

## ТЕХНОЛОГИИ ДНК-ВАКЦИН: ДИЗАЙН И ДОСТАВКА

© 2025 г. А. А. Фандо\*, А. А. Ильичев, В. Р. Литвинова, Н. Б. Рудомётова,  
Л. И. Карпенко, А. П. Рудомётов

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора,  
Кольцово, Новосибирская обл., 630559 Россия*

*\*e-mail: nastyafando@gmail.com*

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

После доработки 17.06.2024 г.

Принята к публикации 21.06.2024 г.

Пандемия COVID-19 стала катализатором развития новых направлений в разработке вакцин, среди которых особо следует отметить технологии на основе нуклеиновых кислот (ДНК и мРНК). К интенсивно развивающейся и перспективной платформе относятся ДНК-вакцины благодаря их высокой стабильности при температуре окружающей среды и способности активировать как гуморальное, так и клеточное звено иммунитета. Полный цикл создания ДНК-вакцины, который включает конструирование плазмидной ДНК, получение штамма-продуцента, ферментацию и очистку, занимает 2–4 недели. Кроме того, технология производства таких вакцин не требует работы с опасными патогенами, что значительно облегчает процесс их создания и снижает общую стоимость. За более чем 30-летнюю историю стремительного развития технология ДНК-вакцин продолжает претерпевать изменения. В настоящее время имеется лицензированная ДНК-вакцина для профилактики COVID-19, а множество кандидатных профилактических вакцин против вирусных и бактериальных заболеваний находится на стадии клинических испытаний. В обзоре освещены не только принципы конструирования плазмидных ДНК-вакцин, но и новые технологии получения ДНК-конструкций, такие как миникольцевая ДНК, MIDGE ДНК и Doggybone™ ДНК. Новые типы ДНК-вакцин интересны тем, что они состоят только из самых необходимых элементов для активации иммунного ответа. В таких конструкциях полностью отсутствуют последовательности, необходимые для наработки плазмидной ДНК в бактериальных клетках — например, ген устойчивости к антибиотику. Одна из ключевых проблем в разработке ДНК-вакцины — способ ее доставки в клетки-мишени. На данный момент используют разные методы доставки — как химические, так и физические, — которые бурно развиваются и уже зарекомендовали себя как надежные и эффективные. Характеристики некоторых наиболее перспективных способов также представлены в обзоре.

**Ключевые слова:** ДНК-вакцина, миникольцевая ДНК, MIDGE ДНК, Doggybone™ ДНК, системы доставки

**DOI:** 10.31857/S0026898425010016, **EDN:** HDKTLK

### ВВЕДЕНИЕ

В последнее время активно развиваются исследования по разработке вакцин на основе нуклеиновых кислот (мРНК- и ДНК-вакцин). Этот вид вакцин имеет ряд преимуществ по сравнению с классическими: живыми, аттенуированными и инактивированными. Вакцины на основе нуклеиновых кислот активируют

оба звена иммунитета — как клеточное, так и гуморальное. Их можно вводить многократно, поскольку они не индуцируют антивекторный иммунный ответ. Технология производства таких вакцин не требует работы с опасными патогенами, что значительно облегчает процесс их создания и снижает его общую стоимость. А возможность быстро и легко заменять целевой

Сокращения: BGN (bovine growth hormone) — гормон роста крупного рогатого скота; CMV (cytomegalovirus) — цитомегаловирус; МНС (major histocompatibility complex) — главный комплекс гистосовместимости; мкДНК — миникольцевая ДНК; РП — родительская плазида.

ген в мРНК- или ДНК-вакцине, не меняя саму технологию производства, дает возможность быстро реагировать на возникновение мутантов или новых патогенов.

ДНК-вакцина представляет собой генно-инженерную конструкцию, которая несет ген белка-иммуногена под контролем эукариотического промотора и после введения в клетку обеспечивает синтез целевого антигена, индуцируя специфический иммунный ответ. Первое сообщение о возможности синтеза целевого белка при внутримышечном (в/м) введении ДНК появилось в 1990 году. Джон Вольф (J. Wolff) с соавт. [1] продемонстрировали, что в/м введение мышам “голой” плазмидной ДНК с чужеродным геном под контролем цитомегаловирусного (CMV) промотора обеспечивало синтез соответствующего белка в мышечных тканях. Чуть позже, в 1992 году, Tang D. с соавт. [2] показали, что в/м введение плазмид, кодирующих гены гормона роста человека и альфа-1-антитрипсина, индуцирует выработку антител на эти белки, преимущественно IgG и IgE. Ulmer J. с соавт. [3] обнаружили, что ДНК-конструкции могут индуцировать и клеточный иммунный ответ, в частности было показано формирование цитотоксических лимфоцитов в ответ на в/м введение животным плазмидной ДНК, кодирующей нуклеопротеин вируса гриппа.

