

## ВЛИЯНИЕ НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ мРНК НА ИММУНОГЕННОСТЬ мРНК-ВАКЦИН ПРОТИВ *M. TUBERCULOSIS* У МЫШЕЙ

Г. С. Шепелькова<sup>1</sup>✉, В. В. Решетников<sup>2,3</sup>, В. Г. Авдиенко<sup>1</sup>, Д. В. Шевырев<sup>2</sup>, В. В. Еремеев<sup>1</sup>, Р. А. Иванов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

<sup>2</sup> Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

<sup>3</sup> Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Вакцинация является одним из наиболее успешных медицинских мероприятий по снижению заболеваемости и смертности от туберкулеза. В 1974 г. вакцинация БЦЖ была включена в Расширенную программу вакцинации, и на сегодня охватывает 80% всех детей на земном шаре. К сожалению, вакцина БЦЖ не защищает от наиболее распространенной формы туберкулеза — туберкулеза легких. Требуется срочно разработать новые стратегии вакцинации, чтобы остановить широкомасштабное распространение инфекции с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. Целью исследования было сравнить способность трех вариантов мРНК-вакцин, кодирующих эпитопы ESAT6, стимулировать формирование адаптивного иммунитета у мышей C57BL/6 (ELISpot, ГЗТ, титры IgG), а также защищать мышей I/St от заражения *M. tuberculosis*. Эффективность упакованных в наноллипидные частицы мРНК-вакцин, различающихся последовательностями нетранслируемых регионов, сравнивали с эффективностью БЦЖ. В полученной нами экспериментальной модели максимальную эффективность по большинству показателей продемонстрировала вакцина 5'-TPL-Esat6-3'-Mod. Таким образом, мРНК-вакцина 5'-TPL-Esat6-3'-Mod может быть рассмотрена в качестве кандидатной для дальнейшей оптимизации, повышения ее эффективности и последующего применения для профилактики туберкулеза.

**Ключевые слова:** мРНК-вакцины, БЦЖ, адаптивный иммунный ответ, туберкулез

**Финансирование:** исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-113, уникальный идентификатор проекта РФ----193021X0001).

**Благодарности:** авторы выражают благодарность сотрудникам АНО ВО «Университет «Сириус» И. М. Теренину за постановку транскрипции *in vitro*, О. В. Заборовой за формулировку мРНК в липидные наночастицы.

**Вклад авторов:** Г. С. Шепелькова — планирование и постановка экспериментов (*in vivo* и *ex vivo*), анализ результатов, написание рукописи; В. В. Решетников — клонирование, подготовка мРНК вакцины, написание рукописи; В. Г. Авдиенко — постановка экспериментов (*in vivo* и *ex vivo*), анализ результатов; Д. В. Шевырев — подготовка мРНК вакцины, анализ результатов; В. В. Еремеев — дизайн исследования, анализ результатов, написание рукописи; Р. А. Иванов — дизайн исследования, написание рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ЦНИИТ» (протокол № 3/2 от 11 мая 2023 г.), проведено в соответствии с Приказом Минздрава № 755 и Руководством Управления по охране лабораторных животных А5502-01.

✉ **Для корреспонденции:** Галина Сергеевна Шепелькова, Яузская аллея, д. 2, 107564, г. Москва, Россия; g.shepelkova@ctri.ru; Василий Владимирович Решетников, Олимпийский пр-т, д. 1, г. Сочи, 354340, Россия; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

**Статья получена:** 17.11.2023 **Статья принята к печати:** 19.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.054

## IMPACT OF UNTRANSLATED mRNA SEQUENCES ON IMMUNOGENICITY OF mRNA VACCINES AGAINST *M. TUBERCULOSIS* IN MICE

Shepelkova GS<sup>1</sup>✉, Reshetnikov VV<sup>2,3</sup>, Avdienko VG<sup>1</sup>, Sheverev DV<sup>2</sup>, Yermeev VV<sup>1</sup>, Ivanov RA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Vaccination is among the most effective measures to reduce tuberculosis morbidity and mortality. In 1974, BCG vaccination was included in the Expanded Program on Immunization. Today, it covers 80% of all children around the globe. Unfortunately, BCG vaccine provides no protection against pulmonary tuberculosis, the most prevalent form of tuberculosis. It is necessary to urgently develop new vaccination strategies to stop large-scale dissemination of infection caused by the multidrug-resistant pathogen. The study was aimed to compare the capabilities of three variants of mRNA vaccines encoding ESAT6 epitopes of stimulating adaptive immune response formation in C57BL/6 mice (ELISpot, delayed hypersensitivity, IgG titers), as well as of protecting I/St mice against *M. tuberculosis* infection. Efficacy of mRNA vaccines comprising different untranslated regions packaged in lipid nanoparticles was compared with that of BCG vaccine. The 5'-TPL-Esat6-3'-Mod vaccine demonstrated the highest efficacy in our experimental model. Thus, the 5'-TPL-Esat6-3'-Mod mRNA vaccine can be considered as a candidate vaccine for further optimization, improving efficacy and subsequent use for prevention of tuberculosis.

**Keywords:** mRNA vaccine, BCG, adaptive immune response, tuberculosis

**Funding:** the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 075-10-2021-113, project ID RF----193021X0001).

**Acknowledgements:** the authors express their gratitude to staff members of the Sirius University of Science and Technology I. M. Terenin for *in vitro* transcription, O. V. Zaborova for mRNA formulation into lipid nanoparticles.

**Author contribution:** Shepelkova GS — planning the experiments and experimental procedure (*in vivo* and *ex vivo*), data analysis, manuscript writing; Reshetnikov VV — cloning, mRNA vaccine preparation, manuscript writing; Avdienko VG — experimental procedure (*in vivo* and *ex vivo*), data analysis; Sheverev DV — mRNA vaccine preparation, data analysis; Yermeev VV — study design, data analysis, manuscript writing; Ivanov RA — study design, manuscript writing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Central Tuberculosis Research Institute (protocol № 3/2 dated 11 May 2023) and conducted in accordance with the Order of the Ministry of Health No. 755 and the Guidelines issued by the Office of Laboratory Animal Welfare (A5502-01).

