

УДК: 615.371:578.832.1

СИНТЕЗ МРНК-ВАКЦИН, КОДИРУЮЩИХ БЕЛОК М2 И ИСКУССТВЕННЫЕ ИММУНОГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА

Шарабрин С.В., Рудометов А.П., Старостина Е.В., Карпенко Л.И., Бажан С.И., Ильичев А.А.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирской обл., Россия

Вакцинация считается одним из самых эффективных средств профилактики гриппа. Однако постоянная изменчивость вируса гриппа позволяет ему уходить от специфического иммунитета. В связи с этим актуальной задачей является создание вакцин, способных индуцировать иммунный ответ против широкого спектра различных штаммов вируса. Одним из подходов к созданию универсальной вакцины против гриппа является получение мРНК-вакцин, кодирующих искусственные иммуногены, содержащие консервативные фрагменты белков различных субтипов вируса гриппа. Целью данной работы являлось получение мРНК, кодирующих антигены вируса гриппа, с помощью матричного синтеза. В качестве матрицы были использованы ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие консервативный фрагмент стебля гемагглютинина и консервативный белок М2 вируса гриппа. В вышеуказанной работе были оптимизированы условия синтеза РНК с помощью полимеразы фага Т7 с ДНК матрицы, с последующим ее кэпированием и полиаденилированием.

Ключевые слова: мРНК-вакцины, мРНК, грипп

SYNTHESIS OF MRNA VACCINES ENCODING THE M2 PROTEIN AND ARTIFICIAL IMMUNOGENS OF THE INFLUENZA VIRUS

Sharabrin S.V., Rudometov A.P., Starostina E.V., Karpenko L.I., Bazhan S.I., Ilyichev A.A.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Koltsovo Novosibirsk region, Russia

Vaccination is considered one of the most effective means of preventing influenza. However, the variability of the influenza virus allows it to escape from permanent specific immunity. Therefore, an urgent task is to create vaccines capable of inducing an immune response against a wide range of different strains of the human influenza virus. One of the approaches to the creation of a universal vaccine against influenza is the production of mRNA of vaccines encoding genes of artificial immunogens containing conserved fragments of proteins of various subtypes of the influenza virus. The objective of this work was to obtain mRNA vaccines encoding influenza virus antigens using template synthesis. As a template, we used DNA vaccine constructs encoding a conserved fragments of influenza virus hemagglutinin stem and M2 protein. In this work, we optimized the conditions for RNA synthesis using T7 phage polymerase with DNA templates, followed by its capping and polyadenylation.

Key words: mRNA vaccines, mRNA, influenza

Разработка вакцин против гриппа имеет большое значение. Вирус гриппа вызывает миллионы заболеваний и сотни тысяч смертей во всем мире каждый год [4]. Одобрённые вакцины против сезонного гриппа защищают от циркулирующих в настоящее время штаммов, но они не эффективны против дрейфующих сезонных и пандемических вирусов. Вакцины на основе мРНК имеют ряд весьма полезных преимуществ перед другими типами вакцин, включая ДНК вакцины. Они практически безопасны, неинфекционны, не могут интегрироваться в геном клеток. Являются минимальным генетическим вектором и не приводят к анти-векторному иммунному ответу, как это имеет место в случае вирусных векторов, и это даёт возможность вводить мРНК-вакцины многократно. Они способны активизировать оба звена иммунитета – клеточный и гуморальный. Производство вакцин на основе мРНК путем транскрипции *in vitro* — это быстрое, недорогое, масштабируемое и однотипное производство [3].

Цель исследования: получение кандидатов мРНК-вакцин, кодирующих антигены вируса гриппа с использованием матричного синтеза РНК.

Материалы и методы

Для синтеза мРНК использовался набор T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CELLSCRIPT), содержащий необходимые ферменты как для транскрипции, так и для полиаденилирования и экзирования РНК. Для линейаризации ДНК-матриц использовались эндонуклеазы рестрикции AsiGI и CciNI (SibEnzyme). Для выделения продуктов из агарозного геля использовался набор для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (Evrogen). Транфекцию клеток HEK293T контрольной мРНК-GFP проводили с использованием Lipofectamine 3000 (ThermoFisher) по протоколу производителя.

