



Опасность мРНК-технологий

М.В. Супотницкий✉

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации
111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19
✉ e-mail: 27nc_1@mil.ru

Основные моменты

Опасность технологий воздействия на геном человека недооценивается, одну из таких опасностей представляют мРНК-технологии.

Актуальность. Широкое распространения мРНК-технологий на Западе и постепенное их проникновение в Россию ставит вопрос о безопасности их применения.

Цель исследования – выявление потенциальной опасности мРНК-технологий.

Источниковая база исследования – полнотекстовые англоязычные научные журналы, доступные через сеть Интернет.

Метод исследования. Аналитический. Использовались рекомендации Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA).

Обсуждение. В работе рассмотрены суть и границы мРНК-технологий; показано, как они работают; установлены их недостатки, способные привести к патологическим последствиям у людей; выявлены подходы к их применению для управления генами человека. Показано, что имеющиеся к настоящему времени мРНК-технологии несовершенны, прогнозировать ближайшие и отдаленные последствия их воздействия на здоровье человека при современном уровне знаний невозможно. Сама технология имеет двойное назначение и может быть использована под другими названиями для ведения биологической войны, имеющей ранее не ставившуюся цель – депопуляция населения. С каждым поколением средств, воздействующих на геном человека, они будут становиться опаснее, методы применения более изощренными, сопровождаться информационной составляющей, не допускающей альтернативных мнений, и снижением общего уровня знаний о биологических угрозах.

Выводы. Необходимо наладить жесткий государственный контроль над разработкой любых технологий воздействия на геном человека, не допуская их применение под другими названиями. Для выявления спектра неблагоприятных последствий применения мРНК-технологий целесообразно ограничить ее применение только в онкологии ориентировочно на десять лет. Все инъекционные препараты, поступающие в Россию из-за рубежа, должны контролироваться на наличие «закладок» нанообъектов.

Ключевые слова: CRISPRi/Cas; геном человека; кассета экспрессии; липидная наночастица; липоплексы; липосома; мРНК-технологии; наноконструкция; полиплексы; редактирование генома

Для цитирования: Супотницкий М.В. Опасность мРНК-технологий. Вестник войск РХБ защиты. 2024;8(3):205–231. EDN:ifdujf.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-3-205-231>

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов: автор является заместителем главного редактора журнала (с 2017 г.). Это не повлияло на процесс рецензирования и окончательное решение.

Финансирование: федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации (27 НЦ МО РФ).

Поступила 01.07.2024 г. После доработки 02.08.2024 г. Принята к публикации 27.09.2024 г.

mRNA Technologies Danger

Mikhail V. Supotnitskiy✉

27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky
of the Ministry of Defence of the Russian Federation
Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation
✉ e-mail: 27nc_1@mil.ru

Highlights

The impact that the technologies may exert on human genome is underestimated. The mRNA technologies may represent a particular danger for human genome.

Relevance. The mRNA technologies are quite widespread in the Western world. They are also gaining popularity in Russia and that is why we should control the safety of such technologies.

Purpose of the study – to determine potential hazard of mRNA technologies

Study base sources – full English academic periodicals available on the Internet.

Method of the study. Analytical. The author used suggestions of Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA).

Discussion. The paper dwells on the essence and scope of mRNA technologies, discusses their way of functioning, identifies their shortcomings that may provoke pathological consequences for humans; determines approaches that permit to use these technologies to control human genes. The article proves that nowadays the mRNA technologies are imperfect, for now it is impossible to predict near and long-term consequences that they may bring to human health. The technology itself is of a dual purpose and can be used under other names to unleash a biological war with a new final goal – to provoke a population decline. The newer the agents that may influence human genome will be, the more dangerous they will become. The methods of their application will also be more sophisticated. All this will be accompanied by media war that will eliminate alternative opinions. This will result in decline in the general level of knowledge about biological threats.

Conclusion. We should maintain rigid state control over the development of any technologies that may potentially exert any impact on human genome. We should also ensure that such technologies are not used under other names. It is worth limiting the application of the mRNA technologies and to use them only in oncology approximately for 10 years. This will help to identify the range of possible adverse consequences of their application. All injection drugs that go to Russia from abroad should be checked for possible nano objects “storage”.

Keywords: CRISPRi/Cas; expression cassette; genome editing; human genome; lipid nanoparticle; lipoplexes; liposome; mRNA technologies; nanoconstruction; polyplexes

For citation: Supotnitskiy M.V. mRNA Technologies Danger. *Journal of NBC Protection Corps.* 2024;8(3):205–231. EDN:ifdujf.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-3-205-2310>

Financial disclosure: The author has no financial interests in the submitted materials or methods.

Conflict of interest statement: The author is deputy Editor-in-Chief of the journal (since 2017). This had no impact on the peer review process and the final decision.

Funding: 27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky of the Ministry of Defence of the Russian Federation (27 SC MD RF).

Received July 1, 2024. Revised August 2, 2024. Accepted September 27, 2024

Бурное развитие в 1990-х гг. технологий соматической генной терапии онкологических, моногенных, аутоиммунных и нейрональных болезней, в начале XXI в. стало вызывать опасения, что введение генов в организм человека может иметь и отрица-

тельные последствия, и, даже, являться технологией двойного назначения [1, 2]. Эти опасения основывались на неожиданных и необычных летальных исходах у пациентов, которым вводились генотерапевтические препараты [3–5]. К настоящему времени пу-

бликации о применении генных технологий для создания поражающих агентов принципиально нового типа, приобрели недвусмысленный характер¹ [6, 7], но одновременно, как параллельная реальность, происходит разработка, промышленное освоение и самое опасное – массовое внедрение в клиническую практику таких технологий с игнорированием возможных рисков².

Цель работы – выявление потенциальной опасности мРНК-технологий.

Источниковая база исследования – полнотекстовые англоязычные научные журналы, доступные через сеть Интернет.

Метод исследования. Аналитический. Использовались рекомендации Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)³.

Задачи исследования:

- определить суть и границы мРНК-технологий;
- показать, как работает мРНК-технология;
- установить недостатки технологии, способные привести к патологическим последствиям у людей при ее массовом применении;
- выявить подходы к управлению извне генами человека с помощью мРНК-технологий.

1. Суть и границы мРНК-технологий

При введении *трансгенов*⁴ в организм человека ни ДНК, ни РНК не могут использоваться в «голом виде». Сахарофосфатный остов обоих типов молекул нуклеиновых кислот располагается по их периферии полярными группами наружу и придает им анионные свойства. При физиологических значениях pH, нуклеиновая кислота несет отрицательный заряд и не способна непосредственно взаимодействовать с отрицательно заряженными наружными поверхностями клеточных мембран. Из-за высокой гидрофильности нуклеиновой кислоты все гидрофобные основания «повернуты» вовнутрь ее молекулы, поэтому она не может проникнуть через гидрофобный барьер клетки-мишени. В сыворотке крови нуклеиновая кислота бы-

стро деградирует под воздействием нуклеаз. Период полужизни немодифицированной интерферирующей РНК в сыворотке крови укладывается в 5–60 мин, для ДНК – он составляет не более 10 мин. Эффективной доставке трансгена в клетку-мишень также препятствуют ассоциация нуклеиновых кислот с белками крови и их поглощение макрофагами. Нуклеиновые кислоты не способны специфически узнавать клетки-мишени [8].

Поэтому для доставки трансгенов в эукариотические клетки с начала 1980-х гг. разрабатываются искусственные генетические конструкции, состоящие из *вектора*, т.е. *оболочки*, способной предохранить нуклеиновую кислоту от деградации и доставить ее к клетке-мишени; и *трансгена*, экспрессия которого в данной клетке (ткани) способна проявить себя необходимым биологическим эффектом. Эти соединения в физиологических условиях имеют положительный заряд [9].

В настоящее время сформировалось два альтернативных направления создания искусственных генетических конструкций: на основе вирусов и на основе искусственных векторных систем – плазмид, мРНК и др., включенных в специальные оболочки, защищающие нуклеиновую кислоту от деградации нуклеазами и доставляющие их к клетке-мишени. В данной работе мы рассматриваем только мРНК-технологии.

мРНК-технологии – что это такое? В эукариотических клетках различные РНК выполняют функции как машин, синтезирующих белок, так и структур, регулирующих этот синтез. Их можно разделить на две большие группы [10]:

- *участвующие в трансляции*, т.е. в осуществляемом рибосомой процессе синтеза белка из аминокислот на матрице информационной (матричной) РНК (иРНК, мРНК). К ним относятся транспортная РНК (тРНК) и рибосомная РНК (рРНК);

- *участвующие в регуляции генов* – множество типов малых некодирующих РНК (<200 нуклеотидов), управляющих транс-

¹ Paris K. Genome Editing and Biological Weapons. Assessing the Risk of Misuse. Springer. USA. 2023. URL: <https://digital-commons.usnwc.edu/nwc-review/vol76/iss4/16> (дата обращения: 10.04.2024).

² Например, см. буклет «Advancing mRNA Vaccine and Therapy Development». Счастливые лица ученых, обещающих «непревзойденную масштабируемость и экономическую эффективность по сравнению с традиционными методами». URL: <https://www.genengnews.com/resources/ebooks/advancing-mrna-vaccine-and-therapy-development/> (дата обращения: 15.04.2024).

³ PRISMA. URL: <https://www.prisma-statement.org/> (дата обращения: 05.04.2024).

⁴ *Трансген* – ген, который был перенесен естественным путем или с помощью любого из ряда методов генной инженерии из одного организма в другой. Введение трансгена в процессе, известном как трансгенез, имеет потенциал изменить фенотип организма. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Transgene> (дата обращения: 14.06.2024).

крипцией, трансляцией и посттранскрипционным процессингом РНК. К ним относятся: малые интерферирующие РНК (короткие интерферирующие РНК, siRNA, small interfering RNA, маРНК) – класс двухцепочечных РНК с длиной в 20–25 нуклеотидов. Их взаимодействие с мРНК приводит к деградации последней и предотвращает трансляцию мРНК на рибосомах; малая ядерная РНК (small nuclear RNA, snRNAs) – сплайсинг пре-мРНК; малая ядрышковая РНК (small nucleolar RNA, snoRNA) – регуляция процессинга и модификации рибосомной РНК; микроРНК (microRNA, miRNA, миРНК) – малые некодирующие двухцепочечные молекулы РНК длиной 18–25 нуклеотидов (в среднем 22) – транскрипционная и посттранскрипционная регуляция экспрессии генов путем РНК-интерференции; piwi-взаимодействующая РНК (piwi-interacting RNA, piРНК) – эпигенетическое и посттранскрипционное молчание мобильных элементов и других ложных или повторяющихся транскриптов; кольцевые РНК (circRNA) – модулирование экспрессии генов; аптамеры – короткие структурированные РНК с высокой специфичностью и сродством к молекулам-мишеням; и другие, многие из которых еще не установлены.

мРНК-технологии – это технологии воздействия на геном человека, предполагающие доставку РНК в клетку-мишень, например, для восстановления функции конкретного гена или отключения гена, ответственного за развитие патологического процесса или функцию [11].

Кассеты экспрессии. К ним относят доставляемые в клетку вектором взаимозаменяемые генетические конструкции, включающие структурный ген (трансен), т.е. ген, кодирующий целевой белок, который необходимо ввести в организм человека с определенной целью; и регуляторные элементы, позволяющие запускать экспрессию гена в заданной ткани, и прекращать ее, когда нуклеотидная последовательность целевого белка будет считана белоксинтезирующей машиной клетки.

В последнее десятилетие работы по этим кассетам шли в следующих направлениях: повышение стабильности мРНК; повышение эффективности трансляции гена, кодирующего целевой белок; снижение иммунной стимуляции, введенной мРНК; удлинение периода ее полураспада (half-life). В естественных условиях транскрипция мРНК, синтезируемой в ядре клетки с матричной ДНК, катализируется ферментом ДНК-зависимой РНК-полимеразой. РНК-полимераза движется по молекуле ДНК в направ-

лении от 5'- к 3'-концу, образуя пре-РНК (pre-messenger RNA), которая, в свою очередь, подвергается сплайсингу – интроны удаляются, а экзоны соединяются, образуя непрерывную кодирующую последовательность. Также она подвергается двум модификациям.

Первая модификация – к первому трифосфату с 5'-конца через особую 5'-5'-связь добавляется 7-метилгуанозин (m7G) – в результате образуется структура, известная как 5'-кэп (от англ. cap – шапка). Она защищает зрелую мРНК от деградации, а также способствует ее транспорту из ядра клетки в цитоплазму и эффективной трансляции. Структура 5'-кэпа является основным определяющим фактором, с помощью которого клетка-хозяин может различать собственные и чужеродные молекулы мРНК.

Вторая модификация – посттранскрипционное добавление на 3'-конец молекулы РНК поли(А)-хвоста примерно из 100–250 остатков нуклеотида аденозина. Поли(А)-хвост придает стабильность молекуле мРНК, способствует экспорту мРНК из ядра в цитозоль, и вместе со структурой 5'-кэпа участвует в образовании трансляционно-компетентного рибонуклеопротеинового комплекса [12].

Трансен на основе мРНК транслируется в цитоплазме клетки. Поэтому разработчики мРНК-кассет воспроизводят эти модификации в условиях *in vitro*. Добавление 5'-кэпа может быть достигнуто либо посредством посттранскрипционной ферментативной реакции, проводимой ферментом, копирующим геном вируса коровьей оспы, либо с помощью котранскрипционной реакции путем включения синтетического кэпа. Поли(А)-хвост синтезируют с помощью поли(А)-хвостовой полимеразы [13, 14].

В настоящее время в рамках мРНК-технологий разрабатываются два основных типа рекомбинантной мРНК: нереплицирующаяся мРНК и самоамплифицирующаяся РНК. Генотерапевтические кассеты на основе *нереплицирующейся мРНК* содержат 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR) и открытую рамку считывания (ORF), также называемую кодирующей областью или кодирующей последовательностью, и поли(А)-хвост [15]. Направления модификации нереплицирующихся мРНК-кассет показаны на *рисунке 1*.