✉ **Correspondence should be addressed:** Galina S. Shepelkova, Jauzskaja alleja, 2, 107564, Moscow, Russia; g.shepelkova@ctri.ru; Vasily V. Reshetnikov, Olimpiyskiy prospekt, 1, Sochi, 354340, Russia; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

**Received:** 17.11.2023 **Accepted:** 19.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.054

Ежегодно в мире выявляют около 10 млн случаев заболевания активным туберкулезом (ТБ) и около 1,5 млн смертей от него [1]. Поиски новой противотуберкулезной вакцины привели в отчаяние не одно поколение энтузиастов-исследователей. Многочисленные и трудоемкие попытки понять фундаментальные механизмы протективного иммунитета при микобактериальной инфекции привели лишь к осознанию его сложности и не позволили установить надежные иммунологические корреляты протекции и сформировать базу для рационального отбора перспективных вакцин. Ясно, что при разработке вакцин нового поколения необходимо учитывать уникальные особенности эффективного иммунного ответа против соответствующего патогена [2]. Требования к таким вакцинам должны включать: 1) индукцию «правильного» соотношения Т-клеточных субпопуляций и цитокинового спектра при быстрой реакции на заражение в сочетании с индукцией протективного и длительного (иммунологическая память) иммунитета; 2) активацию «правильных» эффекторных механизмов, направленных на предупреждение заражения или элиминацию инфицирующего агента; 3) высокую специфичность в отношении инфицирующего агента во избежание риска аутоагрессии за счет перекрестных антигенов; 4) использование антигенов бактерии, экспрессируемых в хозяине всеми изолятами и штаммами; 5) иммуногенность для всех гаплотипов главного комплекса гистосовместимости (МНС) человеческой популяции.

Важнейшими аспектами для разработки новой эффективной противотуберкулезной вакцины представляются следующие: а) подбор антигенов, их комбинирование и выбор физико-химической природы антигенов (внутриклеточные, ассоциированные с поверхностью или секретруемые белки, гликолипиды, фосфолипиды); б) тип вакцины (цельные белки или пептиды, цельные живые атенуированные или убитые нагреванием бактерии, рекомбинантные бактерии, ДНК-вакцины); в) форма и способ введения вакцины (высокие/низкие дозы, адъюванты, иммуномодулирующие цитокины, иммуностимулирующие последовательности ДНК).

Применение вакцин на основе мРНК — относительно новое направление вакцинологии [3, 4]. Первые экспериментальные мРНК-вакцины были разработаны в начале 1990-х гг. Показано, что они индуцируют как гуморальный, так и клеточный иммунитет *in vivo* [5, 6]. Однако первые носители, используемые для переноса молекул мРНК, имели неблагоприятные профили безопасности, в то время как использование мРНК *per se* приводило к распознаванию нуклеиновых кислот иммунной системой и деградации РНКазами [6]. Эти проблемы были частично преодолены за счет использования в мРНК-молекуле модифицированных нуклеозидов (замена уридина псевдоуридином или другими аналогами), которые помогают избежать индукции опосредованных интерферонами противовирусных путей, которые приводили к разрушению молекул мРНК [7]. В то же время, опосредованная toll-рецепторами активация механизмов врожденного иммунного ответа молекулами мРНК способна повысить эффективность вакцинации [8]. Разработка носителей в виде липидных наночастиц (содержащих пегелированные липиды, холестерин, ионизируемые липиды и фосфолипиды), характеризующихся улучшенным профилем безопасности, повысила эффективность доставки мРНК. В целом, эти достижения привели к росту и постоянному интересу

к использованию мРНК-вакцин для профилактики различных инфекционных заболеваний, преимущественно вирусной природы. В то же время опыт применения мРНК-вакцин против инфекционных заболеваний, вызванных бактериями, крайне ограничен.

Тем не менее, не все мРНК-препараты высокоэффективны. Низкая стабильность РНК в клетке приводит к преждевременной деградации РНК, низкой эффективности трансляции, снижению уровня и продолжительности экспрессии целевого белка [9]. Одну из ключевых ролей в обеспечении стабильности молекул мРНК и эффективности их трансляции играют регуляторные последовательности нетранслируемых областей (5'-UTR и 3'-UTR). Следует отметить, что, несмотря на активные исследования свойств UTR, число исследований, оценивающих вклад отдельных UTR на трансляцию гетерологичных РНК, ограничено [10, 11]. Цель нашего исследования — изучить иммуногенность и протективную активность противотуберкулезных мРНК-вакцин с различными комбинациями последовательностей 5'-UTR и 3'-UTR в экспериментальной модели на мышах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспериментальный дизайн

В эксперименте использовали 65 самок мышей C57BL/6J (B6) и 65 самок мышей I/StSnEgYCit (I/St) весом 20–25 г в возрасте 2–4 месяца из питомника ФГБНУ «ЦНИИТ». Животных содержали в условиях конвенционального вивария при фиксированном световом режиме 12.00 : 12.00 ч и доступом к корму и воде *ad libitum*. Мышей B6 иммунизировали внутримышечно двукратно с интервалом в три недели тремя различными вариантами мРНК-вакцин: mRNA 5'-TPL-Esat6-3'Mod, 5'-Rabb-Esat6-3'EMCV и 5'-Mod-Esat6-3'Mod по 50 мкг РНК на инъекцию (рис. 1). Контрольным животным вводили фосфатный буфер (PBS). Вакцинацию БЦЖ (BCG Pasteur) провели однократно в дозе 100 000 КОЕ/мышь подкожно за пять недель до забора тканей (B6)/инфицирования (I/St).

Восемь животных из каждой группы мышей B6 использовали для оценки гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Оставшихся мышей (пять в каждой группе) использовали для оценки Т-клеточного ответа (ELISpot), а также для оценки титра IgG и IgM к антигенам *M. tuberculosis*. У мышей линии I/St через 50 дней после инфицирования оценивали микобактериальную нагрузку селезенки и легких (пять в каждой группе), а также оценивали динамику гибели мышей после инфицирования.