Результаты и обсуждение

Ранее в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» были сконструированы ДНК-вакцинные конструкции pcDNA-AgH1, pcDNA-AgH3 и pcDNA-AgM2 – кандидаты универсальной вакцины против вируса гриппа А. Дизайн искусственных иммуногенов AgH1 и AgH3 был проведен на основе консервативных фрагментов стебля гемагглютинаина двух подтипов вируса гриппа (H1N1 и H3N2, соответственно), а иммуноген AgM2 – на основе консервативного вирусного белка М2. Было показано, что данные конструкции обеспечивают синтез целевого белка в эукариотических клетках HEK293T и вызывают протективный иммунный ответ у мышей. [1,2]

Синтез мРНК, кодирующих AgH1, AgH3 и AgM2, проводился с соответствующих плазмид под контролем промотора фага Т7. Для получения мРНК использовался набор T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CELLSCRIPT) согласно протоколу производителя. Перед процедурой получения РНК плазмидные матрицы были линейаризованы с использованием эндонуклеазы рестрикции AsiGI. Для очистки линейной формы был проведен электрофорез в агарозном геле, с последующим выделением продукта из геля и осаждением этанолом. Реакционная смесь для транскрипции РНК включала в себя 1 мкг линейаризованной матрицы, Т7 полимеразу с буфером, смесь рибонуклеотидов, ингибитор РНКаз и безнуклеазную воду. Смесь инкубировали в течение двух часов при температуре 37 °С. Анализ полученного продукта производили с использованием электрофореза в 2 % агарозном геле. Была зарегистрирована РНК ожидаемого размера (около 850 нуклеотидов для AgH1 и AgH3 и 330 для AgM2). Контроль полиаденилирования также проводили с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле: полиаденилированная РНК заметно «отстает» от нативной РНК, что говорит об увеличении длины молекулы, исходный размер РНК увеличился на 100-150 нуклеотидов во всех 3х случаях (рис.1).

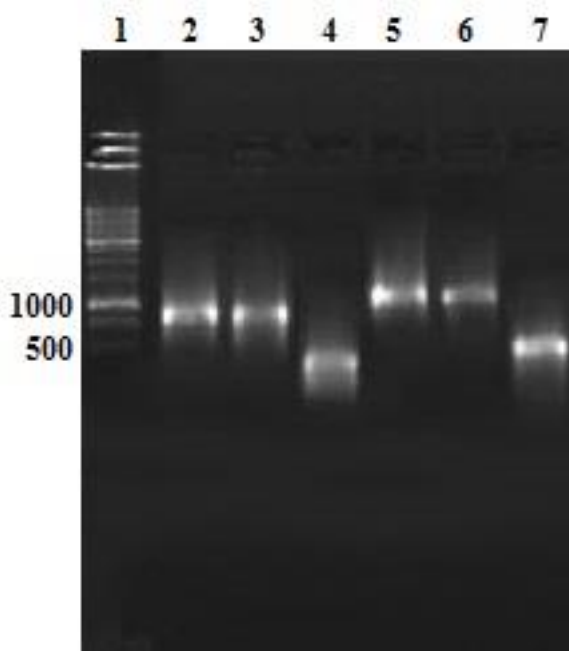


Рис.1. Анализ полиаденилирования РНК. Электрофорез в 2 % агарозном геле. Полиаденилирование мРНК, синтезированной с матрицы pcDNA-AgH1, pcDNA-AgH3 и pcDNA-AgM2. 1 - Маркер M12 (SibEnzyme), 2 - РНК-AgH1 без поли А хвоста, 3 - РНК-AgH3 без поли А хвоста, 4 - РНК-AgM2 без поли А хвоста, 5 - РНК-AgH1с поли А хвостом, 6 - РНК-AgH3с поли А хвостом, 7 - РНК-AgM2 с поли А хвостом.