Экзогенные свободные РНК (РНК, поступающие извне клетки) через активацию врожденных *клеточных иммунных сенсоров*, индуцируют механизм клеточной защиты, филогенетически возникший до появления многоклеточной жизни и адаптивного иммунитета. Он направлен на блокирование экспрессии мРНК, транскрибируемой с чу-

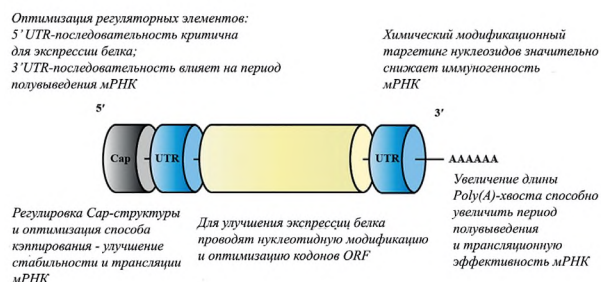


Рисунок 1 – Направления модификации трансгенов на основе нереплицирующейся синтетической одноцепочечной мРНК. Основные требования к функциональной мРНК – это наличие кэпа (7-метилгуанозина) на 5'-конце, кодирующей последовательности и поли(А)-хвоста на 3'-конце. Обычно в структуру мРНК включают: изомер нуклеозида уридина – псевдоуридин (Ψ), тиюридин (s2U) и 5-метилцитидин (m5C) (рисунок адаптирован по L. Yang с соавт. [9])

Figure 1 – Principles and methods of modification of transgenes that are based on non-replicating single-stranded mRNA. Basic requirements to a functional mRNA – the cap (7-methyl guanosine) at 5'UTR of the coding sequence and poly-A tail at 3'-UTR. The mRNA usually includes pseudouridine (Ψ), thiouridine (s2U) and 5-methylcytidine (m5C). (The figure is adapted from L. Yang et al. [9])

жеродных генов⁵. Поэтому замена природной РНК синтетической, не имеющей аналогов в природе, и соответственно, позволяющей обходить врожденные клеточные механизмы защиты от чужеродной, в настоящее время один из наиболее распространенных в технологиях генной терапии подходов к снижению нестабильности и иммуногенности РНК, и к увеличению экспрессии белка. Для синтеза мРНК-кассеты используются редковстречающиеся в природе химически модифицированные нуклеозиды [17]:

- изомер нуклеозида уридина – псевдоуридин [Ψ; 5-(β-D-Ribofuranosyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione]. Он играет роль во взаимодействии РНК с аминоксилтрансферазами и, следовательно, в инициации трансляции,

одновременно увеличивая температуру плавления мРНК и, соответственно, ее стабильность и экспрессию белка. Замена уридина на псевдоуридин обеспечивает векторам, предназначенным для соматической генной терапии, защиту от деградации мРНК, опосредованной РНКазой L. мРНК, содержащие модификацию Ψ – N(1)-метилпсевдоуридин (m1Ψ)⁶, обеспечивают примерно в 44 раза и в 13 раз более высокую экспрессию репортерного гена при трансфекции в клеточные линии или мышей соответственно, чем платформа мРНК, содержащая Ψ [18]. Для всех семи зарегистрированных на конец 2021 г. «КОВИД-вакцин» N1-метилпсевдоуридин был включен вместо уридина, что сделало продолжительность и силу их экспрессии непредсказуемыми. Долгосрочная судьба модифицированной мРНК внутри клеток в настоящее время неизвестна⁷;

тиоуридин (s2U) – содержится в транспортной РНК (тРНК). В РНК-кассете выполняет ту же роль, что и псевдоуридин;

5-метилцитидин (m5C) – придает РНК устойчивость к действию нуклеаз, повышает эффективность внутриклеточной трансляции, снижает ее цитотоксичность и неспецифичное иммуностимулирующее действие (за счет блокирования взаимодействия искусственной РНК с рецепторами врожденного иммунитета).

Распространенным подходом к усилению экспрессии генов стало увеличение периода полураспада мРНК путем использования 5'- и 3'-UTR для фланкирования кодирующей последовательности мРНК-трансгена. Их выбирают из генов, кодирующих белки с длительным периодом полураспада (мРНК α- и β-глобина и др.)⁸, либо используют синтетические UTR, разработанные под конкретные задачи⁹. Усиливает экспрессию белка (скорость элонгации трансляции) более эффективное использование цитоплазматических тРНК, достигаемое путем оптимизации кодонов нуклеотидной последовательности, кодирующей белок. Избегаются последовательности, которые соответствуют редким видам

⁵ Более подробно об этих механизмах клеточной защиты от патогенных микроорганизмов см. в работе [16].

⁶ Эта форма мРНК никогда не встречается в природе, и поэтому имеет потенциал для неизвестных последствий. Они начинают проявляться. Представлены доказательства того, что 100 % замена уридина на N1-метил-псевдоуридин (m1Ψ) в «мРНК-вакцинах» стимулировала рост рака и метастазирование раковых клеток на модели меланомы [19].

⁷ Более подробно см. в работе J. Nelson с соавт. [20].

⁸ 5'- и 3'-UTR бета-субъединицы гемоглобина человека (hHBV) – одна из наиболее эффективно экспрессируемых мРНК млекопитающих. Они обеспечивают более высокую стабильность и более высокий потенциал для продукции белка [14].

⁹ Сведения о 5'- и 3'-UTR, и природе сигнальных последовательностей полиА, остаются частной и нераскрытой информацией для семи «мРНК-вакцин», зарегистрированных в начале пандемии COVID-19 [21].

тРНК, и включаются соответствующие более распространенным видам тРНК. Оптимизация состава кодонов трансгена проводится с учетом типа тканей и клеток, где предполагается его экспрессия. В ходе такой оптимизации отдельные редкие кодоны замещаются синонимичными, транслирующиеся более эффективно. Было показано, что увеличение содержания гуанина-цитозина (GC) увеличивает экспрессию белка в условиях *in vivo*. Важна и оптимизация последовательности мРНК, определяющая ее вторичную структуру, тем самым уменьшают деградацию мРНК посредством гидролиза [9, 12, 21].

Полиаденилированный 3'-концевой участок мРНК, так называемый поли(А)-хвост, играет основную роль в образовании трансляционно-активного комплекса мРНК с факторами трансляции и влияет на стабильность мРНК, предотвращая ее 3'-экзонуклеазную деградацию [12].

Полиаденилирование заключается в наращивании поли(А)-хвоста путем добавления к 3'-концевому участку первичного транскрипта мРНК остатков аденозинмонофосфата. После трансляции мРНК может быть повторно полиаденилироваться и использоваться несколько раз, что называют *затяжной инерцией трансляции мРНК*. Длина хвоста poly(A) пропорциональна эффективности трансляции. Она является критическим фактором, определяющим долговечность молекул мРНК в цитоплазме. Поли(А)-хвосты длиной около 100 нуклеотидов идеально подходят для трансгенных конструкций данного типа, используемых для генной терапии. С каждым циклом трансляции количество остатков аденозинмонофосфата на 3'-конце первичной мРНК убывает. Когда оно достигает порядка 30–60, мРНК быстро и необратимо деградирует [22].

В случае «мРНК-вакцин» хвост Poly(A) содержит 120 аденозинмонофосфатов. После транскрипции модифицированной «мРНК-вакцины» в белок, она не полностью деградирует (из-за размера хвоста Poly(A)), что позволяет ей транслироваться несколько раз, увеличивая синтез белка [23].

Достижение адекватной экспрессии для компенсации генетического дефекта или терапевтического воздействия на опухоль, может потребовать больших количеств терапевтического белка или повторных введений генотерапевтического препарата. Эта проблема решается с помощью *самоамплифицирующейся мРНК (саРНК)*. Она содержит

все компоненты мРНК-трансгена с дополнительной ORF, кодирующей механизм репликации РНК-вируса, но без генов, кодирующих структурные белки этого вируса. Благодаря чему не происходит образования инфекционных вирусных частиц¹⁰ – т.е. саРНК представляет собой генно-инженерный репликон с двумя ORF. Одна ORF, как и обычная мРНК, кодирует доставляемый в клетку ген. Другая ORF кодирует мультиферментный репликационный комплекс альфавирусов – т.е. РНК-зависимую РНК-полимеразу (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) и ее вспомогательные белки, реплицирующие конструкцию мРНК в цитоплазме клетки.

После проникновения саРНК в цитозоль клетки, запускается трансляция неструктурных белков, необходимых для сборки мультиферментного репликационного комплекса – формируются фабрики репликации полноразмерной отрицательнцепочечной РНК. Синтезированная РНК служит матрицей для экспрессии большего количества репликаз, необходимых для ауторепликации вектора. Продолжительность экспрессии самоамплифицированной мРНК и количество синтезируемого белка не прогнозируемо увеличиваются. По сравнению с неамплифицируемыми РНК, транскрипты саРНК намного длиннее и имеют высокую степень развитости вторичной структуры. Что с одной стороны токсически действует на клетку, с другой – ограничивает их масштабное производство. Чтобы «укоротить» РНК и повысить их стабильность, разработана система трансамплификации, основанная на двухсоставной векторной системе РНК (bipartite RNA vector system). В этой системе одна векторная кассета, содержащая только ген, кодирующий репликазу, обеспечивает механизм транс-альфавирусной репликации; тогда как вторая молекула происходит из саРНК с делецией репликазы и предназначена только для экспрессии целевого белка. С помощью такой системы нанограммовые дозы мРНК, кодирующей гемагглютинин гриппа (НА), оказались достаточными для синтеза НА в количествах, вызвавших индукцию у мышей нейтрализующих антител против вируса гриппа [8, 24].

В клетку саРНК может доставляться в виде вирусных репликационных частиц (viral replicon particles, VRP) или в виде полностью синтетической саРНК, полученной после транскрипции в условиях *in vitro*, и доставляемой в клетку в составе искусственной век-

¹⁰ Обычно это положительно смысловые геномы альфавирусов: вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (VEE), вирус Синдбис (SINV) и вирус леса Семлики (SFV).

торной конструкции (липоплексы или полиплексы)¹¹ [15].

Технологию уже навязчиво представляют перспективной для создания следующего поколения «неаллергенных и нетоксичных мРНК-вакцин», вызывающих «широкий и длительный иммунитет при более низкой дозе, что обеспечивает лучшие клинические результаты в сочетании с меньшим количеством побочных эффектов» [26]. В тоже время стали публиковаться настораживающие экспериментальные данные о возможности рекомбинации РНК между шаблонами репликона и хелперной РНК, в результате чего образуются альфавирусы, способные к репликации [27].

Искусственные векторные системы. Это генотерапевтические векторы, созданные на основе нанотехнологий, представляющие собой систему доставки *трансгенов*, использующую невирусные наноматериалы. Развитие данного направления конструирования генотерапевтических векторов обосновывается их разработчиками серьезными недостатками вирусных векторов, препятствующими широкому клиническому применению – антигенность, онкогенность, ограниченная емкость по трансгенам и др. [28]. Такие векторные системы разрабатываются по трем направлениям: 1) комплексы, образованные нуклеиновыми кислотами и катионными полимерами (полиплексы); 2) комплексы, образованные нуклеиновыми кислотами и липидами (липоплексы), 3) комплексы на основе наночастиц неорганических носителей (двуокиси кремния и др.).

Полиплексные композиции (polyplexes). Полиплексы получают путем конденсации нуклеиновых кислот катионными полимерами. Общей чертой их структур является наличие в молекуле множества положительно заряженных групп, которые протонируются в положительно заряженные полимеры. Они могут связывать нуклеиновые кислоты посредством электростатических взаимодействий и конденсировать их в наночастицы. Положительные заряды улучшают взаимодействие с отрицательно заряженными клеточными мембранами и помогают полиплексам покинуть эндосомы до того,

как произойдет их лизосомальная деградация. По сравнению с системами на основе липидов полиплексы мРНК образуют более жесткие супрамолекулярные структуры, имеют большую ММ и медленную подвижность полимерной цепи, что обеспечивает превосходную стабильность [29].

Эффективность трансфекции клеток полиплексами увеличивают путем повышения их *специфичности*. Для этого в поверхность частиц вводят лиганд, специфически взаимодействующий с рецепторами на поверхности клеток-мишеней [29]. Полиплексы рассматриваются генотерапевтами как перспективное направление по ингаляционной доставке генов в легкие. Один из экспериментов показан на рисунке 2.

Стабилизация аэрозолируемого полиплекса достигается формированием глютаральдегидом или карбодиимидами поперечных сшивок между образовавшимися полиплекс катионными макромолекулами. Обычно это ветвящиеся производные полиэтиленimina (polyethylenimine; PEI, ММ 22 кДа). Чем больше таких сшивок, тем прочнее носитель, тем менее он подвержен деградации в растворе и при распылении, и тем прочнее в него «упакована» экспрессирующая кассета [30].

Хотя катионные полимеры обладают рядом преимуществ, позволяющих разрабатывать многофункциональные носители с меньшей токсичностью, их влияние на стабильность клеточных мембран по-прежнему является фактором, который разработчики таких систем принимают во внимание. При взаимодействии катионных наночастиц с клеточными и ядерными мембранами они изменяют пористость и потенциал мембран, повышают внутриклеточную концентрацию кальция и вызывают воспалительные реакции [31].

Липоплексные композиции. Их делят на две нечеткие группы: липосомы и липидные наночастицы (ЛНЧ)¹². Термин «липосома» был впервые использован в 1960-х гг., вскоре после того, как было обнаружено, что закрытые липидные двухслойные везикулы образуются спонтанно в воде. Термин «липидная наночастица» вошел в обиход гораздо

¹¹ Технология уже используется для получения «вакцин» в Японии. W. Akahata с соавт. [25] на основе саРНК создали «вакцину» VLPCOV-01, индуцирующую «надежные титры иммуноглобулина G (IgG) против белка RBD, сохраняющиеся в крови добровольцев до 26 недель».