### Клонирование

С целью получения конструкций для последующей *in vitro* транскрипции РНК в коммерческий вектор pSmart (Lucigen; США) встраивали кассету, содержащую 5'-UTR, 3'-UTR, и последовательность, кодирующую различные эпитопы белка Esat6, которая была описана ранее [12]. В качестве 5'-UTR использовали последовательности 5'-UTR вакцины против SARS-CoV2 фирмы Moderna (США), последовательность трехчастного лидера поздних аденовирусных мРНК (tripartite leader, TPL) или кроличьего β-глобина Rabb (приложение 1). В качестве 3'-UTR использовали последовательность 3'-UTR вакцины против SARS-CoV2 фирмы Moderna или последовательность 3'-UTR вируса энцефаломиокардита EMCV. Фрагменты сшивали

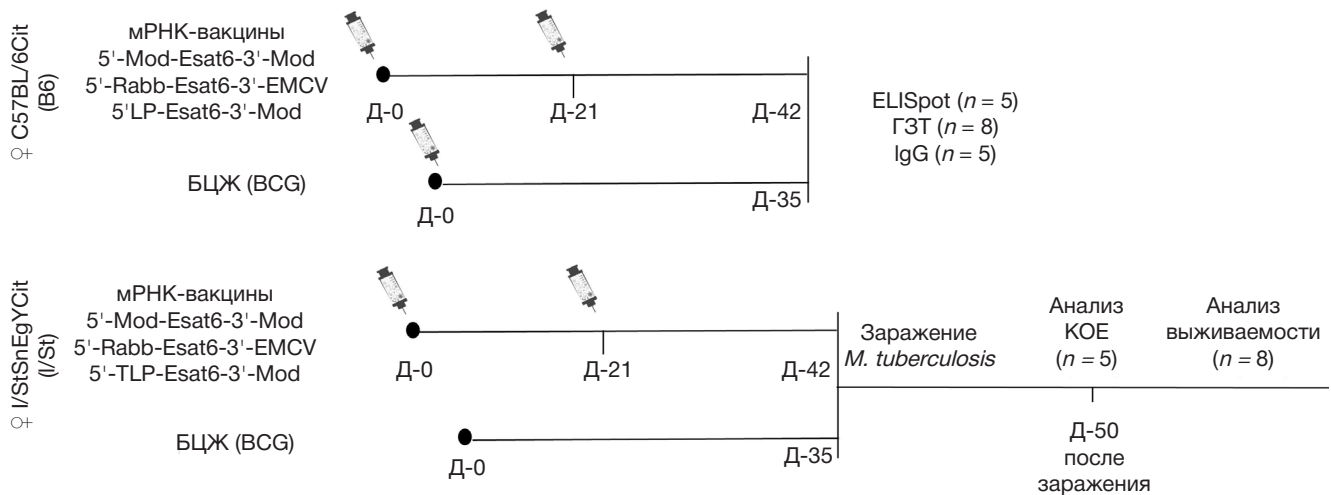


Рис. 1. Экспериментальный дизайн

методом ПЦР с использованием перекрывающихся праймеров. В конструкцию 5'-UTR-Esat6-3'-UTR вводили сайты рестрикции EcoRI и BglII, по которым и осуществляли клонирование в вектор pSmart. Для культивирования использовали штамм NEB-stable (New England Biolabs; UK).

### In vitro транскрипция мРНК

In vitro транскрипцию проводили, как описано ранее [12]. РНК преципитировали добавлением LiCl до концентрации 0,32 M и EDTA (pH 8,0) до концентрации 20 mM с последующей инкубацией на льду в течение часа. Далее раствор центрифугировали в течение 15 мин (25000 g, 4 °C). Осадок РНК промывали 70%-м этанолом, растворяли в ультраочищенной воде и еще раз преципитировали спиртом по стандартной методике. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм.

### Формуляция мРНК в липидные наночастицы

Формуляцию мРНК в липидные наночастицы проводили на приборе NanoAssemblr™ Benchtop (Precision Nanosystems; США), как описано ранее [13]. Компонентами липидной смеси были ионизируемый липидоид ALC-0315 (BroadPharm; США), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) (Avanti Polar Lipids; США), холестерин (Sigma-Aldrich; США), DMG-PEG-2000 (BroadPharm; США); мольное соотношение (%) составляло 46,3 : 9,4 : 42,7 : 1,6.

Концентрацию загруженной в липидные наночастицы мРНК определяли по разнице значений уровня флуоресцентного сигнала при окрашивании реагентом RiboGreen (Thermo Fischer Scientific; США) суспензии частиц до их разрушения и после. Для разрушения частиц использовали детергент Triton X-100 (Sigma-Aldrich; США). Количество инкапсулированной РНК в частицах во всех образцах было более 95% по отношению к общему количеству РНК (инкапсулированная плюс свободная). Размер частиц составил 80–90 нм, индекс полидисперсности — менее 0,15.

### Измерение реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

Через четыре недели после вакцинации реакцию ГЗТ мышей каждой группы (по восемь мышей) оценивали

по набуханию левой задней лапки мыши в ответ на введение 40 мкл PBS, содержащего 50 МЕ очищенного туберкулина (ФГУП «НЦЭСМП» МЗ РФ; Россия) через 48 ч после инъекции. Данные представлены в виде Δ (разность толщины левой и правой лапки в мм).

### Антигены

В качестве антигена в экспериментах ex vivo использовали соникат *M. tuberculosis* H37Rv — растворимую фракцию разрушенных ультразвуком *M. tuberculosis* H37Rv [14].

