi: 10.1007/s00018-004-4255-0
28. Babendure JR, Babendure JL, Ding JH, Tsien RY. Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA*. 2006;12(5):851–61. doi: 10.1261/rna.2309906
29. Zeng C, Hou X, Yan J, Zhang C, Li W, Zhao W, et al. Leveraging mRNA sequences and nanoparticles to deliver SARS-CoV-2 antigens in vivo. *Adv Mater*. 2020;32(40):e2004452. doi: 10.1002/adma.202004452
30. Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, Verbeke R, Kersten G, Jiskoot W, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: structure and stability. *Int J Pharm*. 2021;601:120586. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120586
31. Karikó K, Weissman D. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Curr Opin Drug Discov Dev*. 2007;10(5):523–32
32. Anderson BR, Muramatsu H, Nallagatla SR, Bevilacqua PC, Sansing LH, Weissman D, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(17):5884–92. doi: 10.1093/nar/gkq347
33. Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt SC, Weiss R, Sanders NN, Kitada T. N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J Control Release*. 2015;217:337–344. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.051
34. Hertler J, Slama K, Schober B, Özren-deci Z, Marchand V, Motorin Y, et al. Synthesis of point-modified mRNA. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(20):e115. doi: 10.1093/nar/gkac719
35. Godiska R, Mead D, Dhodda V, Wu C, Hochstein R, Karsi A, et al. Linear plasmid vector for cloning of repetitive or unstable se-

- quences in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(6):e88. doi: 10.1093/nar/gkp1181
36. Eckmann CR, Rammelt C, Wahle E. Control of Poly(A) Tail Length. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2011;2(3):348–61. doi: 10.1002/wrna.56
37. Brouze A, Krawczyk PS, Dziembowski A, Mroczek S. Measuring the tail: Methods for poly(A) tail profiling. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2023;14(1):e1737. doi: 10.1002/wrna.1737
38. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(11):817–38. doi: 10.1038/s41573-021-00283-5
39. Ilyichev AA, Orlova LA, Sharabrin SV, Karpenko LI. mRNA technology as one of the promising platforms for the SARS-CoV-2 vaccine development. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selekt-sii.* 2020;24(7):802–7. doi: 10.18699/VJ20.676
40. Suzuki Y, Ishihara H. Difference in the lipid nanoparticle technology employed in three approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 vaccine) drugs. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2021;41. doi: 10.1016/j.dmpk.2021.100424
41. Karam M, Daoud G. mRNA vaccines: Past, present, future. *Asian J Pharm Sci.* 2022;17(4):491–522. doi: 10.1016/j.ajps.2022.05.003
42. Zhang Y, Sun C, Wang C, Jankovic KE, Dong Y. Lipids and Lipid Derivatives for RNA Delivery. *ChemRev.* 2021;121(20):12181–277. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00244
43. Zhang L, More KR, Ojha A, Jackson CB, Quinlan BD, Li H, et al. Effect of mRNA-LNP components of two globally-marketed COVID-19 vaccines on efficacy and stability. *NPJ Vaccines.* 2023;8(1):156. doi: 10.1038/s41541-023-00751-6
44. Public Assessment Report. Authorisation for Temporary Supply. COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 (BNT162b2 RNA) concentrate for solution for injection. URL: https://assets.publishing.service.gov.uk/media/63529601e90e07768265c115/COVID-19_mRNA_Vaccine_BNT162b2_UKPAR_PFIZER_BIONTECH_ext_of_indication_11.6.2021.pdf (date of access: 12.03.2025)
45. Assessment report COVID-19 Vaccine Moderna. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-previously-COVID-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf (date of access: 12.03.2025)
46. Trougakos IP, Terpos E, Alexopoulos H, Politou M, Paraskevis D, Scorilas A, et al. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis. *Trends Mol Med.* 2022;28(7):542–54. doi: 10.1016/j.molmed.2022.04.007
47. Parry PI, Lefringhausen A, Turni C, Neil CJ, Cosford R, Hudson NJ, et al. «Spikeopathy»: COVID-19 spike protein is pathogenic, from both virus and vaccine mRNA. *Biomedicines.* 2023;11(8):2287. doi: 10.3390/biomedicines11082287
48. Liu M, Wang T, Zhou Y, Zhao Y, Zhang Y, Li J. Potential role of ACE2 in coronavirus disease 2019 (COVID-19) prevention and management. *J Transl Intl Med.* 2020;8(1):9–19. doi: 10.2478/jtim-2020-0003
49. Coronavirus (COVID-19) | CBER-Regulated Biologics. URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/industry-biologics/coronavirus-COVID-19-cber-regulated-biologics> (date of access: 12.03.2025)
50. Sugraliev AB, Chirillo P. COVID-19 Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia. *Aterotromboz.* 2022;12(1):114–26. doi: 10.21518/2307-1109-2022-12-1-114-126. (In Russ.)
51. Kolevatykh MA. mRNA Vaccines: Valid Concerns About the Impact of COVID-19 Vaccines. *Meditsina.* 2024;12(4):69–84. doi: 10.29234/2308-9113-2024-12-4-69-84. (In Russ.)
52. Mingyuan L, Li Y, Li S, Jia L, Wang H, Li M, et al. The nano delivery systems and applications of mRNA. *Eur J Med Chem.* 2022;227:1–14. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113910
53. Ndeupen S, Qin Z, Jacobsen S, Bouteau A, Estantouli H, Igyártó BZ. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience.* 2021;24(12):1–15. doi: 10.1016/j.isci.2021.103479
54. Rodríguez Y, Rojas M, Beltrán S, Polo F, Camacho-Domínguez L, Morales SD, et al. Autoimmune and autoinflammatory conditions after COVID-19 vaccination. New case reports and updated literature review. *J Autoimmun.* 2022;132:1–21. doi: 10.1016/j.jaut.2022.102898
55. Global COVID Vaccine Safety (GCovS). URL: https://www.globalvaccinedatanetwork.org/news/99_million_people_included_in_largest_global_vaccine_safety_study (data obrashcheniia: 12.03.2025). (In Russ.)
56. Faksova K, Walsh D, Y. Jiang Y, Griffin J, Phillips A, Gentile A, et al. COVID-19 vaccines and adverse events of special interest: A multinational Global Vaccine Data Network (GVDN) cohort study of 99 million vaccinated individuals. *Vaccine.* 2024;42(9):2200–11. doi: 10.1016/j.vaccine.2024.01.100
57. COVID-19 Vaccine Safety Reporting Systems. URL: <https://www.cdc.gov/vaccine-safety-systems/monitoring/COVID-19.html> (data obrashcheniia: 12.03.2025). (In Russ.)
58. Young RE, Hofbauer SI, Riley RS. Overcoming the challenge of long-term storage of mRNA-lipid nanoparticle vaccines. *Mol Ther.* 2022;30(5):1792–3. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.04.004
59. Lu RM, Hsu HE, Perez SJL, Kumari M, Chen GH, Hong, et al. Current landscape of mRNA technologies and delivery systems for new modality therapeutics. *J Biomed Sci.* 2024;31(1):89. doi: 10.1186/s12929-024-01080-z
60. Gerhardt A, Voigt E, Archer M, Reed S, Larson E, Hoeven NV, et al. A flexible, thermostable nanostructured lipid carrier plat-