¹² Эту классификацию липоплексов принимают не все исследователи. Например, W.M. Pardridge [32] (2022) считает, что липидные наночастицы – это общий термин, включающий липосомы, твердые липидные наночастицы (solid lipid nanoparticles, SLN), наноструктурированные липидные носители (nano-structured lipid carriers, NLC) и катионные липоплексы.

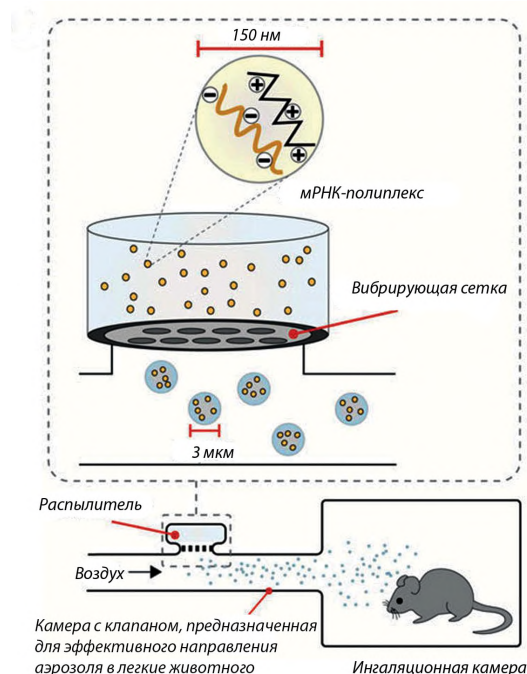


Рисунок 2 – Обработка распространения монодисперсного аэрозоля полиплексов с экспрессирующей кассетой. Для доставки в легкие мышей мРНК, кодирующей тестовый маркер – люциферазу светлячков, использовался вибрационный распылитель, соединенный с ингаляционной камерой. Небулайзер генерирует капли размером несколько микрометров, оптимальные для осаждения в глубоких отделах легких. В описанном эксперименте использовали наночастицы, лиофилизированные с сахарозой в качестве криопротектора. Восстановление в воде непосредственно перед распылением. Временная экспрессия белка люциферазы наблюдалась во всех отделах легких (рисунок адаптирован по [30])

Figure 2 – The example of distribution of monodispersed aerosol containing polyplexes with an expression cassette. A vibrating mesh nebulizer connected to a whole-body chamber was used to deliver firefly luciferase-encoding mRNA to mice. The nebulizer generates micrometer droplets that are optimal for lung deposition. In the given example, the nanoparticles were lyophilized with sucrose and that served as a cryoprotector. Desoxydation in water just before spraying. A transient luciferase protein expression occurred in all lung segments (the figure is adapted from [30])

позже, в начале 1990-х гг., с началом эры нанонауки и нанотехнологий [33]. Сходства и различия между ними показаны в *таблице 1*.

Для увеличения длительности циркуляции липоплексов в крови человека и увеличения количества трансфецируемых клеток-мишеней, находящихся вне легочной ткани, разработчики липоплексов понижают заряд их поверхности путем добавления ги-

дрофильных и нейтрально заряженных полимеров. Присутствие большого количества групп полиэтиленгликоля (ПЭГ) на поверхности липоплекса делает их невидимыми для фагоцитов, предотвращает неспецифическое взаимодействие между ним и клеточной мембраной, и при наличии на его поверхности специфических лигандов, увеличивает способность векторной конструкции к лиганд-рецепторному взаимодействию с клеткой-мишенью. Поэтому их еще называют «невидимые липосомами» или «липосомы Троянский конь» (Trojan horse liposomes, THLs) [33].

ПЭГилированный липидный компонент в липоплексе обычно связан с якорным липидом, т.е. с липидом, удерживающим его в мембране. ММ ПЭГ колеблется от 350 до 3000 Да. Более высокая ММ ПЭГ и более длинная липидная цепь увеличивают время циркуляции наночастицы в кровеносном русле, а также уменьшают поглощение иммунными клетками. Варьирование ими используется генными инженерами для точной настройки времени циркуляции и эффективности поглощения липоплекса клетками-мишенями [15]

Липосомы – платформа доставки лекарственных средств, с которой началось развитие наномедицины. Они представляют собой закрытые сферические везикулы, состоящие из фосфолипидного бислоя с полярными головными группами и неполярными хвостовыми группами, а также стабилизатора, такого как холестерин. Катионные липосомы – это общий термин для класса положительно заряженных липосом, обычно состоящих из различных катионных липидных молекул отдельно или с нейтральными вспомогательными липидами, такими как 1,1'-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE), distearoylphosphatidylcholine (DSPC), фосфатидилхолин, холестерин (Chol/CHO) и др. Положительно заряженный комплекс «носитель–нуклеиновая кислота» под действием электростатического взаимодействия адсорбируется на поверхности клетки, затем проникает в клетку посредством эндоцитоза [33].

Положительный заряд катионных липидов позволяет им притягивать, инкапсулировать и сжимать нуклеиновые кислоты, в то время как хелперные липиды (по химическому составу это глицеролипиды, не-катионные по природе) отвечают за улучшение стабильности двухслойных мембран, снижение токсичности катионных липосом и способность выходить из эндосом в ци-

Таблица 1 – Сравнительные свойства липосом и липидных наночастиц
Table 1 – Comparison of liposomes and lipid nanoparticles

Сходство/различие / Similarity/difference	Липидная наночастица / Lipid nanoparticle	Липосома / Liposome
Сходство / Similarity	Распределение частиц по размерам, форма, липидный состав, наличие положительного заряда поверхности / Particle-size distribution, shape, lipid composition, the presence of positive charge of surface	
	Монослойная структура фосфолипида / A phospholipid with a monolayer structure	Двухслойная структура фосфолипидов / A phospholipid with a bilayer structure
	Обратные мицеллы с водяным ядром / Reversed micelles with a water core	Водяное ядро в мицеллярном пространстве / A water core in micellar space
Различия / Differences	По методам получения / Acquiring methods	
	Сублимационная сушка невозможна / Freeze drying is impossible	Возможна сублимационная сушка / Freeze drying is possible
	ЛНЧ-мРНК нестабильна, а затраты на хранение и транспортировку высоки / LNP-mRNA is unstable, storage and transportation expenses are high	Имеет превосходную стабильность при длительном хранении / Keeps stable during long-term storage.
Примечание. Таблица адаптирована автором из [34]. Note. The table is adapted by the author from [34].		

топлазму клетки [33, 35]. Структура катионной липидной наночастицы показана на рисунок 3.

Высокой трансфекционной способностью обладают липосомы с выраженной мембранной текучестью. Использование DOPE в качестве колипида увеличивает трансфецирующую способность липосом и облегчает освобождение липоплекса из эндосомы через дестабилизацию ее мембраны в цитоплазме клетки. Далее происходит декомплексация липосомы с высвобождением из нее транскгена [36]. Избыточность поверхностного заряда, сокращает период полужизни катионных липосом при циркуляции в кровеносном русле [33]

Нацеленность липосом на определенные органы можно регулировать. Введение в состав липосомы галактолипидов повышает их тропность к паренхиматозным тканям. Липосомы, содержащие dimethylaminoethane-carbamoyl-cholesterol (DC-Chol), обладают повышенной тропностью к клеткам гиппокампа головного мозга [37]. Другой, более специфичный путь таргетирования липосом – введение в их состав специфических антител. мРНК инкапсулируется внутри пегилированной липосомы (т.е. «липосомы Троянский конь»), а кончики нитей ПЭГ на поверхности липосомы конъюгируются с моноклональным антителом, специфичным к определенному рецептору или ткани. Обычно каждая такая липосома включает ~50 молекул моноклональных антител. Для нацеливания

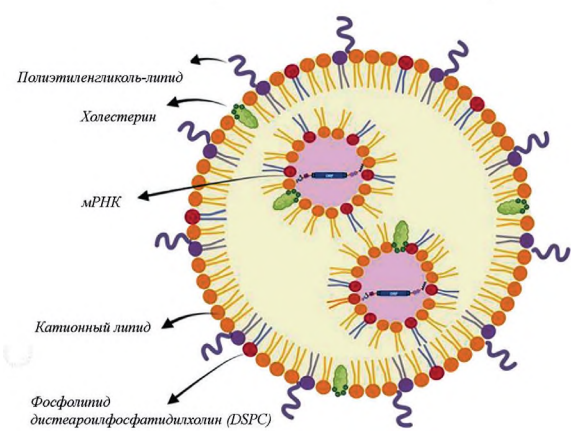


Рисунок 3 – Структура катионной липидной наночастицы. Такие наночастицы в основном состоят из катионных липидов – в данном случае DSPC, липид-связанного полиэтиленгликоля, холестерина и молекул мРНК. DSPC повышает стабильность частиц, эффективность доставки и биораспределение. Такие наночастицы содержат примерно 100 молекул мРНК на липидную наночастицу при ее диаметре 80–100 нм (рисунок адаптирован по [22])

Figure 3 – The structure of a cationic lipid nanoparticle. A cationic lipid nanoparticle mainly consists of cationic lipids, distearylphosphatidylcholine (DSPC), lipid-linked polyethylene glycol (PEG), cholesterol, and mRNA molecules. DSPC enhances particle stability, delivery efficacy and biodistribution. Such nanoparticles contain approximately 100 mRNA molecules per a lipid nanoparticle, taking into account that the diameter of this particle is 80–100 nm (the figure is adapted from [22])

на несколько рецепторов с ПЭГ могут быть конъюгированы молекулы моноклональных антител с различной специфичностью. Такие комплексы называются ПЭГилированными иммуносомами (PEGylated immunoliposomes, PILs) [38, 39].

Липидные наночастицы (ЛНЧ)¹³ – наноструктуры сферической формы, состоящие из одного или нескольких ионизируемых липидов (ionizable lipids), связанных с ПЭГ (ПЭГилированный липид); холестерина и хелперного липида [40]. Предложены для преодоления недостатков катионных липидов. Они являются ключевыми компонентами ЛНЧ, определяющими титр, эффективность доставки мРНК и способность к разложению в клетке. Ионизируемый липидный компонент (а не мРНК) обеспечивает адъювантность ЛНЧ, стимулируя врожденную иммунную систему. Их период полураспада *in vivo* 20–30 суток¹⁴. Таргетирование ЛНЧ аналогично таргетированию липопосом [40, 41].

Меньшая токсичность ионизируемых липидов, чем катионных, связана с тем, что они могут динамически регулировать свое зарядовое состояние в клеточной среде, избегая непрерывного высвобождения положительных зарядов на поверхность клетки (рисунок 4).

В настоящее время ЛНЧ стали наиболее широко изученным и применяемым вектором доставки нуклеиновых кислот в технологиях генной терапии *in vivo* [42].

«мРНК-вакцины» против COVID-19, разработанные компаниями Pfizer/BioNTech и Moderna. «Вакцины» доставляют в цитоплазму мышечных клеток мРНК, кодирующую полноразмерный рекомбинантный S-белок SARS-CoV-2; мРНК транслируется в S-белок; он проникает на поверхность мышечных клеток и в кровь, и действует как антиген, вызывая развитие ответа иммунной системы человека. Составы липидных наночастиц двух «мРНК-вакцин» очень схожи и их надо рассматривать как наиболее опти-

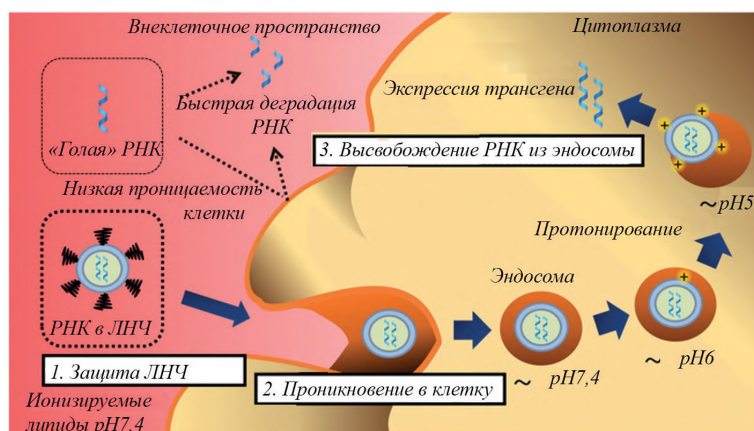


Рисунок 4 – Механизм доставки мРНК липидными наночастицами. 1 – Инкапсуляция ЛНЧ защищает РНК от расщепления нуклеазами. ЛНЧ нейтральны при физиологическом pH благодаря ионизируемым липидам и ПЭГ-липидам, тем самым уменьшая неспецифические взаимодействия с белками сыворотки. 2 – После диссоциации ПЭГ-липидов клетки поглощают ЛНЧ через аполипопротеин E (ApoE)-зависимый и/или ApoE-независимый пути. 3 – Протонированные ЛНЧ при подкислении эндосомы разрушают мембраны эндосомы и высвобождают молекулы РНК в цитоплазму (рисунок адаптирован по [43])

Figure 4 – The Delivery mechanism of mRNA by lipid nanoparticles. The lipid nanoparticles (LNP) completely encapsulated the RNA and prevented it from nuclease digestion. LNPs are neutral in physiological pH due to ionizable lipids and pegylated phospholipids, thus reducing non-specific interactions with serum proteins (1). LNPs are taken up by cells via apolipoprotein E (ApoE) dependent and/or ApoE independent pathways when the pegylated phospholipids are dissociated (2). The protonated LNPs, after acidification in the endosomes, induce the hexagonal phase structure, destroy the cell membrane and release RNA molecules into the cytoplasm (3) (the figure is adapted from [43])

¹³ Конструкции ЛНЧ имеют множество вариантов выполнения (липидная наноэмульсия, твердая липидная наночастица, наноструктурированный липидный носитель и др.), более подробно с ними можно ознакомиться по работам [9, 33, 42].

¹⁴ Comirnaty. Assessment report COVID-19 vaccine comirnaty. EMA/707383/2020 Corr1 (2021) 31:1–140. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (дата обращения: 19.07.2024).