### Определение титров IgG и IgM к антигенам *M. tuberculosis*

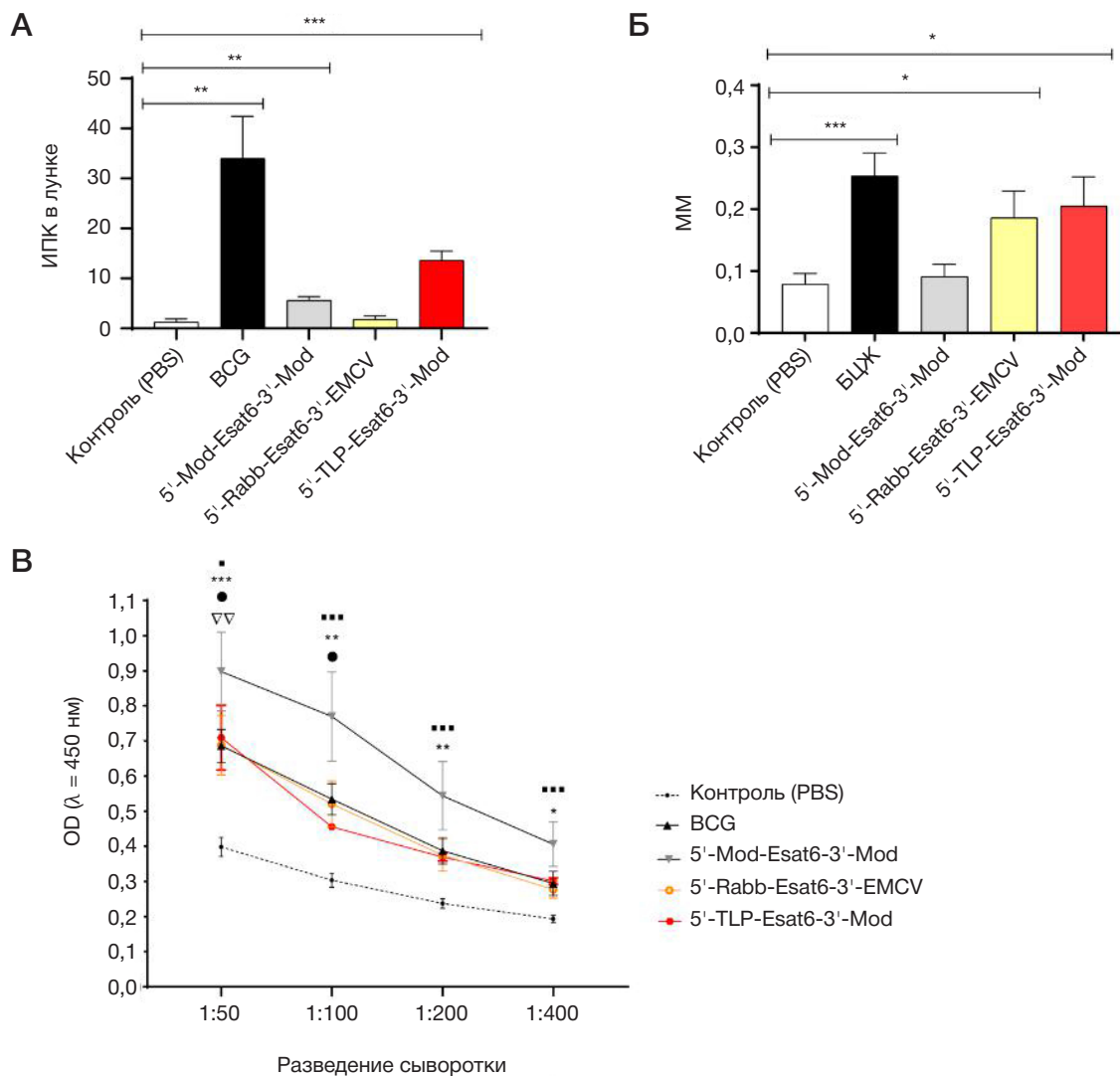
Сыворотку крови мышей использовали для определения титров специфичных антител (IgG и IgM) к микобактериальным антигенам иммуноферментным методом, рутинно применяемым в лаборатории [15, 16]. Для определения антител использовали разведения сыворотки от 1 : 50 до 1 : 400.

### Определение количества IFNγ-продуцирующих клеток

Уровень протективного Т-клеточного иммунного ответа оценивали по количеству спленоцитов, секретирующих IFNγ в ответ на стимуляцию микобактериальными антигенами, методом ELISpot при помощи наборов Mouse IFNγ ELISpot Set (BD NJ; USA) и AEC Substrate Set (BD NJ; USA) в соответствии с рекомендациями изготовителя.

### Оценка протективного ответа

Мышей линии I/St дважды иммунизировали (за 42 и 21 день до инфицирования) мРНК-вакцинными препаратами. Иммунизацию БЦЖ проводили за 35 дней до заражения. Мышей инфицировали вирулентным штаммом *M. tuberculosis* в дозе 500 000 КОЕ/мышь. На 50-й день после заражения определяли количество микобактерий во внутренних органах инфицированных мышей. Для этого стерильно выделяли легкие и селезенки зараженных животных, гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора, готовили серийные десятикратные разведения гомогенатов органов и высевали на чашки Петри с агаром Мидлбука 7H10 по 50 мкл на чашку. Чашки Петри с нанесенными суспензиями инкубировали при 37 °C,



**Рис. 2.** Индукция адаптивного иммунного ответа мРНК-вакцинными препаратами. Мышей линии В6 дважды иммунизировали (за 42-й и 21-й дни до эксперимента) мРНК-вакцинными препаратами. Иммунизацию БЦЖ проводили за 35 дней до эксперимента. В день эксперимента определяли количество ИПК в отвечающих на микобактериальные антигены (А), развитие реакции ГЗТ (Б) и продукцию специфических антител к антигенам микобактерий (В). Представлены средние значения  $\pm$ SEM, где  $n$  — пять мышей в группе для А и В, восемь мышей в группе для Б. А и Б. \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$  по сравнению с контролем. В. \* — достоверное отличие от контроля для вакцины 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV,  $\Delta$  — достоверное отличие от контроля для вакцины 5'-Mod-Esat6-3'-Mod,  $\bullet$  — достоверное отличие от контроля для вакцины 5'-TLP-Esat6-3'-Mod,  $\blacksquare$  — достоверное отличие от контроля для вакцины 5'-TLP-Esat6-3'-Mod

через 21 день подсчитывали количество макроколоний *M. tuberculosis* H37Rv на чашке и пересчитывали их количество на орган.

### Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента, применяя поправку Бонферрони при сравнении более двух групп. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . Данные на рисунках приведены как средние значения  $\pm$  SEM. Для кривых выживания использовали Гехан–Бреслоу–Уилкоксон-тест.

