

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-246

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ НОВОГО IRES ДЛЯ КОЛЬЦЕВЫХ РНК-ВЕКТОРОВ

STUDYING OF A NOVEL IRES EXPRESSION FOR CIRCULAR RNA-VECTORS

В. М. Вахтинский, И. Л. Тутыхина, А. Ш. Джарулаева, М. М. Шмаров

Национальный исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

V. M. Vakhtinskii, I. L. Tutykhina, A. Sh. Dzharulaeva, M. M. Shmarov

N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ vakhvladimir@yandex.ru

Аннотация

Кольцевые мРНК векторы являются перспективной платформой для создания вакцинальных препаратов. Одним из главных факторов, определяющих уровень экспрессии кольцевых векторов, является внутренний сайт посадки рибосомы IRES (*Interna ribosome entering site*). В работе был создан кольцевой мРНК-вектор, содержащий IRES риновируса B6 и обеспечивающий более чем двухкратный рост экспрессии целевого белка по сравнению с IRES вируса Коксаки B3.

Abstract

Circular mRNA is a perspective vaccine platform. One of the main factors, determining expression level of circular vectors is Internal ribosome entering site (IRES). During this research we obtained circular mRNA vector, containing IRES of Rhinovirus B6, that has at least double time higher expression level against IRES of Coxackie virus B3.

Векторы на основе мРНК в последние годы стали новой платформой для создания не только вакцин, но и терапевтических препаратов. Среди мРНК-векторов выделяют линейные кэп-зависимые и кольцевые кэп-независимые.

Линейные кэп-зависимые векторы являются наиболее изученным и наиболее широко используемыми, ярким примером служат вакцины от коронавируса SARS-CoV-2 [1]. Однако линейные мРНК-векторы обладают такими недостатками, как нестабильный полиадениновый хвост, а также высокая стоимость кэпирования [2].

Кольцевые кэп-независимые векторы являются сравнительно новыми, однако в настоящее время наблюдается рост интереса к этому типу векторов благодаря более продолжительной экспрессии, большей стабильности и меньшей стоимости, чем линейные [3].

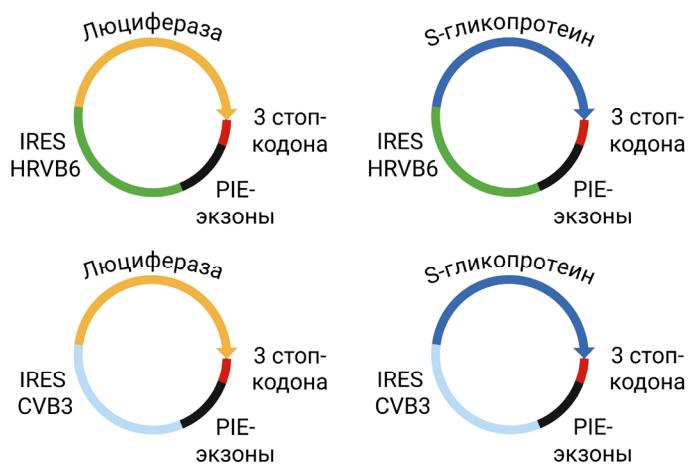
Важнейшим элементом, влияющим на уровень экспрессии целевого белка кольцевыми мРНК-векторами, является внутренний сайт посадки рибосомы (*Interna ribosome entering site*, далее IRES). Наиболее распространенным являются IRES вируса Коксаки B3 (CVB3), а также вирус энцефаломиокардита (ECMV). Однако они обладают низкими уровнями экспрессии, вследствие этого на протяжении последних лет ведутся активные поиски новых IRES, а также модификация существующих векторов [4].

Целью нашей работы являлось изучение экспрессии трансгена кольцевым вектором, содержащим IRES риновируса B6 (HRVB6), и ее сравнение с экспрессией трансгена кольцевым вектором, содержащим распространенным IRES вируса Коксаки B3 (CVB3) *in vitro* на клетках HEK293.

В ходе работы было получено четыре матрицы для синтеза РНК: две, содержащие ген люциферазы и тот или иной IRES, и две, содержащие ген S-гликопротеина коронавируса SARS-CoV-2 штамм Ухань и аналогичные IRES. Синтез мРНК проводился методом *in vitro* транскрипции, их схемы приведены на рисунке.

Далее, полученной РНК была проведена трансфекция клеток HEK 293. Люциферазная активность изменилась через 18 ч после трансфекции. Относительно контрольных клеток вектор, содержащий IRES риновируса B6, показал значения люциферазной активности 3672 ± 146 RLU против 1113 ± 177 RLU у вектора, содержащего IRES вируса Коксаки B3. Разница составила более 3 раз ($P < 0,0001$).

Затем проводилось изучение экспрессия целевого антигена. Для этого проводилась трансфекция клеток HEK 293 кольцевыми векторами, несущими ген S-гликопротеина коронавируса SARS-CoV-2. По прошествии 18 ч после трансфекции клетки лизировались. Измерение количества целевого белка проводилось методом ИФА. Кольцевой вектор, содержащий IRES риновируса B6, показал значения $875 \pm 63,7$ нг/мл против $245 \pm 31,2$ нг/мл (CI 95 %) IRES вируса Коксаки B3. Разница составила более 3,5 раза ($P < 0,0001$).



Схематическое изображение
используемых колыцевых мРНК-векторов

Таким образом, в ходе работы был впервые получен колыцевой РНК вектор, содержащий IRES риновируса Б6, который превосходит распространенный IRES вируса Коксаки Б3 не менее чем в 2,5 раза по уровням экспрессии как люциферазы, так и модельного антигена (S-гликопротеина коронавируса SARS-CoV-2). Эти результаты могут быть использованы при разработке препаратов на основе колыцевых мРНК-векторов или модификации существующих векторов.

В дальнейшем планируется сравнить уровни экспрессии полученных векторов на других типах клеток, а также *in vivo*.

Литература

1. Meo S.A., Bukhari I.A., Akram J. et al. COVID-19 vaccines: comparison of biological, pharmacological characteristics and adverse effects of Pfizer/BioNTech and Moderna Vaccines // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2021. Vol. 25. P. 1663–1669.
2. Leong K. Y., Tham S. K., Poh C. L. Revolutionizing immunization: a comprehensive review of mRNA vaccine technology and applications // Virol. J. 2025. Vol. 22. P. 71.
3. Wan J., Wang Z., Wang L. et al. Circular RNA vaccines with long-term lymph node-targeting delivery stability after lyophilization induce potent and persistent immune responses // mBio. 2024. Vol. 15. P. e0177523.
4. Wesselhoeft R.A., Kowalski P.S., Anderson D.G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells // Nat. Commun. 2018. Vol. 9. P. 2629.