мальные на настоящий момент для введения генов в организм человека. Обе «вакцины» содержат запатентованные катионные ионизируемые липиды, положительно заряженные при низком значении pH. При физиологическом значении pH они нейтральны. Фосфолипид дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) и холестерин помогают упаковать мРНК в ЛНЧ.

Молярные соотношения липидных наночастиц «вакцин» следующие:

- катионный липид:ПЭГ-липид:холестерин: DSPC составляют (46,3:1,6:42,7:9,4) – для вакцины Pfizer;

- те же компоненты (50:1,5:38,5:10) – для вакцины Moderna.

Наночастицы имеют диаметр 80–100 нм и включают примерно 100 молекул мРНК на липидную наночастицу [33].

Ген S-белка для обеих вакцин взят из штамма SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (номер доступа GenBank: MN908947) [44]. Все азотистые основания уридина были заменены на N1-метилпсевдоуридин (m1Ψ) [45] по технологии, ранее разработанной для соматической генной терапии [18].

Зпатентованные катионные липиды (ALC-0315, Pfizer; SM-102, Moderna) представляют собой третичные амины, которые протонируются (и, следовательно, приобретают положительный заряд) при низком значении pH в эндосомах, разрывают их и проникают в цитоплазму клетки. Оба ПЭГ-липиды представляют собой конъюгаты катионного липида с ПЭГ-2000. Их углеводные цепи соединены биоразлагаемыми сложноэфирными группами, что обеспечивает, по утверждению разработчиков, безопасный клиренс после доставки мРНК. Разветвленные углеводные цепи оптимизируют образование неламеллярных фаз в этаноле и эффективность доставки мРНК в клетки [33].

Векторные системы на основе наночастиц неорганических носителей. Их основными преимуществами перед липо- и полиплексами разработчики считают низкую токсичность, контролируемость размеров частиц и простоту приготовления векторной системы. Развитие данного направления в генной терапии *in vivo* прослеживается с

2002 г. В научной литературе рассматривалось применения в качестве носителей генов наночастиц кремния, железа и золота [34].

Наиболее перспективными для целей генной терапии *in vivo* считаются наночастицы на основе мезопористого кремния (МКН). Их преимущества перед другими неорганическими наночастицами следующие: 1) высокая способность загрузки как гидрофильных, так и гидрофобных молекул; 2) размер и форму частиц можно регулировать; 3) поверхность МКН содержит легко модифицируемые активные группы, позволяющие применять различные покрытия и стратегии нацеливания трансгена на клетки-мишени; 4) поверхность МКН упорядочена, ее пористость достигает 80 %, поровые каналы обеспечивают диффузию и пролонгированное высвобождение лекарств; 5) биосовместимость – кремниевая кислота, усваивается организмом или выводится через мочевыделительную систему [42].

Почему нельзя считать препараты на основе мРНК вакцинами. В общей фармакопейной статье «Вакцины и анатоксины»¹⁵ установлено официальное определение вакцин – «иммунобиологические лекарственные препараты – вакцины и анатоксины, содержащие компоненты, вызывающие при введении человеку активный специфический иммунный ответ к антигенам микроорганизмов, включая микробные токсины. Активными компонентами могут являться: живые микроорганизмы (авирулентные или аттенуированные); микроорганизмы, инаktivированные физическим или химическим способом; антигены, выделяемые микроорганизмами или извлеченные из них, а также полученные по технологии синтеза или методами генной инженерии»¹⁶. То есть речь идет не о *гене*, его регуляторных последовательностях и пр., а об *антигене* – т.е. белке, обладающем антигенными свойствами (но это для тех, кто понимает разницу между ними). Далее дается определение «*антигена*». Там же указано, что «вирусные вакцины представляют собой инаktivированные или живые вирусы или *антигенные компоненты вирусов*», но не *гены вирусов*, включенные в специальные векторы и с 1990-х гг.

¹⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹⁶ А вот еще интересный документ – Приложение № 1 к приказу Минздрава Российской Федерации от 6 декабря 2021 г. № 1122н. Называется «Национальный календарь профилактических прививок», п. 6 «При проведении вакцинации и ревакцинации населения используются вакцины, содержащие актуальные для Российской Федерации *антигены* ...», т.е. антигены, а не гены.

используемые в экспериментах по генной терапии рака¹⁷.

Федеральный закон РФ от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»¹⁸ дает недвусмысленное определение генотерапевтическим лекарственным препаратам – это лекарственные препараты, фармацевтическая субстанция которых является рекомбинантной нуклеиновой кислотой или включает в себя рекомбинантную нуклеиновую кислоту, позволяющую осуществлять регулирование, репарацию, замену, добавление или удаление генетической последовательности¹⁹, т.е. то, что представлено на рисунке 1.

В Европейской фармакопее определения аналогичные²⁰. Регулирование этих продуктов в качестве вакцин и исключение их из регулирующего надзора в качестве продуктов генной терапии не имело ни научного, ни этического обоснования [46, 47].

Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) определяет генотерапевтические продукты как «продукты, которые опосредуют свои эффекты посредством транскрипции и/или трансляции перенесенного генетического материала и/или путем интеграции в геном хозяина и которые вводятся в виде нуклеиновых кислот, вирусов или генно-инженерных микроорганизмов. Продукты можно использовать для модификации клеток

in vivo или переносить в клетки *ex vivo* перед введением реципиенту»²¹ [48].

Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, ЕМА) описывает лекарственный препарат для генной терапии (gene therapy medicinal product, GTMP) как «биологический лекарственный препарат, содержащий активное вещество, которое содержит или состоит из рекомбинантной нуклеиновой кислоты, используемой или вводимой людям для регуляции, восстановления, замены, добавления или удаления генетической последовательности; и его терапевтический, профилактический или диагностический эффект напрямую связан с содержащейся в нем последовательностью рекомбинантной нуклеиновой кислоты или с продуктом генетической экспрессии этой последовательности»²² [49].

Как правило, ДНК, мРНК, малые интерферирующие РНК (siRNA, small interfering RNA), микроРНК (microRNA, miRNA) и антисмысловые олигонуклеотиды представляют собой генетические материалы, используемые для терапевтической доставки в дефектную клетку-мишень или ткань для восстановления функции конкретного гена или отключения гена, ответственного за развитие патологического процесса. Таким образом используемые для введения генов в организм человека «мРНК-вакцины» к иммунобиологическим препаратам, уже более двух столетий, называемых «вакцинами», отношения не имеют.

¹⁷ URL: https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-1-0004-15-vaktsiny-i-anatoksiny/#%D0%9E%D0%A4%D0%A1171000415_%D0%92%D0%B0%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%BD%D1%8B_%D0%B8_%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%BD%D1%8B (дата обращения: 10.05.2024).

¹⁸ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/baabe5b69a3c031bfb8d485891bf8077d6809a94/ (дата обращения: 10.05.2024).

¹⁹ URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/baabe5b69a3c031bfb8d485891bf8077d6809a94/ (дата обращения: 19.05.2024).

²⁰ Vaccines for Human Use. European Pharmacopoeia 11.6 ed; 2024. URL: https://www.bfarm.de/SharedDocs/Downloads/DE/Arzneimittel/Zulassung/ZulRelThemen/azbuch/10azBuecher/Gesamtregister.pdf?__blob=publicationFile (дата обращения: 10.05.2024).

²¹ «... as products: that mediate their effects by transcription and/or translation of transferred genetic material and/or by integrating into the host genome and that are administered as nucleic acids, viruses, or genetically engineered microorganisms. The products may be used to modify cells *in vivo* or transferred to cells *ex vivo* prior to administration to the recipient. FDA. Guidance for industry, gene therapy clinical trials – observing subjects for delayed adverse events; 2006 Nov. URL: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm072957.htm> (дата обращения: 10.05.2024).

²² «...biological medicinal product that contains an active substance which contains or consists of a recombinant nucleic acid used in or administered to humans to regulate, repair, replace, add or delete genetic sequence and its therapeutic, prophylactic or diagnostic effect relates directly to the recombinant nucleic acid sequence it contains, or to the product of genetic expression of this sequence». Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004 official journal of the European Union; 2007 Dec 10.

FDA approves first-of-its kind targeted RNA-based therapy to treat a rare disease. August 10, 2018. URL: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-its-kind-targeted-rna-based-therapy-treat-rare-disease> (дата обращения: 14.06.2024).

2. Производство искусственных векторных систем

Знание деталей такого производства необходимо для выявления скрытно работающих линий по производству искусственных векторных систем, предназначенных для закладок в традиционные иммунобиологические препараты. Рассмотрим его на примере липоплексов с мРНК и векторных систем на основе наночастиц неорганических носителей.

Производство липоплексов. В целом приготовление частиц ЛНЧ-мРНК достигается путем хаотического смешивания липидов, растворенных в этаноле, и молекул мРНК, растворенных в водных растворах с низким значением pH. Самосборка ЛНЧ представляет собой физический процесс, приводящий к термодинамически выгодному расположению смешанных компонентов, обусловленному электростатическими взаимодействиями (между отрицательно заряженной мРНК и положительно заряженными ионизированными липидами) и амфифильностью других липидов. Размер, поверхностный заряд и состав конечного ЛНЧ во многом зависят от соотношения липидов во время приготовления и от индивидуальных свойств липидов (например, pKa, длины алкильной цепи, разветвления, ионизируемых липидных и сложноэфирных связей и др.) [40].

Предварительный этап производства мРНК-ЛНЧ. Включает генерацию транскрипта мРНК из плазмиды, содержащей интересующий ген. Эта реакция называется реакцией транскрипции *in vitro* (*in vitro* transcription reaction, IVT)²³. Ферментативная реакция IVT основана на ферментах РНК-полимеразы бактериофагов T7, SP6 или T3. Ферменты РНК-полимеразы катализируют синтез целевой мРНК из линейаризованной матрицы ДНК, содержащей интересующий ген. Линейаризованную матрицу ДНК получают путем расщепления рестрикционной эндонуклеазой плазмиды, содержащей интересующий ген, или альтернативно, амплификацией интересующего гена с помощью ПЦР. К основным ферментам реакции IVT относятся: а) РНК-полимераза – превращает ДНК в РНК; б) неорганическая пирофосфатаза (Inorganic pyrophosphatase, IPP) – увеличивает выход реакции IVT; в) гуанилилтрансфераза – добавляет нуклеозид GMP к 5'-концу мРНК; г) Cap 2'-О-метилтрансфе-

раза (Cap 2'-O-Methyltransferase) – использует S-adenosylmethionine (SAM), как донор метильной группы для добавления в 2'-положение 5'-кэпа мРНК; д) ДНКаза I – эндонуклеаза, используемая для удаления загрязняющей геномной ДНК из РНК; ж) поли(А)-хвостовая полимераз – образует поли(А)-хвост; з) модифицированные и немодифицированные нуклеозидтрифосфаты (NTP) [13].

Очистка мРНК от примесей. Реакционная смесь, полученная в результате IVT, содержит несколько примесей, включая остаточные NTP, ферменты, неправильно сформированные мРНК, двухцепочечные мРНК (дцРНК) и плазмидную ДНК. Лабораторная очистка мРНК IVT включает методы, основанные на удалении ДНК путем расщепления ферментом ДНКазы с последующим осаждением хлоридом лития (LiCl). Удаление этих примесей имеет решающее значение для получения чистого продукта мРНК. Для очистки РНК используют ионно-парную обращенно-фазовую хроматографию (ion-pair reverse-phase chromatography, IEC), основанную на разнице зарядов между целевой мРНК и примесями; либо аффинное хроматографическое разделение с использованием в качестве лиганда дезокситимидин-(dT)-олиго-dT [Deoxythymidine (dT)-Oligo dT], захватывающий поли(А)-хвост мРНК. Для удаления примесей небольшой ММ используют тангенциальную поточную фильтрацию (Tangential flow filtration, TFF). Возможны и другие методы очистки нуклеиновой кислоты от примесей [50].

Получение концентрата мРНК-ЛНЧ. ЛНЧ, включающие мРНК, образуются путем осаждения липидов, растворенных в органической фазе, и смешивания их с мРНК в водной фазе. мРНК растворяют в цитратном или ацетатном буфере при pH 4. Смешивание водного и неводного растворов протонирует ионизируемый липид, вызывая электростатическое притяжение между ионизируемым протонированным липидом и анионной мРНК. Это взаимодействие одновременно сочетается с гидрофобными взаимодействиями других липидов и приводит к спонтанной самосборке мРНК-ЛНЧ с мРНК, инкапсулированной внутри ядра наночастицы. Процесс еще называют микроосаждением. После образования ЛНЧ их диализуют для удаления неводного растворителя, которым обычно является этанол, pH раствора доводят до

²³ Такие системы коммерчески доступны. Например, система синтеза мРНК Takara IVTpro (The Takara IVTpro mRNA Synthesis System) предназначена для синтеза высококачественной одноцепочечной мРНК с кэп-структурой из интересующего клиента гена. URL: <https://www.takarabio.com/products/mrna-and-cdna-synthesis/in-vitro-transcription/takara-ivtpro-mrna-synthesis-system> (дата обращения: 05.05.2024).

физиологического значения. Микрофлюидные смесители позволяют формировать ЛНЧ небольшого размера с низким индексом полидисперсности и высокой эффективностью инкапсуляции мРНК. Используются смесители шахматного типа «елочка». Конструкция таких смесителей позволяет двум (водным и неводным) растворителям смешиваться за микросекунды. Этот временной интервал намного меньше времени, необходимого для агрегации липидов. Общая скорость потока 12–14 мл/мин и соотношение объемов потока 3:1. Процесс можно масштабировать [50].

Полученная мРНК-ЛНЧ проходит контроль качества и разливается во флаконы или контейнеры. Флаконы закрывают крышками, запечатывают, проверяют с помощью автоматизированной обработки изображений, маркируют и упаковывают во вторичную и третичную упаковку. Производственный процесс не зависит от последовательности РНК, поэтому упакованными в ЛНЧ могут быть любые РНК [50].