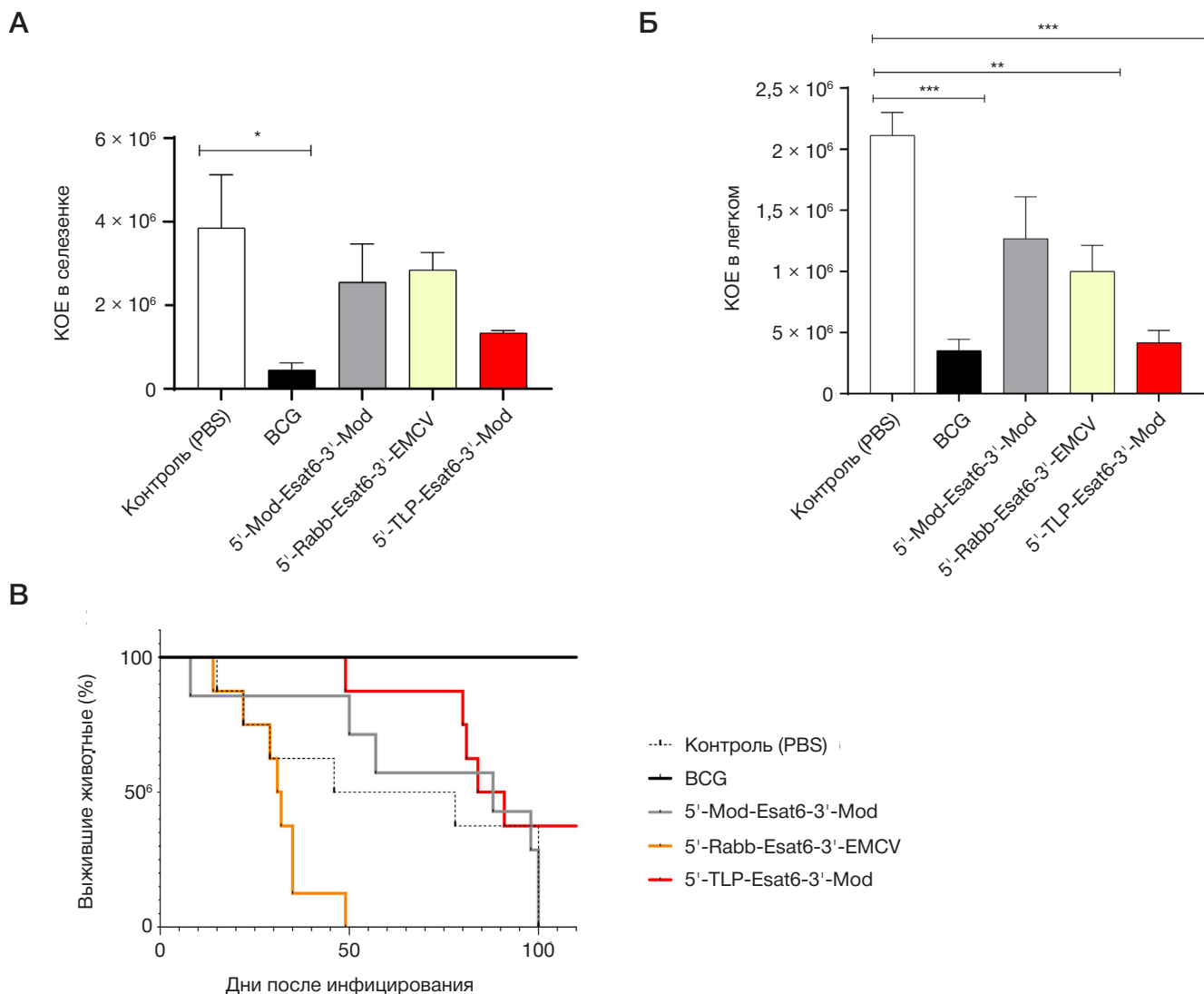
### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуногенность тестируемых вакцин оценивали по их способности индуцировать специфичный клеточный иммунный ответ *ex vivo* (ELIspot) и *in vivo* (ГЗТ), а также специфичный антительный ответ в крови провакцинированных мышей (рис. 2). На рис. 2А представлены результаты определения количества IFN $\gamma$  продуцирующих клеток (ИПК) в селезенках

экспериментальных животных. Достоверные различия с контролем получены для мРНК вакцины 5'-Mod-Esat6-3'-Mod и 5'-TLP-Esat6-3'-Mod ( $p < 0,004$  и  $p < 0,0008$  соответственно). Среди групп животных, проиммунизированных мРНК-вакцинами, по количеству ИПК лидировала группа, получившая 5'-TLP-Esat6-3'-Mod ( $p < 0,004$  и  $p < 0,0004$  в сравнении с мРНК-вакцинами 5'-Mod-Esat6-3'-Mod, 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV соответственно). В то же время максимальное количество ИПК определялось в группе мышей, провакцинированных БЦЖ ( $p < 0,006$ ,  $p < 0,006$  и  $p < 0,03$  в сравнении с мРНК-вакцинами 5'-Mod-Esat6-3'-Mod, 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV и 5'-TLP-Esat6-3'-Mod соответственно).

Развитие реакции ГЗТ достоверно отличалось от контроля в случае иммунизации мышей мРНК-вакциной 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV и 5'-TLP-Esat6-3'-Mod ( $p < 0,04$  для данных групп) и были аналогичны данным, полученным в группе мышей В6, провакцинированных БЦЖ (рис. 2Б). Достоверных различий между группами 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV, 5'-TLP-Esat6-3'-Mod и БЦЖ получено не было.