form for RNA vaccine delivery. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2022;25(9):205–14. doi: 10.1016/j.omtm.2022.03.009

61. Ai L, Li Y, Zhou L, Yao W, Zhang H, Hu Z, et al. Lyophilized mRNA-lipid nanoparticle vaccines with long-term stability and high antigenicity against SARS-CoV-2. *Cell Discov.* 2023;9(1):9. doi: 10.1038/s41421-022-00517-9

62. Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, Verbeke R, Kersten G, Jiskoot W, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: structure and stability. *Int J Pharm.* 2021;601:120586. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120586

63. Li M, Jia L, Xie Y, Ma W, Yan Z, Liu F, et al. Lyophilization process optimization and molecular dynamics simulation of mRNA-LNPs for SARSCoV-2 vaccine. *NPJ Vaccines.* 2023;8(1):153. doi: 10.1038/s41541-023-00732-9

64. Maruggi G, Mallett CP, Westerbeck JW, Chen T, Lofano G, Friedrich K, et al. A self-amplifying mRNA SARS-CoV-2 vaccine candidate induces safe and robust protective immunity in preclinical models. *Mol Ther.* 2022;30(5):1897–

912. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.01.001

65. Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LV, Ebbesen KK, Hansen TB, Kjems J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet.* 2019;20(11):675–91. doi: 10.1038/s41576-019-0158-7

66. Qu L, Yi Z, Shen Y, Lin L, Chen F, Xu Y, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants. *Cell.* 2022;185(10):1728–44. doi: 10.1016/j.cell.2022.03.044

Адрес для корреспонденции:

220116, Республика Беларусь,
г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, корп. 15,
УО «Белорусский государственный
медицинский университет»,
кафедра фармацевтической технологии
с курсом повышения квалификации
и переподготовки,
тел. раб.: +375 17 279-42-54,
e-mail: goliakns@mail.ru,
Голяк Н. С.

Поступила 10.06.2025 г.