Для производства мРНК-ЛНЧ могут использоваться помещения более низкого уровня биобезопасности, чем для традиционных вакцин. Строительство, эксплуатация и обслуживание таких производств значительно дешевле по сравнению с помещениями, содержащими чистые помещения высокого класса. Реактор объемом 5 л способен произвести миллион доз «мРНК-вакцины» за один цикл. Количество мРНК оценивается в диапазоне от 0,1 до 10 мкг/дозу с трансгенной кассетой саРНК; и от 25 до 250 мкг/дозу для мРНК. Соответственно стоимость дозы составляет менее одного доллара США для препаратов саРНК. Для препаратов на основе мРНК она будет на 1–2 порядка больше [51].

Технологическая линия по производству мРНК-ЛНЧ может быть скрытно размещена на небольшом участке существующего предприятия по производству традиционных вакцин. Для быстрого создания такой производственной линии используется готовое одноразовое оборудование. Наночастицы мРНК-ЛНЧ могут быть использованы в качестве «закладок» в традиционные иммунологические препараты.

Процесс изготовления векторных наноконструкций на основе диоксида кремния. Современные методы повышения эффективности введения генов в МКН заключаются в следующем: 1) функционализация мезопористого кремния путем придания ему положительного заряда, например, аминированием и включением катионного полимера – более эффективная загрузка трансгенов проис-

ходит за счет усиления электростатических взаимодействий наночастиц с нуклеиновыми кислотами; 2) синтез МКН с большими порами для реализации улучшенной защиты и транспортировки генов [42, 52].

Для получения векторов на основе МКН, T.Y. Cheang с соавт. [53] ковалентно «сшили» с поверхностью наночастицы двуокиси кремния силановое соединение – аминопропилтриэтоксисилан (aminopropyltriethoxysilane, APTES), пригодное для ковалентного связывания с атомами кремния. В результате на поверхности кремниевой частицы формировалась подложка, которая за счет аминокислотных концов молекулы APTES способна электростатически взаимодействовать с белками и двунитевой плазмидной ДНК. APTES увеличил способность наноносителя связывать плазмидную ДНК. Эффективность доставки плазмидной ДНК в гладкомышечные клетки сосудов человека возросла. Благодаря высокой способности APTES растворяться в клеточных мембранах такая наночастица легко проходит в цитоплазму клетки. Сорбирование на ее поверхности специфического лиганда нацеливает вектор на определенные клетки или ткани. Массовое соотношение частиц двуокиси кремния и плазмидной ДНК в таких конструкциях 30:1. Их средний размер – 174,5 нм.

Схожим путем пошли W. Ngamcherdtrakul с соавт. для получения наноносителя двухцепочечной малой интерферирующей РНК (миРНК) [54]. Они создали МКН размером 50 нм, поверхность которого была модифицирована перекрестно связанными полиэтиленгликолем и полиэтиленмином. Сшитый с наночастицей полиэтиленмин позволил им загружать отрицательно заряженную миРНК на поверхность МКН. Также он способствовал ее выходу из эндосом за счет создания эффекта протонной губки. ПЭГ обеспечивал стерический эффект, защищающий миРНК от ферментативной деградации, а наночастицы – от агрегации и фагоцитоза. Модифицированные наночастицы затем конъюгировали с антителами для активного нацеливания на раковые клетки. В частности, W. Ngamcherdtrakul с соавт. [54] использовали трастузумаб-мАТ для лечения метастазирующего рака молочной железы. Их схема эксперимента по созданию конструкции, названной T-siRNA-NP, приведена на рисунке 5.

Процесс изготовления векторных наноконструкций на основе диоксида кремния легко масштабировать [55], сами МКН идеально подходят для ингаляционного введения трансгенов в организм человека.

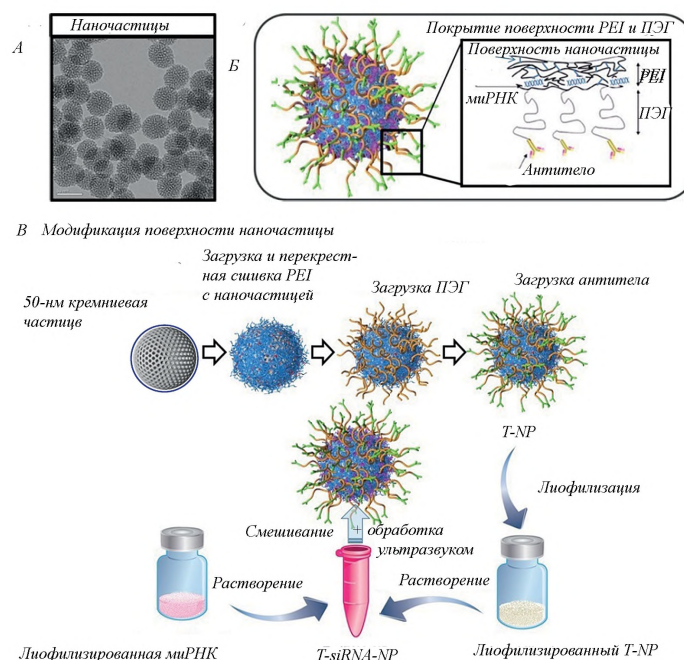


Рисунок 5 – Двухэтапный процесс изготовления наноконструкции на основе диоксида кремния, предназначенной для адресной доставки миРНК к раковым клеткам молочной железы. А – Электронно-микроскопическое изображение МКН, масштабная линейка – 50 нм. Б – Схема конструирования T-siRNA-NP (тростузумаб-siRNA-наночастица). В – Процесс изготовления МКН: первый этап – наночастицу сшивали с PEI и загружали сначала ПЭГ, затем тростузумаб, в результате получали комплекс T-NP (тростузумаб-наночастица). Его лиофилизовали и хранили в экспериментально подобранных условиях. На втором этапе – лиофилизированный комплекс T-NP и лиофилизированную миРНК ресуспендировали в воде, свободной от РНКазы, и смешивали в одном флаконе. siRNA связывалась со слоем PEI из-за предпочтения заряда. Слой ПЭГ защищал ее от ферментативной деградации. (А и Б). Гидродинамический размер в фосфатно-солевом буфере конечной конструкции с 2 мас.% миРНК составлял $113 \pm 2,2$ нм с узким распределением по размерам (рисунок адаптирован по [54])

Figure 5 – Mesoporous silica-based nanoconstruct for targeted delivery of siRNA to the cancerous cells of mammary gland (two-staged process): (A) TEM image of MSNP, scale bar = 50 nm. (B) Scheme of nanoconstruct (T-siRNA-NP). (C) The MSNP fabrication process. First stage: the MSNP was cross-linked with PEI, and then merged into PEG, and trastuzumab, resulting in T-NP, which was then lyophilized and stored under various conditions. At the second stage, lyophilized T-NP and lyophilized siRNA were resuspended in RNase-free water and mixed together in one vial. The siRNA was bound to the PEI layer due to charge preference, being protected under the PEG layer from enzyme degradation. (A and B). Hydrodynamic diameter of the final construct in phosphate-buffer saline with 2 siRNA molecules was $113 \pm 2,2$ nm with tight size distribution (the figure is adapted from [54])

3. Недостатки конструкции мРНК-векторов и технологий их производства

Платформа изучалась более 25 лет в качестве экспериментального генотерапевтического метода лечения рака, при этом термины «генная терапия» и «вакцинация мРНК» считались синонимами [56]. Ни одна «мРНК-вакцина» не была разрешена для использования до пандемии COVID-19 [57].

Опыт применения первых «вакцин» на основе мРНК показал наличие как минимум

трех нерешенных разработчиками технических противоречий²⁴, заложенных в их конструкции.

Первое противоречие – между необходимостью уменьшения клиренса ЛНЧ и прицельностью экспрессии трансгена. ПЭГилированный липид уменьшает опсонизацию ЛНЧ сывороточными белками и ее клиренс фагоцитами, тем самым он обеспечивает ей более длительную системную циркуляцию в кровеносном русле²⁵. Но физико-химическая

²⁴ Техническое противоречие возникает тогда, когда при изменении известными способами одной части системы недопустимо ухудшается другая ее часть.

²⁵ Дословно «They also contain a PEGylated lipid to reduce antibody association (opsonization) by serum proteins and clearance by phagocytes thus conferring longer systemic circulation» [33]. У мРНК ЛНП только один естествен-

природа ЛНЧ создает условия для очень широкого распространения трансгена в организме человека. Попав в кровоток, ЛНЧ могут достигать любого органа и поглощаться его клетками. Интенсивность связи между липидами ЛНЧ и клетками является одним из факторов, модулирующих их распределение в тканях. Количество ЛНЧ, зафиксированное в разных тканях, может быть разным в зависимости от сродства. Природа используемых липидов позволяет ЛНЧ пройти гематоэнцефалический и плацентарный барьеры [58]. Последовательности мРНК способны циркулировать в составе ЛНЧ в крови реципиента неопределенно долго и экспрессировать токсичный белок в любых тканях, к которым они проявляют тропность [33, 59].

Второе противоречие – между необходимостью длительной экспрессии гена и врожденными клеточными механизмами защиты от чужеродной РНК. Их «обманывают» путем замены природной РНК синтетической, не имеющей аналогов в природе, и соответственно, позволяющей обходить врожденные клеточные механизмы защиты от чужеродной РНК [14, 18, 20]. Этим она отличается от мРНК реплицирующихся в цитоплазме РНК-вирусов. Но такая замена – старая технология, разработанная для генной терапии задолго до пандемии COVID-19 [18] и не предназначенная для целей вакцинации. Она делает трансген фактически «бессмертным», длительность и выраженность его экспрессии невозможно контролировать во времени, а соответственно количество синтезированного внутриклеточно и попавшего в кровь белка. К. Röltgen с соавт. [60] в биоптатах подмышечных лимфатических узлов «вакцинированных» с помощью иммуногистохимии и гибридизации *in-situ* обнаружили, что спайковый белок и мРНК «вакцин» (BNT162b2 и мРНК-1273) сохраняются в герминальных центрах лимфатических узлов до 60 суток (продолжительность наблюдения) после «вакцинации». В аутопсийном исследовании А.И. Краусон с соавт. [61] «мРНК-вакцины» выявлялась с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени в подмышечных лимфатических узлах в течение 30 суток после «вакцинации». Этими же авторами «вакцина» была обнаружена в миокарде у части умерших пациентов, «вакцинированных» 30 суток назад.

Кроме того, замена в мРНК уридина на N1-метилпсевдоуридин, заставляет механизм, который транслирует ген в целевой белок, «проскальзывать», т.е. сдвигать рамку

считывания рибосом на один нуклеотид примерно в 10 % случаев и генерировать случайные бессмысленные белки, что приводит к неопределенным и непреднамеренным иммунным реакциям [62].

Третье противоречие – между необходимостью защитить нуклеиновую кислоту от факторов крови (нуклеазы, белки, макрофаги и др.) и токсичностью самой защитной оболочки. Потенциальная воспалительная природа этих ЛНЧ не была оценена перед массовым применением таких «вакцин». Считалось, что мРНК в комплексе с ЛНЧ на основе ионизированных липидов нетоксична и обладает адъювантной активностью, дающей им преимущества перед вакцинами традиционного типа. Однако у людей, получающих «мРНК-вакцину» внутримышечно, уже на начальном этапе ее массового применения наблюдались типичные острые воспалительные эффекты неинфекционной природы, характерные для действия цитокинов: боль, отек, гиперемия в месте введения; и общие симптомы – сонливость, озноб и лихорадка [63]. Возникло непонимание происходящего – мРНК была модифицирована таким образом, чтобы не вызывать реакции со стороны врожденной иммунной системы, тогда что вызывало этот явно неинфекционный воспалительный ответ?

Ответ на этот вопрос получен S. Ndeupen с соавт. [64], показавшими в опытах на мышах способность введенных внутривенно и внутримышечно «пустых» ЛНЧ, вызывать быстрые и сильные воспалительные реакции, характеризующиеся массивной инфильтрацией нейтрофилов, активацией различных воспалительных путей и выработкой воспалительных цитокинов и хемокинов. Та же доза «пустых» ЛНЧ, введенная интраназально, привела к аналогичным воспалительным реакциям в легких и высокому уровню летальности экспериментальных животных, механизм которой ими не был выяснен. Они считают, что длительная циркуляция ионизируемого липида в крови «вакцинированного» пациента может привести к поддержанию хронического воспаления на низком уровне и истощению его иммунной системы. Данные, приведенные в работе С. Турни и А. Лефрингхаузен [65] по биораспределению липидных наночастиц, показывают, что ЛНЧ переносят мРНК во все органы и пересекают гематоэнцефалический и гематоплацентарный барьеры со всеми вытекающими из этого последствиями. Эффективность трансфекции клеток-мишеней

ный тропизм после внутривенного введения – к печени [40].

различается в разных органах, поэтому нет и линейной корреляции воздействия ЛНЧ и экспрессии мРНК [66].

Наличие таких противоречий говорит само за себя, но это еще не все.

Технология массового производства мРНК-ЛНЧ в итоге оказалась далека от совершенства. Предварительное исследование показало, что уровни загрязнения ДНК и дцРНК в «мРНК-вакцинах» Moderna и Pfizer в разных партиях различаются и превышают уровни, установленные ЕМА и FDA. Низкие уровни дцРНК, образующиеся в процессе производства, как побочный продукт IVT, генерируемые РНК-полимеразой T7, способны активировать врожденные иммунные сенсоры и вызывать воспалительные процессы в эндотелиальной ткани сосудов. Различные уровни загрязняющих веществ между партиями вакцин объясняют разные уровни побочных эффектов «вакцинации» [67]. M. Schmeling et al. [68] обнаружили, что ~4,2 % флаконов ответственны за >70 % серьезных осложнений «вакцинации».