Исследования формирования гуморального иммунного ответа к мРНК-противотуберкулезным вакцинным



**Рис. 3.** Формирование протективного ответа при иммунизации мРНК-вакцинами. Мышей линии I/St дважды иммунизировали (за 42 и 21 день до инфицирования) мРНК-вакцинными препаратами. Иммунизацию БЦЖ проводили за 35 дней до заражения. Мышей инфицировали вирулентным штаммом *M. tuberculosis* в дозе 500 000 КОЕ/мышь. Через 50 дней после инфицирования оценивали микобактериальную нагрузку селезенки (**А**) и легких (**Б**) инфицированных животных, а также оценивали динамику гибели мышей после инфицирования (**В**). Представлены средние значения  $\pm$ SEM, где  $n$  — пять (**А, Б**) и восемь (**В**) мышей в группе; \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$

препаратам также продемонстрировали различия с контролем. Результаты определения (кривые титрования) АГ-специфичных антител класса IgG представлены на рис. 2В. Все протестированные вакцины, включая БЦЖ, стимулировали продукцию антимикобактериального IgG у проиммунизированных мышей. При этом максимальная выработка АГ-специфичных IgG среди мРНК-вакцин отмечена в ответ на иммунизацию 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV и 5'-TLP-Esat6-3'-Mod (в сравнении с контролем). Между группами 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV, 5'-TLP-Esat6-3'-Mod и БЦЖ достоверных различий получено не было. Уровни продукции АГ-специфичного IgM у вакцинированных мышей не отличались от контрольных (приложение 2). Таким образом, наши результаты показали, что мРНК-вакцины на основе эпитопов Esat6 приводят к индукции адаптивного иммунного ответа. Несмотря на то что все варианты мРНК-вакцин были менее эффективны, чем БЦЖ, мы наблюдали выраженную разницу в их эффективности в зависимости от последовательностей UTR. Наилучшие результаты при использовании вакцины как в тестах на клеточный, так и гуморальный ответ мы наблюдали у мРНК-вакцины 5'-TLP-Esat6-3'-Mod.

Исследование развития протективного ответа проводили на мышах I/St, чувствительных к туберкулезной инфекции. На рис. 3 представлены результаты определения микобактериальной нагрузки инфицированных животных, а также динамика гибели проиммунизированных мышей после заражения. Достоверное снижение количества микобактерий в легочной ткани в сравнении с невакцинированным контролем было выявлено у мышей, проиммунизированных мРНК-вакцинами 5'-Rabb-Esat6-3'-EMCV, 5'-TLP-Esat6-3'-Mod и БЦЖ (рис. 3Б). Причем микобактериальная нагрузка легочной ткани в группах мышей, провакцинированных мРНК-вакциной 5'-TLP-Esat6-3'-Mod и БЦЖ, достоверно не различалась. В селезенке достоверные отличия от неиммунизированного контроля получены только для мышей, провакцинированных БЦЖ (рис. 3А).

Один из основных критериев наличия протективного действия вакцины — увеличение времени жизни животных после инфицирования, поэтому мы сравнили динамику гибели контрольной и экспериментальных групп мышей после заражения. Достоверные отличия от невакцинированного контроля (Гехан-Бреслоу–



Уилкоксон–тест для кривых выживания) были получены для мышей, иммунизированных БЦЖ и мРНК-вакциной 5'-TPL-Esat6-3'-Mod ( $p = 0,0005$  и  $p = 0,04$  соответственно). Также были показаны достоверные различия в динамике гибели мышей I/St, вакцинированных БЦЖ и мРНК-вакциной 5'-TPL-Esat6-3'-Mod ( $p = 0,01$ ) (рис. 3В). Аналогично результатам по индукции адаптивного ответа, мРНК вакцина 5'-TPL-Esat6-3'-Mod показала наилучшие результаты по эффективности среди мРНК-вакцин; лишь она обеспечила снижение смертности по сравнению с невакцинированными животными.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании на модели туберкулезной инфекции у мышей мы показали, что двукратное введение мРНК-вакцин, состоящих из заключенной в липидные частицы кодирующей ряд эпитопов микобактериального белка ESAT6 мРНК, генерирует протективный иммунный ответ, эффективность которого зависит, в том числе, от использованных в составе вакцины нетранслируемых последовательностей мРНК. При этом уровень стимуляции гуморального иммунного ответа разными вариантами вакцины, определяемый по интенсивности продукции специфических антител после вакцинации, существенно отличается от уровня активации клеточного иммунитета, регистрируемого по интенсивности реакций ГЗТ и продукции IFN $\gamma$  (по данным ELISpot).

Исторически сложилось, что при изучении иммунологического ответа на инфекцию, вызванную *M. tuberculosis*, основное внимание уделяли Т-клеткам и макрофагам, поскольку их роль в формировании гранулемы была достаточно полно охарактеризована. В отличие от этого, роль В-клеток в патофизиологии туберкулезной инфекции была изучена относительно мало. Соответственно, большинство разработанных новых противотуберкулезных вакцин сосредоточено на индукции клеточного иммунного ответа [2]. Однако в ряде недавних исследований эффективности противотуберкулезных вакцин на мышах, нечеловекообразных приматах и людях показана значительная индукция антител против *M. tuberculosis*, что может быть связано с наблюдаемой эффективностью вакцин [17]. В настоящем исследовании максимальная протекция (по результатам высеваания микобактерий из легких и выживания мышей после заражения) среди всех мРНК-вакцин достигнута при использовании мРНК-вакцины 5'-TPL-Esat6-3'-Mod. Иммунизация мРНК-вакциной 5'-TPL-Esat6-3'-Mod приводит к формированию выраженного клеточного иммунного ответа и умеренному уровню продукции специфических антимикобактериальных IgG-антител. В то же время иммунизация мышей мРНК-вакциной 5'-Mod-Esat6-3'-Mod стимулирует активную выработку специфических антител, но не сопровождается генерацией защиты и не активирует клеточный компонент адаптивного иммунного ответа.