В качестве контроля экзирования мРНК и её работоспособности использовалась плазида pHMGFP, несущая ген зелёного флуоресцентного белка, под контролем промотора фага Т7. мРНК-GFP была синтезирована в аналогичных условиях, но для линейаризации использовалась эндонуклеаза рестрикции CciNI. При анализе продукта с помощью гель-электрофореза была зарегистрирована

РНК ожидаемого размера (около 700 нуклеотидов). Контроль полиаденилирования также проводили с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле. Кэпирование мРНК оценивали по наличию флюоресценции GFP белка в эукариотических клетках, трансфицированных мРНК-GFP, что свидетельствует о способности мРНК обеспечивать синтез GFP белка клетками. Клеточная культура HEK293T была трансфицирована плазмидой pHMGFP и кэпированной полиаденилированной мРНК-GFP. Флюоресценцию белка GFP оценивали на 2 день после трансфекции с помощью микроскопа Olympus CKX 53 (**Рис.2**). Свечение зелёного цвета наблюдалось в обоих случаях, что говорит об успешном синтезе белка с синтезированной мРНК. Это служило основанием тому, что синтез мРНК с плазмид pcDNA-AgH1, pcDNA-AgH3 и pcDNA-AgM2 прошёл успешно.

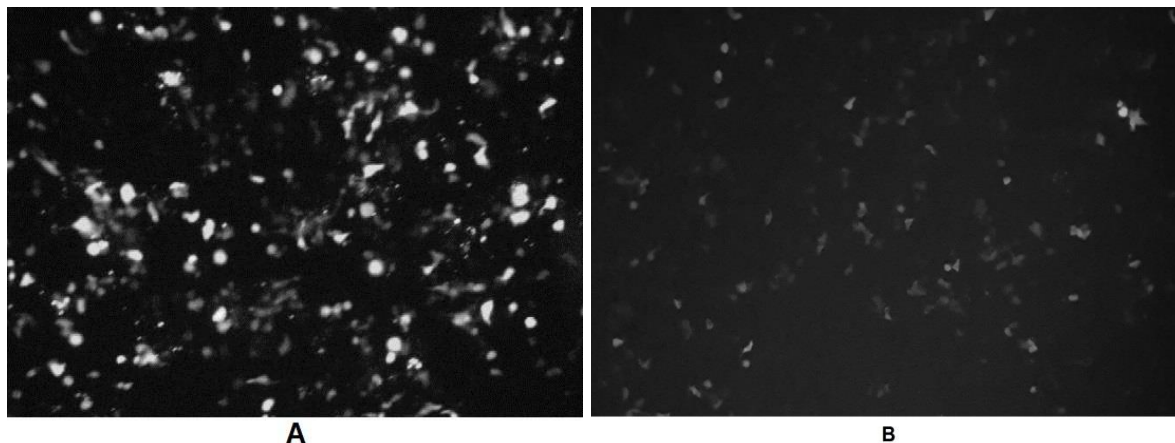


Рис.2. Анализ эффективности кэпирования РНК.

А - Микрофотография клеток HEK293T трансфицированных плазмидой pHMGFP. **В** - Микрофотография клеток HEK293T, трансфицированных кэпированной мРНК-GFP.

Выводы

В ходе работы были оптимизированы условия синтеза РНК с помощью полимеразы фага Т7 с ДНК матрицы, с последующим ее кэпированием и полиаденилированием. Получены необходимые количества кандидатных мРНК-вакцин, кодирующих белок М2 и искусственные антигены, содержащие консервативные фрагменты стебля гемагглютинаина вируса гриппа, для проверки иммуногенности на лабораторных животных.

Литература

1. Старостина Е.В., Каплина О.Н., Карпенко Л.И., Дудко С.Г., Бажан С.И. Исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные антигены вируса гриппа. Российский иммунологический журнал. 2019;22(2-2):1024-1026. <https://doi.org/10.31857/S102872210006484-7>
2. Bazhan, S.; Antonets, D.; Starostina, E.; Ilyicheva, T.; Kaplina, O.; Marchenko, V.; Durymanov, A.; Oreshkova, S.; Karpenko, L. Immunogenicity and Protective Efficacy of Influenza A DNA Vaccines Encoding Artificial Antigens Based on Conservative Hemagglutinin Stem Region and M2 Protein in Mice. Vaccines 2020, 8, 448.
3. Scorza FB, Pardi N. New Kids on the Block: RNA-Based Influenza Virus Vaccines. Vaccines (Basel). 2018;6(2):20. Published 2018 Apr 1. doi:10.3390/vaccines6020020
4. World Health Organization (WHO). Up to 650 000 People Die of Respiratory Diseases Linked to Seasonal Flu Each Year. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/seasonal-flu/en/> (accessed on 20 February 2018).

Сведения об ответственном авторе:

Шарабрин Сергей Валерьевич - младший научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора E-mail: sharabrin_sv@vector.nsc.ru