4. Управление «из вне» генами человека

Первые попытки управления белковым синтезом через вмешательство извне в транскрипцию генов эукариотических клеток, описаны в 1978 г. P.C. Zamecnik и M.L. Stephenson. Им удалось в условиях *in vitro* добиться блокирования размножения вируса саркомы Рауса в культуре ткани фибробластов куриных эмбрионов добавлением синтетического антисмыслового олигонуклеотида (synthetic antisense oligonucleotide, ASO), представляющего собой тридекамер d(A-A-T-G-G-T-A-A-A-T-G-G), комплементарный 13 нуклеотидам 3'- и 5'-повторяющихся концевых последовательностей рибосомы 35S. Для лучшего понимания технологий управления генами человека, они разделены на те, которые можно реализовать короткими одноцепочечными синтетическими молекулами нуклеиновых кислот и короткими двухцепочечными РНК.

Управление генами посредством коротких одноцепочечных синтетических молекул нуклеиновых кислот. В основном осуществляется в ядре клетки в ходе транскрипции и посттранскрипционной модификации РНК в цитоплазме. Современные ASO представляют собой короткие одноцепочечные синтетические молекулы РНК или ДНК. После того, как антисмысловые олигонуклеотиды попадают в клетку, они посредством комплементарного спаривания оснований с высокой специфичностью (стехиометрически) связываются со «своей» целевой мРНК или с

ее ядерным предшественником – пре-мРНК, создавая «стерический блок». ASO оказывают разнообразное влияние на процессы экспрессии генов [58, 69]:

- посредством связывания со специфическими сайтами сплайсинга модулируют их альтернативные паттерны, либо стимулируют, либо ингибируя включение или исключение экзонов (пропуск экзонов), тем самым образуя случайные изоформы зрелого транскрипта мРНК;

- запускают расщепление 5'-кэп-структур, что ингибирует трансляцию и приводит к распаду мРНК;

- препятствуют трансляции точно связываясь со специфической молекулой мРНК, тем самым ингибируя процесс рекрутирования рибосом и последующий синтез белков;

- иницируют расщепление в двухцепочечных гибридах РНК:ДНК, задействуя РНКазу H1, что приводит к деградации целевой молекулы мРНК;

- предотвращают полиаденилирование путем связывания с сайтом узнавания полиаденилирования внутри ядра клетки, тем самым ингибируя добавление поли(А)-хвоста к мРНК – трансляция мРНК нарушается, что нарушает стабильность РНК и приводит к снижению уровней целевой мРНК и, соответственно, целевого белка.

Через ASO можно влиять на все известные классы РНК. Показано, что можно создать ASO, которые способны избирательно увеличивать трансляцию специфических белков. Это потенциально важное достижение генной терапии *in vivo*, поскольку помимо изменения сплайсинга оно открывает возможности для увеличения уровней экспрессии специфических белков, т.е. по сути, использовать ASO в качестве «агонистов», а не для уменьшения мишеней или «антагонистической активности», что считается основным применением ASO [10].

Следовательно, ASO – это универсальный набор средств для модуляции экспрессии генов с потенциальными возможностями, как для терапевтического применения, так и применения в качестве биологических поражающих агентов.

ASO в неизменной форме из-за нестабильности фосфодиэфирной связи быстро разрушаются нуклеазами. Повышение устойчивости ASO к нуклеазам первоначально достигали путем включения фосфотиоатных ASO (phosphorothioate, PS). Такая модификация увеличила их устойчивость к нуклеазам, снизила их гидрофильность и способствовала связыванию с сывороточными белками, что, в свою очередь, увеличило про-

должительность их циркуляции в системе кровообращения и связывание с белками и рецепторами клеточной поверхности. В литературе фосфотиоатные ASO обозначают как PS ASO [69]. Существуют другие, более поздние модификации ASO²⁶.

Теоретические расчеты показали, что примерно 16 нуклеотидов способны обеспечить достаточную аффинность ASO для связывания с родственной последовательностью нуклеиновой кислоты и достаточную специфичность для воздействия на одиночный транскрипт. При увеличении длины более 20–22 нуклеотидов у них проявляется склонность к образованию собственных структур, ингибирующих связывание с родственными последовательностями, и к другим эффектам, снижающим эффективность управления генами [10].

Требуется около 60 минут, чтобы накопить PS ASO в цитозоле и ядре клетки, в количестве, достаточном для гибридизации с целевой РНК, проявляющимся физиологическим эффектом. После высвобождения из эндолизомы PS ASO проявляют длительный период полураспада (от 2 до 4 недель) и оказывают длительное ингибирующее действие на их РНК-мишени [10].

Управление генами посредством коротких двухцепочечных РНК. В основном заключается в управлении посттранскрипционным процессингом и трансляцией РНК, и реализуется в цитоплазме клетки. Технологии разработаны в первой половине 1990-х гг. после обнаружения способности таких структур нарушать развитие личиночной стадии почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* [70].

Первоначально считалось, что в молекулярной основе блокирования генов нематоды *C. elegans* лежит описанный выше антисмысловой механизм, зависящий от гибридизации между регуляторной РНК и транскриптами клеточной мРНК. Но в 1998 г., американские ученые Эндрю Файер (Andrew Fire) и Крейг Мелло (Craig Mello) показали, что у нематод введение двухцепочечной РНК действительно вызывает специфичное для последовательности «молчание» мРНК. Но этот процесс не был результатом гибридизации. На одну пораженную клетку требовалось всего несколько молекул введенной двухцепочечной РНК, что свидетельствовало против стехиометрического вмешательства в эндогенную мРНК и позволило им предположить

участие в процессе блокирования генов каталитического или амплификационного компонента. Обнаруженное явление они назвали «РНК-интерференцией» (RNA interference, RNAi, РНКи) [71]. Их работа подготовили почву для последующих исследований, которые охарактеризовали молекулярный механизм, лежащий в основе RNAi²⁷.

Искусственная РНК-интерференция генов человека инициируется доставкой в клетку не вызывающих врожденных иммунных ответов коротких двухцепочечных олигонуклеотидов двух типов – микроРНК (англ. microRNA, miRNA) и малых интерферирующих РНК – маРНК (англ. small interfering RNA, siRNA) [73].

МикроРНК – регуляторы генов, влияющие на физиологические процессы, нарушение которых приводит к патологии. Происходят из последовательности ядерной нетранслируемой ДНК (UnTranslated Region, UTR). Они расщепляются, фиксируются белком Dicer и экспортируются в цитоплазму в форме олигонуклеотидов, состоящих в основном из 22 оснований. Затем они могут гибридизировать мРНК, считываемую в рибосоме, тем самым останавливая удлинение цепи белка. В клетках животных микроРНК не гибридизуются полностью с целевой мРНК, но являются эффективным ингибитором удлинения рибосомного белка. Зона спаривания на 5'-конце микроРНК называется семенем гибридизации (hybridization seed). Если не менее 8 последовательных нуклеотидов семени гибридизации микроРНК комплементарно спариваются нуклеотидами на 3'-конце целевой мРНК перед хвостом Poly(A), то происходит остановка удлинения аминокислотной цепи соответствующего белка в рибосоме, следовательно, ингибирование его биосинтеза [22].

МикроРНК требуют лишь частичной комплементарности для распознавания мишени в геноме человека. Следовательно, микроРНК одного типа может с разным сродством взаимодействовать с несколькими мРНК. Известно также, что одна микроРНК способна подавлять образование сотен белков [74]. Особенно опасны их смеси. По данным K.V. Nevskaya с соавт. [75] смесь (miR-195–5p/miR-520a/miR-630) ингибировала 3605 генов (86,62 %) и активировала 557 генов (13,38 %) клеточной линии T47D. Полный эффект трудно прогнозировать, так как транскриптомное тар-

²⁶ Более подробно ознакомиться с ними можно в работах S.T. Crooke с соавт. [10] и D. Collotta с соавт. [73].

²⁷ В 2006 г. Эндрю Файер и Крейг Мелло получили Нобелевскую премию в области физиологии и медицины за работы по изучению РНК-интерференции у нематоды *C. elegans*.

гетирование и регуляция генов микроРНК зависит еще и от клеточного контекста регуляции генов [76].

Малые интерферирующие РНК (маРНК) инициируют РНК-интерференцию, стимулирующую «молчание» комплементарных им целевых мРНК. После попадания в цитоплазму клетки маРНК либо загружается непосредственно в РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (RNA-induced silencing complex, RISC), либо вступает в процесс интерференции, опосредованный эндорибонуклеазой Dicer. Активированный RISC путем спаривания оснований локализуется на гомологичном транскрипте мРНК и принуждает ген-мишень к «молчанию» расщеплением его мРНК в положении двенадцатого нуклеотида от 3'-конца мРНК.

Короткая шпилечная РНК (small hairpin RNA, short hairpin RNA, shRNA; кшРНК) – частный случай маРНК. Область применения – лечение запущенных и/или метастатических форм рака. Для доставки в организм человека кшРНК, были сконструированы векторы с использованием как вирусных (включая ретровирусные, аденовирусные и лентивирусные векторы), так и плазмидных систем [77]. Одним преимуществом кшРНК, как поражающего агента, является то, что их экспрессирующие последовательности могут быть интегрированы в геном человека и вызывать стойкое «молчание» целевого гена [78].

Доставка олигонуклеотидов к мишени. Потенциал доставки ASO и маРНК повышают путем получения биоконъюгатов или их включения в наночастицы²⁸.

Биоконъюгаты могут быть сконструированы таким образом, что они разбираются после проникновения в клетку. Такого эффекта разработчики достигают, используя кислоталабильные линкеры, расщепляющиеся в эндосомах; дисульфидные линкеры, восстанавливающиеся в цитоплазме; или конструкции маРНК, являющихся субстратом для фермента Dicer [79].

Основные преимущества систем доставки олигонуклеотидов в составе наночастиц включают индивидуальную оптимизацию биофизических (например, размера, формы и химического/материального состава) и биологических (например, функционализация лигандов для нацеливания на рецептор) свойств наночастиц, что позволяет созда-

вать узкоспециализированные платформы доставки. К ним относятся рассмотренные выше липоплексы, липосомы и наночастицы на основе мезопористого кремния [69].

Редактирование генома человека. В последнее десятилетие редактирование генома стало потенциальной альтернативой генной терапии человека. Технология разработана благодаря открытию:

- коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами и разделенных некодирующими и неповторяющимися последовательностями – спейсерами (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR/Cas) – в естественных условиях обеспечивают бактериям и археям адаптивную невосприимчивость к генам вирусов и плазмид, т.е. генетический адаптивный иммунитет бактерий;

- обнаружению CRISPR-ассоциированного белка – Cas9 (англ. CRISPR associated protein 9) – эндонуклеазы, связанной с адаптивной иммунной системой бактерий CRISPR, управляемой при помощи РНК-гидов (guideRNA, gRNA или sgRNA).

В сконструированные системы CRISPR включены два элемента: направляющая РНК (гидРНК, гРНК или sgRNA) и CRISPR-ассоциированная эндонуклеаза (белок Cas). гРНК представляет собой короткую синтетическую РНК, состоящую из Cas-связывающей каркасной последовательности и сконструированного исследователем спейсера из ~20 нуклеотидов, определяющего геномную мишень, подлежащую изменению [80].

Участки в геноме человека, на которые могут быть нацелены различные белки Cas, ограничены местоположениями прилегающего протоспейсерного мотива (protospacer adjacent motif, PAM) – последовательности ДНК из 2–6 пар оснований, которая идет сразу после последовательности ДНК, на которую нацелена нуклеаза Cas9. гРНК могут транспортировать Cas9 в любой локус генома для редактирования гена, но редактирование не может происходить ни на каком сайте, кроме того, в котором Cas9 распознает PAM. Таким образом, Cas9 не сможет успешно связываться или расщеплять целевую последовательность ДНК, если за ней не следует последовательность PAM [80].

Нуклеазы Cas, выделенные из разных видов бактерий, распознают разные последовательности PAM. Помимо известных

²⁸ Более подробно об их использовании для доставки в организм человека ASO и маРНК, см. работу T.C. Roberts с соавт. [69].

CRISPR-Cas9 и CRISPR-Cpf1, существует множество еще не открытых нуклеаз и PAM²⁹.

Изменив целевую последовательность в гРНК, можно направить белок Cas к определенному локусу ДНК, где он совершит двухцепочечный разрыв. Механизмы эндогенной репарации, запускаемые двухцепочечным разрывом, способны привести:

- к нокауту гена посредством мутации сдвига рамки считывания³⁰ или к нокауту желаемой последовательности, если присутствует матрица ДНК;

- или к созданию гетерологичных генов посредством соединения негомологичных концов и соответствующей гомологичной рекомбинации.

Технология позволяет расщеплять практически любую нуклеотидную последовательность генома человека, комплементарную гРНК [80].

Технологии CRISPRi/Cas предлагают использовать тоньше, например, стерически подавлять транскрипцию гена, блокируя инициацию или элонгацию транскрипции. Это достигается путем конструирования гРНК, комплементарной промотору или к экзонным последовательностям. Дифференциальной экспрессии генов можно достичь путем изменения эффективности спари-

вания оснований гРНК с целевыми локусами. Можно вызвать стерический блок, который останавливает элонгацию транскрипта с помощью РНК-полимеразы, что приводит к репрессии целевого гена [80]. Уже более 10 лет назад разработаны протоколы для проектирования, конструирования и экспрессии тысяч индивидуальных гРНК, предназначенных для репрессии транскрипции любого интересующего исследователя гена [81].

Разработана система, родственная CRISPR, использующая программируемую одноэффекторную РНК-ориентированную рибонуклеазу Cas13, распознающую и разрезающую РНК, а не ДНК. Система называется «Редактирование РНК для программируемой замены А на I» (RNA Editing for Programmable A to I Replacement, REPAIR). Она не имеет строгих ограничений последовательности, может использоваться для редактирования полноразмерных транскриптов и позволяет редактировать РНК до того, как она будет транслирована в белки³¹ [82].