Мы предполагаем, что различия между тремя мРНК-вакцинами, отличающимися только нетранслируемыми последовательностями, могут быть связаны с длительностью и интенсивностью трансляции мРНК и соответственно различной эффективностью презентации антигенов. Последовательность трехчастного лидера аденовирусов (TPL) действует как энхансер трансляции мРНК вирусных поздних генов и, как полагают, обладает способностью инициировать трансляцию поздних аденовирусных мРНК кэп-независимым способом [18, 19]. Последовательность 5'-UTR TPL состоит из 245 нуклеотидов и имеет сложную вторичную структуру. Показано, что TPL содержит IRES, благодаря которому он способен рекрутировать рибосому независимо от взаимодействия с кэпом [18, 19]. Однако, поскольку независимая от кэпа инициация трансляции активируется только в условиях клеточного стресса, мы предполагаем, что наши результаты по TPL не связаны с инициацией трансляции, независимой от кэпа. Помимо большей длины, последовательность TPL имеет более высокое содержание GC и сильно отрицательную минимальную свободную энергию Гибса ( $\Delta G$ ), что связано с ингибированием трансляции [20]. Напротив, 5'-UTR кроличьего  $\beta$ -глобина (Rabb) и 5'-UTR из вакцины мРНК-1273 (Moderna) имеют длину около 50 нуклеотидов и не содержат сильных вторичных структур [21]. По-видимому, вторичные структуры в 5'-UTR, возникающие без участия РНК-связывающих белков, не оказывают выраженного ингибирующего действия на трансляцию, поскольку могут раскручиваться непосредственно перед инициацией трансляции с помощью фактора eIF4A [22]. В то же время сильная вторичная структура TPL может способствовать привлечению РНК-связывающих белков, которые оказывают позитивное влияние на трансляцию.

Таким образом, наиболее перспективным для дальнейших исследований выглядит мРНК-вакцина 5'-TPL-Esat6-3'-Mod. Несмотря на то что она уступает БЦЖ, дальнейшая оптимизация, включающая увеличение дозы препарата, кэпа или использование аналогов уридина могут повысить ее эффективность. Следующим этапом тестирования мРНК-вакцины 5'-TPL-Esat6-3'-Mod может стать оценка перспективности ее использования для ревакцинации после первичной вакцинации БЦЖ.

## ВЫВОДЫ

Мультиэпитопные вакцины на основе мРНК можно рассматривать в качестве самостоятельной профилактической вакцины, а также в качестве бустерной вакцины против *M. tuberculosis*. Несмотря на то что эффективность исследованных вариантов вакцины ниже, чем у БЦЖ, была выявлена зависимость эффективности от последовательности регуляторных регионов. Наши результаты позволили установить оптимальную комбинацию регуляторных элементов экспрессионной кассеты. Дальнейшая разработка мРНК-вакцины против *M. tuberculosis* будет направлена на увеличение ее эффективности.

## Литература

1. Global tuberculosis report, 2023.
2. Lai R, Ogunola AF, Rakib T, Behar SM. Key advances in vaccine development for tuberculosis-success and challenges. NPJ vaccines. 2023; 8: 158. DOI: 10.1038/s41541-023-00750-7.
3. Self WH, Tenforde MW, Rhoads JP, Gaglani M, Ginde AA, Douin DJ, et al. Comparative Effectiveness of Moderna, Pfizer-BioNTech, and Janssen (Johnson & Johnson) Vaccines in Preventing COVID-19 Hospitalizations Among Adults Without Immunocompromising Conditions — United States, March–August 2021. MMWR. Morbidity and mortality weekly report. 2021; 70: 1337–43, DOI: 10.15585/mmwr.mm7038e1.
4. Melo A, de Macedo LS, Invencao M, de Moura IA, da Gama M,

- de Melo CML, et al. Third-generation vaccines: features of nucleic acid vaccines and strategies to improve their efficiency. *Genes*. 2022; 13. DOI:10.3390/genes13122287.
5. Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, Magne R, Gomard E, Guillet JG, et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *European journal of immunology*. 1993; 23: 1719–22, DOI: 10.1002/eji.1830230749.
  6. Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, Sumerel L, Pike MJ, Johanning F, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer research*. 1995; 55: 1397–400.
  7. Anderson BR, Muramatsu H, Jha BK, Silverman RH, Weissman D, Kariko K. Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L. *Nucleic acids research*. 2011; 39: 9329–38. DOI: 10.1093/nar/gkr586.
  8. Muslimov A, Tereshchenko V, Shevyrev D, Rogova A, Lepik K, Reshetnikov V, et al. The dual role of the innate immune system in the effectiveness of mRNA therapeutics. *International journal of molecular sciences*. 2023; 24. DOI: 10.3390/ijms241914820.
  9. Weng Y, Li C, Yang T, Hu B, Zhang M, Guo S, et al. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnology advances*. 2020; 40: 107534. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107534.
  10. Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, Plaschke A, Kranz LM, Fesser S, et al. Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2019; 27: 824–36. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.12.011.
  11. Cao J, Novoa EM, Zhang Z, Chen WCW, Liu D, Choi GCG, et al. High-throughput 5' UTR engineering for enhanced protein production in non-viral gene therapies. *Nature communications*. 2021; 12: 4138. DOI: 10.1038/s41467-021-24436-7.
  12. Vasileva O, Tereshchenko TV, Krapivin B, Muslimov A, Kukushkin I, Pateev I, et al. Immunogenicity of full-length and multi-epitope mRNA vaccines for M. Tuberculosis as demonstrated by the intensity of T-cell response: a comparative study in mice. *Bulletin of RSMU*. 2023; 03: 42–48. DOI: 10.24075/brsmu.2023.021.
  13. Kirshina AS, Kazakova AA, Kolosova ES, Imasheva EA, Vasileva OO, Zaborova OV, et al. Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice. *Bulletin of RSMU*. 2022; 6. DOI: 10.24075/brsmu.2022.068.
  14. Avdienko VG, Babaian SS, Guseva AN, Kondratiuk NA, Rusakova LI, Averbakh MM, et al. Quantitative, spectral, and serodiagnostic characteristics of antimycobacterial IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh*. 2006; 47–55.
  15. Nikonenko BV, Apt AS, Mezhlumova MB, Avdienko VG, Yeremeev VV, Moroz AM. Influence of the mouse Bcg, Tbc-1 and xid genes on resistance and immune responses to tuberculosis infection and efficacy of bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination. *Clinical and experimental immunology*. 1996; 104: 37–43, DOI: 10.1046/j.1365-2249.1996.d01-643.x.
  16. Kozlova IV, Avdienko VG, Babayan SS, Andrievskaya Yu, Gergert VY. Diagnosis of Bactec samples by immunoglobulins of mouse hyperimmune sera obtained against modified antigens of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2019; 97: 25–30.
  17. Rijnink WF, Ottenhoff THM, Joosten SA. B-Cells and Antibodies as Contributors to Effector Immune Responses in Tuberculosis. *Frontiers in immunology*. 2021; 12: 640168. DOI: 10.3389/fimmu.2021.640168.
  18. Logan J, Shenk T. Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984; 81: 3655–9. DOI: 10.1073/pnas.81.12.3655.
  19. Kaufman RJ. Identification of the components necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82: 689–93. DOI: 10.1073/pnas.82.3.689.
  20. Sample PJ, Wang B, Reid DW, Presnyak V, McFadyen IJ, Morris DR, et al. Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay. *Nature biotechnology*. 2019; 37: 803–9. DOI: 10.1038/s41587-019-0164-5.
  21. Kozak M. Features in the 5' non-coding sequences of rabbit alpha and beta-globin mRNAs that affect translational efficiency. *Journal of molecular biology*. 1994; 235: 95–110. DOI: 10.1016/s0022-2836(05)80019-1.
  22. Kumari S, Bugaut A, Huppert JL, Balasubramanian S. An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nature chemical biology*. 2007; 3: 218–21. DOI: 10.1038/nchembio864.