Доставка в организм человека систем CRISPR/Cas достигается теми же носителями и способами, что используются для доставки мРНК, ASO и двухцепочечных РНК, включая ингаляционный путь [83]. На рисунке 6 показана доставка плазмиды, кодирующей Cas9 и

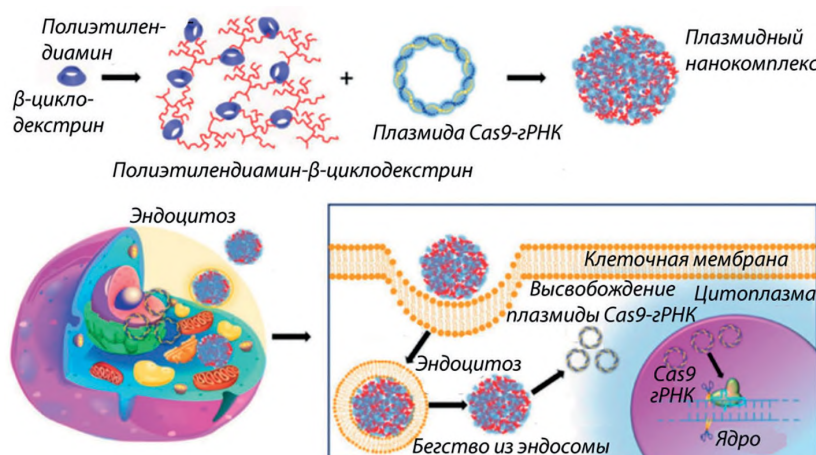


Рисунок 6 – Катионный полиплекс, используемый в качестве средства доставки плазмиды CRISPR/Cas9 для редактирования генома. Катионный полимер – поли-этилендиамин-β-циклодекстрин используется для эффективной доставки к органу-мишени плазмиды, кодирующей Cas9 и гРНК (рисунок адаптирован по [84])

Figure 6 – A cationic polyplex used as CRISPR/Cas9 plasmid delivery tool. This plasmid is used for genome editing. A cationic polymer–polyethylene diamine-β-cyclodextrin ensures the delivery of plasmid that encodes Cas9 and gRNA to the target organ (the figure is adapted from [84])

²⁹ Even CRISPR. A new way to edit DNA may speed the advance of genetic engineering. Economist. 2015. Oct 3. URL: <https://www.economist.com/science-and-technology/2015/10/03/even-crispr> (дата обращения: 09.05.2024)

³⁰ Например, вырезали два или вставили четыре нуклеотида, нарушится последовательность, кодирующая белок. Возникнет сдвиг рамки считывания, в результате которого ген перестанет выполнять свою функцию, так как клетка не сможет использовать его информацию, чтобы синтезировать функциональный белок.

³¹ Альтернативные системы CRISPRi/Cas описаны в работе А. Sparmann, J. Vogel [58].

гРНК, в полиплекс на основе катионного полимера полиэтилендиамин-циклодекстрина.

В настоящее время CRISPRi/Cas – самый простой, гибкий, точный и эффективный метод генетических манипуляций с геномом человека в условиях *in vivo*. гРНК можно мультиплексировать для одновременного воздействия на множество последовательностей, опосредованных Cas9, что позволяет увеличить скорость расщепления генов [85]. Если жизненно важный ген «выбит», это может привести к болезни, инвалидности, деградации, утрате фертильности или гибели человека.

Более опасным применением технологии CRISPRi/Cas исследователи считают создание систем, способных вызывать *генный драйв* в целевой популяции – т.е. стимулировать смещенное наследование определенных генов. Большинство таких систем основаны на естественно существующих «эгоистичных генетических элементах», частота функционирования которых увеличивается с каждым поколением, даже без предоставления преимуществ их хозяину в окружающей среде, тем самым создавая менделевские модели наследования³². При целенаправленном применении драйва генов, вызывающих патологические процессы, технология способна сократить численность отдельных человеческих популяций или привести к их исчезновению в течение нескольких поколений [86].

В ежегодном отчете об угрозах за 2016 г. директор национальной разведки США (US Intelligence Community) Джеймс Клэппер (James Clapper) отнес редактирование генов к потенциальному направлению создания оружия массового уничтожения³³ [85].

Обсуждение

Приведенные данные показывают серьезную и многоаспектную опасность, исходящую от бездумного распространения мРНК-технологий. С одной стороны, она обусловлена несовершенством самой технологии

и, соответственно, невозможностью просчитывать все риски и последствия массового применения продуктов, созданных на такой основе; с другой – заинтересованностью каких-то глобальных сил в массовом навязывании под различными предложениями продуктов, оказывающих воздействие на геном человека, например, под видом «вакцин». Использованные в пандемию COVID-19 «мРНК-вакцины» не были одобрены для снижения передачи вируса. Не существует и проспективных, двойных слепых, рандомизированных, плацебо-контролируемых исследований, демонстрирующих снижение госпитализаций и смертей от COVID-19 в качестве первичных (primary end-point) или вторичных (secondary endpoints) конечных точек³⁴ [87]. Критерием их эффективности стало образование «нейтрализующих антител», хотя уже не менее 100 лет известно, что они используются в условиях *in vitro* для серотипирования вирусов и для подобных научных целей. Реакция нейтрализации, по названию которой появились «нейтрализующие антитела», всегда считалась диагностическим тестом как, например, реакция связывания комплемента, к протективным эффектам в условиях *in vivo* она отношения не имеет.

Вспышки COVID-19 возникали в «высоковакцинированной среде». По статистике израильской клиники, за 16–26 недель после «вакцинации» двумя дозами 96,2 % персонала «мРНК-вакциной» Comirnaty (BNT162b2 mRNA, BioNTech-Pfizer, Майнц, Германия/Нью-Йорк, США) (медиана: 25 недель) передача вируса усилилась, уровень заболеваемости среди полностью «вакцинированных» сотрудников составил 10,6 % (16/151), среди пациентов – 23,7 % (23/97). Четырнадцать из 23 полностью «вакцинированных» пациентов тяжело заболели или умерли – 60,8 % [88].

Ретроспективный анализ последствий их применения во время пандемии COVID-19 показал, что ущерб здоровью населения стран

³² В клетках человека две копии каждой хромосомы. Если возникает разрыв, клетка может использовать вторую хромосому и на ее основании достроить поврежденный участок – скопировать его в поврежденную хромосому. В этой ситуации клетку можно «обмануть» и «подсунуть» ей вместо второй хромосомы «эгоистичный генетический элемент», т.е. генетический сегмент, который может усилить собственную передачу за счет других генов в геноме, даже если это не оказывает положительного или отрицательного влияния на приспособленность организма. Тогда клетка починит разрыв, встроив его в обе хромосомы со всеми вытекающими последствиями для следующих поколений.

³³ Более подробно об использовании данной технологии для разработки принципиально новых агентов БО, можно прочитать в недавно вышедшей книге Paris K. Genome Editing and Biological Weapons. Assessing the Risk of Misuse. Springer. USA. 2023. URL: <https://digital-commons.usnwc.edu/nwc-review/vol76/iss4/16> (дата обращения: 10.04.2024).

³⁴ Clinical endpoint. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Clinical_endpoint (дата обращения: 22.05.2024).

оказался значительным³⁵. Во многих из них была обнаружена избыточная смертность населения от причин, не связанных с COVID-19, что свидетельствует о каком-то одновременном неблагоприятном воздействии [89].

Статистика о якобы 14,4 млн спасенных жизней, связанных с преимуществами «вакцинации», получена на основе математической модели, позже признанной необоснованной [59, 90, 91].

По сути в эту пандемию мы столкнулись с апробацией новой формы ведения биологической войны принципиально новыми поражающими агентами с ранее не ставившейся целью – депопуляция населения. О чем, кстати, давно уже пишут на Западе апологеты биологической войны [1, 2, 6, 7, 85].

Выводы

1. Необходимо наладить жесткий государственный контроль над разработкой технологий воздействия на геном человека, не допуская их применение под другими названиями.

2. Для выявления спектра неблагоприятных последствий применения мРНК-технологий, целесообразно на десять лет ограничить их применение только в онкологии.

3. Все инъекционные препараты, поступающие в Россию из-за рубежа должны контролироваться на наличие «закладок» нанообъектов в рамках специально разработанных общих фармакопейных статей.

³⁵ Литература на эту тему представлена на веб-сайте: www.react19.org (Science-based support for people suffering from long-term COVID-19 vaccine effects). Опубликовано более 3,5 тыс. статей и отчетов о случаях осложнений в более чем двадцати заголовках систем органов и синдромов (дата обращения: 14.06.2024).

Ограничения исследования / Limitations of the study

Обусловлены анализом только открытых научных источников, доступных через сеть Интернет / The limitations are stipulated by the analysis of open scientific sources available on the Internet (only).

Список источников/References

1. Ainscough M. Next Generation Bioweapons: *The Technology of Genetic Engineering Applied to Biowarfare and Bioterrorism, Future Warfare Series 14*. Maxwell Air Force Base, AL: Air University, 2002.
2. Black JL 3rd. Genome projects and gene therapy: gateways to next generation biological weapons. *Mil Med.* 2003;168(11):864–71. PMID: 14680038.
3. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab.* 2003;80(1–2):148–58. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.08.016>
4. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med.* 2002;346(16):1185–93. <https://doi.org/10.1056/nejmoa012616>
5. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 2003;302(5644):415–9. <https://doi.org/10.1126/science.1088547>
6. Gisselsson D. Next-Generation Biowarfare: Small in Scale, Sensational in Nature? *Health Secur.* 2022;20(2):182–6. <https://doi.org/10.1089/hs.2021.0165>
7. Dominik J. Future Bioterror and Biowarfare Threats for NATO's Armed Forces until 2030. *J Advanced Military Studies.* 2023;14(1):118–43. https://muse.jhu.edu/view_citations?type=article&id=901770 (дата обращения: 12.01.2024).
8. Beissert T, Perkovic M, Vogel A, Erbar S, Walzer KC, Hempel T, et al. A Trans-amplifying RNA Vaccine Strategy for Induction of Potent Protective Immunity. *Mol Ther.* 2020;28(1):119–28. <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2019.09.009>
9. Yang L, Gong L, Wang P, Zhao X, Zhao F, Zhang Z, Li Y, Huang W. Recent Advances in Lipid Nanoparticles for Delivery of mRNA. *Pharmaceutics.* 2022;14(12):2682. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122682>
10. Crooke ST, Liang XH, Baker BF, Crooke RM. Antisense technology: A review. *J Biol Chem.* 2021;296:100416. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100416>

11. Chen F, Liu Q, Xiong Y, Xu L. Nucleic acid strategies for infectious disease treatments: The nanoparticle-based oral delivery route. *Front Pharmacol.* 2022;13:984981.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.984981>
12. Зароскин АА, Захарова МВ, Нагорных МО. Структурные элементы векторов на основе ДНК и РНК для доставки геномных редакторов в клетки высших эукариот *in vitro* и *in vivo*. *Молекулярная биология.* 2022;56(6):1023–38.
<https://doi.org/10.31857/S002689842206026X>
- Zagoskin AA, Zakharova MV, Nagornykh MO. Structural elements of DNA and RNA eukaryotic expression vectors for *in vitro* and *in vivo* genome editors delivery. *Mol Biol.* 2022;56(6):1023–38.
<https://doi.org/10.31857/S002689842206026X>
13. Tusup M, French LE, De Matos M, Gatfield D, Kundig T, Pascolo S. Design of *in vitro* Transcribed mRNA Vectors for Research and Therapy. *Chimia (Aarau).* 2019;73(5):391–4.
<https://doi.org/10.2533/chimia.2019.391>
14. Pordanjani SR, Pordanjani AR, Askarpour H, Arjmand M, Babakhanian M, Amiri M, et al. A Comprehensive Review on Various Aspects of SARS-CoV-2 (COVID-19) Vaccines. *Int J Prev Med.* 2022;13:151.
https://doi.org/10.4103/ijpvm.ijpvm_513_21
15. Gote V, Bolla PK, Kommineni N, Butreddy A, Nukala PK, Palakurthi SS, et al. A Comprehensive Review of mRNA Vaccines. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2700.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032700>
16. Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol.* 2018;9:2379.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02379>
17. 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.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq347>
18. 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;217:337–44.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.051>
19. Rubio-Casillas A, Cowley D, Raszek M, Uversky VN, Redwan EM. Review: N1-methyl-pseudouridine (m1Ψ): Friend or foe of cancer? *Int J Biol Macromol.* 2024;267(Pt 1):131427.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131427>
20. Nelson J, Sorensen EW, Mintri S, Rabideau AE, Zheng W, Besin G, et al. Impact of mRNA chemistry and manufacturing process on innate immune activation. *Sci Adv.* 2020;6(26):eaaz6893.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz6893>
21. Park JW, Lagniton PNP, Liu Y, Xu RH. mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how. *Int J Biol Sci.* 2021;17(6):1446–60.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.59233>
22. Le T, Sun C, Chang J, Zhang G, Yin X. mRNA Vaccine Development for Emerging Animal and Zoonotic Diseases. *Viruses.* 2022;14(2):401.
<https://doi.org/10.3390/v14020401>
23. Demongeot J, Fougère C. mRNA COVID-19 Vaccines-Facts and Hypotheses on Fragmentation and Encapsulation. *Vaccines (Basel).* 2022;11(1):40.
<https://doi.org/10.3390/vaccines11010040>
24. Karam M, Daoud G. mRNA vaccines: Past, present, future. *Asian J Pharm Sci.* 2022;17(4):491–522.
<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2022.05.003>
25. Akahata W, Sekida T, Nogimori T, Ode H, Tamura T, Kono K, et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 self-amplifying RNA vaccine expressing an anchored RBD: A randomized, observer-blind phase 1 study. *Cell Rep Med.* 2023;4(8):101134.
<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101134>
26. Fath T, Bachtiar EW, Alitongbieke G, Pan Y, Hu Y, Widowati R. Immunoinformatic of novel self-amplifying mRNA vaccine lipid nanoparticle against SARS-CoV-2. *J Adv Pharm Technol Res.* 2024;15(2):91–8.
https://doi.org/10.4103/JAPTR.JAPTR_424_23
27. Hick TAH, Geertsema C, Nijland R, Pijlman GP. Packaging of alphavirus-based self-amplifying mRNA yields replication-competent virus through a mechanism of aberrant homologous RNA recombination. *mbio.* 2024:e0249424.
<https://doi.org/10.1128/mbio.02494-24>

28. Oba M. Study on development of polymeric micellar gene carrier and evaluation of its functionality. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(7):1045–51.
<https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00287>
29. Iqbal S, Blenner M, Alexander-Bryant A, Larsen J. Polymersomes for Therapeutic Delivery of Protein and Nucleic Acid Macromolecules: From Design to Therapeutic Applications. *Biomacromolecules.* 2020;21(4):1327–50.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01754>
30. Patel AK, Kaczmarek JC, Bose S, Kauffman KJ, Mir F, Heartlein MW, et al. Inhaled Nanoformulated mRNA Polyplexes for Protein Production in Lung Epithelium. *Adv Mater.* 2019;31(8):e1805116.
<https://doi.org/10.1002/adma.201805116>
31. Cai X, Dou R, Guo C, Tang J, Li X, Chen J, et al. Cationic Polymers as Transfection Reagents for Nucleic Acid Delivery. *Pharmaceutics.* 2023;15(5):1502.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051502>
32. Pardridge WM. A Historical Review of Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 2022;14(6):1283.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061283>
33. Tenchov R, Bird R, Curtze AE, Zhou Q. Lipid Nanoparticles–From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. *ACS Nano.* 2021;15(11):16982–17015.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>
34. Jiao L, Sun Z, Sun Z, Liu J, Deng G, Wang X. Nanotechnology-based non-viral vectors for gene delivery in cardiovascular diseases. *Front Bioeng Biotechnol.* 2024;12:1349077.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1349077>
35. Jiao L, Sun Z, Sun Z, Liu J, Deng G, Wang X. Nanotechnology-based non-viral vectors for gene delivery in cardiovascular diseases. *Front Bioeng Biotechnol.* 2024;12:1349077.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1349077>
36. Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J.* 2009;11(4):671–81.
<https://doi.org/10.1208/s12248-009-9143-y>
37. Harvie P, Wong FM, Bally MB. Use of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates to regulate the surface attributes and transfection activity of lipid-DNA particles. *J Pharm Sci.* 2000;89(5):652–63.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200005\)89:5<652::AID-JPS11>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200005)89:5<652::AID-JPS11>3.0.CO;2-H)
38. Pardridge WM. Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(2):131–9.
<https://doi.org/10.1038/nrd725>
39. Zhang Y, Schlachetzki F, Zhang YF, Boado RJ, Pardridge WM. Normalization of striatal tyrosine hydroxylase and reversal of motor impairment in experimental parkinsonism with intravenous nonviral gene therapy and a brain-specific promoter. *Hum Gene Ther.* 2004;15(4):339–50.
<https://doi.org/10.1089/10430340360464660>
40. Bitounis D, Jacquinet E, Rogers MA, Amiji MM. Strategies to reduce the risks of mRNA drug and vaccine toxicity. *Nat Rev Drug Discov.* 2024;23(4):281–300.
<https://doi.org/10.1038/s41573-023-00859-3>
41. Cullis PR, Hope MJ. Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Mol Ther.* 2017 5;25(7):1467–75.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.013>
42. Zhang C, Xie H, Zhang Z, Wen B, Cao H, Bai Y, et al. Applications and Biocompatibility of Mesoporous Silica Nanocarriers in the Field of Medicine. *Front Pharmacol.* 2022;13:829796.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.829796>
43. 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;41:100424.
<https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2021.100424>
44. 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.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.04.007>
45. Brogna C, Cristoni S, Marino G, Montano L, Viduto V, Fabrowski M, et al. Detection of recombinant Spike protein in the blood of individuals vaccinated against SARS-CoV-2: Possible molecular mechanisms. *Proteomics Clin Appl.* 2023;17(6):e2300048.
<https://doi.org/10.1002/prca.202300048>
46. Banoun H. mRNA: Vaccine or Gene Therapy? The Safety Regulatory Issues. *Int J Mol Sci.* 2023;24(13):10514.
<https://doi.org/10.3390/ijms241310514>

47. Mead MN, Seneff S, Wolfinger R, Rose J, Denhaerynck K, Kirsch S, et al. COVID-19 mRNA Vaccines: Lessons Learned from the Registrational Trials and Global Vaccination Campaign. *Cureus*. 2024;16(1):e52876. <https://doi.org/10.7759/cureus.52876>
48. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene*. 2013;525(2):162–9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>
49. Hanna N, Heffes-Doon A, Lin X, Manzano De Mejia C, Botros B, Gurzenda E, et al. Detection of Messenger RNA COVID-19 Vaccines in Human Breast Milk. *JAMA Pediatr*. 2022;176(12):1268–70. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2022.3581>
50. Gote V, Bolla PK, Kommineni N, et al. Comprehensive Review of mRNA Vaccines. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3):2700. <https://doi.org/10.3390/ijms24032700>
51. Kis Z, Kontoravdi C, Dey AK, Shattock R, Shah N. Rapid development and deployment of high-volume vaccines for pandemic response. *J Adv Manuf Process*. 2020;2(3):e10060. <https://doi.org/10.1002%2Famp2.10060>
52. Bharali DJ, Klejbor I, Stachowiak EK, Dutta P, Roy I, Kaur N, et al. Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(32):11539–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504926102>
53. Cheang TY, Tang B, Xu AW, Chang GQ, Hu ZJ, He WL. Promising plasmid DNA vector based on APTES-modified silica nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1061–7. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28267>
54. Ngamcherdtrakul W, Sangvanich T, Reda M, Gu S, Bejan D, Yantasee W. Lyophilization and stability of antibody-conjugated mesoporous silica nanoparticle with cationic polymer and PEG for siRNA delivery. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:4015–27. <https://doi.org/10.2147/IJN.S164393>
55. Sameti M, Bohr G, Ravi Kumar MN, Kneuer C, Bakowsky U, Nacken M, et al. Stabilisation by freeze-drying of cationically modified silica nanoparticles for gene delivery. *Int J Pharm*. 2003;266(1–2):51–60. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(03\)00380-6](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(03)00380-6)
56. Van Lint S, Renmans D, Broos K, Dewitte H, Lentacker I, Heirman C, et al. The ReNAissanCe of mRNA-based cancer therapy. *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(2):235–51. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.957685>
57. Dolgin E. The tangled history of mRNA vaccines. *Nature*. 2021;597(7876):318–24. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02483-w>
58. Sparmann A, Vogel J. RNA-based medicine: from molecular mechanisms to therapy. *EMBO J*. 2023;42(21):e114760. <https://doi.org/10.15252/embj.2023114760>
59. Castruita JAS, Schneider UV, Mollerup S, Leineweber TD, Weis N, Bukh J, et al. SARS-CoV-2 spike mRNA vaccine sequences circulate in blood up to 28 days after COVID-19 vaccination. *APMIS*. 2023;131(3):128–32. <https://doi.org/10.1111/apm.13294>
60. Röltgen K, Nielsen SCA, Silva O, Younes SF, Zaslavsky M, Costales C, et al. Immune imprinting, breadth of variant recognition, and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell*. 2022;185(6):1025–40.e14. <https://doi.org/10.1016%2Fj.cell.2022.01.018>
61. Krauson AJ, Casimero FVC, Siddiquee Z, Stone JR. Duration of SARS-CoV-2 mRNA vaccine persistence and factors associated with cardiac involvement in recently vaccinated patients. *NPJ Vaccines*. 2023;8(1):141. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00742-7>
62. Mulrone TE, Pöyry T, Yam-Puc JC, Rust M, Harvey RF, Kalmar L, et al. N1-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting. *Nature*. 2024;625(7993):189–94. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06800-3>
63. Jackson LA, Anderson EJ, Roupael NG, et al. mRNA-1273 Study Group. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med*. 2020;383(20):1920–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022483>
64. Ndeupen S, Qin Z, Jacobsen S, Bouteau A, Estanbouli H, Igyártó BZ. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience*. 2021;24(12):103479. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103479>
65. Turni C, Lefringhausen A. Covid-19 vaccines – An Australian Review. *J Clin Exp Immunol*. 2022;7:491–508.
66. Di J, Du Z, Wu K, Jin S, Wang X, Li T, et al. Biodistribution and Non-linear Gene Expression of mRNA LNPs Affected by Delivery Route and Particle Size. *Pharm Res*. 2022;39(1):105–14. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03166-5>

67. Igyártó BZ, Qin Z. The mRNA-LNP vaccines – the good, the bad and the ugly? *Front Immunol.* 2024;15:1336906.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1336906>
68. Schmeling M, Manniche V, Hansen PR. Batch-dependent safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *Eur J Clin Invest.* 2023;53(8):e13998.
<https://doi.org/10.1111/eci.13998>
69. Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(10):673–94.
<https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>
70. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843–54.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
71. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391(6669):806–11.
<https://doi.org/10.1038/35888>
72. Collotta D, Bertocchi I, Chiapello E, Collino M. Antisense oligonucleotides: a novel Frontier in pharmacological strategy. *Front Pharmacol.* 2023;14:1304342.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1304342>
73. Cai X, Dou R, Guo C, Tang J, Li X, Chen J, et al. Cationic Polymers as Transfection Reagents for Nucleic Acid Delivery. *Pharmaceutics.* 2023;15(5):1502.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051502>
74. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 2008;455(7209):58–63.
<https://doi.org/10.1038/nature07228>
75. Nevskaya KV, Pershina AG, Hmelevskaya ES, Efimova LV, Ibragimova MK, Dolgasheva DS, et al. Prevention of Metastasis by Suppression of Stemness Genes Using a Combination of microRNAs. *J Med Chem.* 2024;67(7):5591–602.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c02199>
76. Hsin JP, Lu Y, Loeb GB, Leslie CS, Rudensky AY. The effect of cellular context on miR-155-mediated gene regulation in four major immune cell types. *Nat Immunol.* 2018;19(10):1137–45.
<https://doi.org/10.1038/s41590-018-0208-x>
77. Lambeth LS, Moore RJ, Muralitharan M, Dalrymple BP, McWilliam S, Doran TJ. Characterisation and application of a bovine U6 promoter for expression of short hairpin RNAs. *BMC Biotechnol.* 2005;5:13.
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-5-13>
78. Cai X, Dou R, Guo C, Tang J, Li X, Chen J, et al. Cationic Polymers as Transfection Reagents for Nucleic Acid Delivery. *Pharmaceutics.* 2023;15(5):1502.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051502>
79. Tai W. Current Aspects of siRNA Bioconjugate for In Vitro and In Vivo Delivery. *Molecules.* 2019;24(12):2211.
<https://doi.org/10.3390/molecules24122211>
80. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816–21.
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>
81. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell.* 2013;152(5):1173–83.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.132>
82. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science.* 2017;358(6366):1019–27.
<https://doi.org/10.1126/science.aag0180>
83. Blanchard EL, Vanover D, Bawage SS, Tiwari PM, Rotolo L, Beyersdorf J, et al. Treatment of influenza and SARS-CoV-2 infections via mRNA-encoded Cas13a in rodents. *Nat Biotechnol.* 2021;39(6):717–26.
<https://doi.org/10.1038/s41587-021-00822-w>
84. Zhang Z, Wan T, Chen Y, Chen Y, Sun H, Cao T, et al. Cationic Polymer-Mediated CRISPR/Cas9 Plasmid Delivery for Genome Editing. *Macromol Rapid Commun.* 2019;40(5):e1800068.
<https://doi.org/10.1002/marc.201800068>
85. Champer J, Buchman A, Akbari OS. Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nat Rev Genet.* 2016;17(3):146–59.
<https://doi.org/10.1038/nrg.2015.34>

86. DiEuliis D, Giordano J. Why Gene Editors Like CRISPR/Cas May Be a Game-Changer for Neuroweapons. *Health Secur.* 2017;15(3):296–302.
<https://doi.org/10.1089/hs.2016.0120>
87. Rose J, Hulscher N, McCullough PA. Determinants of COVID-19 vaccine-induced myocarditis. *Ther Adv Drug Saf.* 2024;15:20420986241226566.
<https://doi.org/10.1177/20420986241226566>
88. Shitrit P, Zuckerman NS, Mor O, Gottesman BS, Chowers M. Nosocomial outbreak caused by the SARS-CoV-2 Delta variant in a highly vaccinated population, Israel, July 2021. *Euro Surveill.* 2021;26(39):2100822.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2021.26.39.2100822>
89. Uversky VN, Redwan EM, Makis W, Rubio-Casillas A. IgG4 Antibodies Induced by Repeated Vaccination May Generate Immune Tolerance to the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Vaccines (Basel).* 2023;11(5):991.
<https://doi.org/10.3390/vaccines11050991>
90. Roussel Y, Giraud-Gatineau A, Jimeno MT, Rolain JM, Zandotti C, Colson P, et al. SARS-CoV-2: fear versus data. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;55(5):105947.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105947>
91. Ioannidis JPA, Cripps S, Tanner MA. Forecasting for COVID-19 has failed. *Int J Forecast.* 2022;38(2):423–38.
<https://doi.org/10.1016/j.ijforecast.2020.08.004>

Вклад автора / Author contribution

Разработка концепции статьи; сбор, анализ и систематизация научной литературы; написание статьи /
Elaboration of the concept of the paper; collection, analysis, and systematization of scientific literature; writing and
edition of paper.

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами
в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been doubleblind
peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from
Russian Science Citation Index database.

Об авторе/ Author

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зе-
линского» Министерства обороны Российской Федерации, 111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд
Энтузиастов, д. 19.

Супотницкий Михаил Васильевич. Главный специалист, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3193-1032>

Контактная информация автора: 27nc_l@mil.ru

27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky of the Ministry of Defence of the Russian
Federation. Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation.

Mikhail V. Supotnitskiy. Senior Researcher. Chief Specialist. Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3193-1032>

Contact information for author: Mikhail V. Supotnitskiy; 27nc_l@mil.ru