## References

1. Global tuberculosis report, 2023.
2. Lai R, Ogunsola AF, Rakib T, Behar SM. Key advances in vaccine development for tuberculosis-success and challenges. *NPJ vaccines*. 2023; 8: 158. DOI: 10.1038/s41541-023-00750-7.
3. Self WH, Tenforde MW, Rhoads JP, Gaglani M, Ginde AA, Douin DJ, et al. Comparative Effectiveness of Moderna, Pfizer-BioNTech, and Janssen (Johnson & Johnson) Vaccines in Preventing COVID-19 Hospitalizations Among Adults Without Immunocompromising Conditions — United States, March–August 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 2021; 70: 1337–43, DOI: 10.15585/mmwr.mm7038e1.
4. Melo A, de Macedo LS, Invencao M, de Moura IA, da Gama M, de Melo CML, et al. Third-generation vaccines: features of nucleic acid vaccines and strategies to improve their efficiency. *Genes*. 2022; 13. DOI:10.3390/genes13122287.
5. Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, Magne R, Gomard E, Guillet JG, et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *European journal of immunology*. 1993; 23: 1719–22, DOI: 10.1002/eji.1830230749.
6. Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, Sumerel L, Pike MJ, Johanning F, et al. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer research*. 1995; 55: 1397–400.
7. Anderson BR, Muramatsu H, Jha BK, Silverman RH, Weissman D, Kariko K. Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L. *Nucleic acids research*. 2011; 39: 9329–38. DOI: 10.1093/nar/gkr586.
8. Muslimov A, Tereshchenko V, Shevyrev D, Rogova A, Lepik K, Reshetnikov V, et al. The dual role of the innate immune system in the effectiveness of mRNA therapeutics. *International journal of molecular sciences*. 2023; 24. DOI: 10.3390/ijms241914820.
9. Weng Y, Li C, Yang T, Hu B, Zhang M, Guo S, et al. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnology advances*. 2020; 40: 107534. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107534.
10. Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, Plaschke A, Kranz LM, Fesser S, et al. Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2019; 27: 824–36. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.12.011.
11. Cao J, Novoa EM, Zhang Z, Chen WCW, Liu D, Choi GCG, et al. High-throughput 5' UTR engineering for enhanced protein production in non-viral gene therapies. *Nature communications*. 2021; 12: 4138. DOI: 10.1038/s41467-021-24436-7.
12. Vasileva O, Tereshchenko TV, Krapivin B, Muslimov A, Kukushkin I, Pateev I, et al. Immunogenicity of full-length and multi-epitope mRNA vaccines for M. Tuberculosis as demonstrated by the intensity of T-cell response: a comparative study in mice. *Bulletin of RSMU*. 2023; 03: 42–48. DOI: 10.24075/brsmu.2023.021.
13. Kirshina AS, Kazakova AA, Kolosova ES, Imasheva EA, Vasileva OO, Zaborova OV, et al. Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice. *Bulletin of RSMU*. 2022; 6. DOI: 10.24075/brsmu.2022.068.
14. Avdienko VG, Babaian SS, Guseva AN, Kondratiuk NA, Rusakova LI, Averbakh MM, et al. Quantitative, spectral, and serodiagnostic characteristics of antimycobacterial IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh*. 2006; 47–55.

- characteristics of antimycobacterial IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i boleznei legkikh*. 2006; 47–55.
15. Nikonenko BV, Apt AS, Mezhlumova MB, Avdienko VG, Yeremeev VV, Moroz AM. Influence of the mouse Bcg, Tbc-1 and xid genes on resistance and immune responses to tuberculosis infection and efficacy of bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination. *Clinical and experimental immunology*. 1996; 104: 37–43. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1996.d01-643.x.
  16. Kozlova IV, Avdienko VG, Babayan SS, Andrievskaya IYu, Gergert VY. Diagnosis of Bactec samples by immunoglobulins of mouse hyperimmune sera obtained against modified antigens of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2019; 97: 25–30.
  17. Rijnink WF, Ottenhoff THM, Joosten SA. B-Cells and Antibodies as Contributors to Effector Immune Responses in Tuberculosis. *Frontiers in immunology*. 2021; 12: 640168. DOI: 10.3389/fimmu.2021.640168.
  18. Logan J, Shenk T. Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984; 81: 3655–9. DOI: 10.1073/pnas.81.12.3655.
  19. Kaufman RJ. Identification of the components necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82: 689–93. DOI: 10.1073/pnas.82.3.689.
  20. Sample PJ, Wang B, Reid DW, Presnyak V, McFadyen IJ, Morris DR, et al. Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay. *Nature biotechnology*. 2019; 37: 803–9. DOI: 10.1038/s41587-019-0164-5.
  21. Kozak M. Features in the 5' non-coding sequences of rabbit alpha and beta-globin mRNAs that affect translational efficiency. *Journal of molecular biology*. 1994; 235: 95–110. DOI: 10.1016/s0022-2836(05)80019-1.
  22. Kumari S, Bugaut A, Huppert JL, Balasubramanian S. An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nature chemical biology*. 2007; 3: 218–21. DOI: 10.1038/nchembio864.