Пандемия COVID-19 стала триггером развития новых направлений в разработке вакцин, среди которых лидерами стали технологии на основе нуклеиновых кислот, в том числе ДНК-вакцины [4]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на 30 марта 2023 года на разных стадиях клинических испытаний находилось 17 ДНК-вакцин, направленных на борьбу с COVID-19 (<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>). Вакцина ZyCoV-D для профилактики COVID-19, разработанная индийской компанией “Zydus Lifesciences Limited”, стала первой в мире ДНК-вакциной, одобренной для применения на человеке [5–8].

В настоящее время ведутся разработки ДНК-вакцин не только для профилактики инфекционных болезней, но и для терапии онкологических заболеваний [9, 10].

Интерес к технологии ДНК-вакцин повлек за собой разработку новых подходов их дизайна, способов доставки, методов исследования иммунного ответа, а также необходимость регулирования качества и безопасности проведения клинических испытаний. Так, в 2005

году ВОЗ разработала “Руководство по обеспечению качества и доклинической оценки безопасности ДНК-вакцин” (WHO. Guidelines for Assuring the Quality, Safety, and Efficacy of DNA Vaccines, 2007; [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-quality/guidelines-for-assuring-the-quality-and-non-clinical-safety-evaluation-of-dna-vaccines70ee1b3e-88a6-40af-8989-fbff8304a377.pdf?sfvrsn=521ee591\\_1&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-quality/guidelines-for-assuring-the-quality-and-non-clinical-safety-evaluation-of-dna-vaccines70ee1b3e-88a6-40af-8989-fbff8304a377.pdf?sfvrsn=521ee591_1&download=true)), которое на основе новых исследований было дополнено в 2020 году [11, 12]. Внесенные изменения сосредоточены на таких аспектах, как контроль производства, требования к доклиническим и клиническим испытаниям, а также на предоставлении информации, которая может потребоваться национальным регулирующим органам для утверждения клинических испытаний и лицензирования [13]. На данный момент Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) одобрено четыре ДНК-вакцины для использования в ветеринарии [14]. Это ДНК-вакцина против лихорадки Западного Нила для лошадей RECOMBITEK<sup>®</sup> Equine West Nile Virus (“MERIAL Ltd.”, США); вакцина против инфекционного гематопоезического некроза Apex-1HN<sup>®</sup>, производимая “Novartis” (Швейцария), лицензированная для использования на рыбах семейства Salmonidae; коммерческая плазмидная ДНК LifeTideSW5<sup>®</sup>, несущая последовательность соматолиберина, применяемая для повышения продуктивности свиноматок; и одобренная Министерством сельского хозяйства США (United States Department of Agriculture, USDA) первая терапевтическая вакцина для лечения злокачественных опухолей Oncept<sup>®</sup> (“Boehringer Ingelheim Animal Health USA Inc.”, США), предназначенная для собак с меланомой полости рта [15].

В обзоре рассмотрены известные на настоящий момент типы ДНК-вакцин, технологии их конструирования, а также способы доставки.

## ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ДИЗАЙНА ДНК-ВАКЦИН

Чаще всего в качестве ДНК-вакцин используют плазмиды, которые представляют собой кольцевую двухцепочечную ДНК, содержащую последовательности, необходимые для ее репликации и экспрессии целевого гена как в бактериальных клетках, так и *in vivo* в клетках млекопитающих. Классическая ДНК-вакцина содержит следующие структурные элементы:

целевой ген под контролем эукариотического промотора, точку начала репликации (ориджин репликации, *ori*), сигнал полиаденилирования, а также сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции для генно-инженерных манипуляций и ген устойчивости к антибиотику в качестве селективного маркера [4] (рис. 1).

В ДНК-вакцинах наиболее часто используют промотор CMV человека, так как он обеспечивает высокие уровни синтеза антигена в различных клетках организма [16, 17]. Однако вирусные промоторы быстро инактивируются из-за гиперметилирования, что приводит к подавлению экспрессии контролируемых ими трансгенов [18].

Для преодоления этих проблем были разработаны гибридные промоторы (например, комбинация промотора CMV и промотора фактора элонгации-1 $\alpha$  человека), что предотвращает дезактивацию, вызванную сайленсингом генов как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции [4, 19]. Кроме того, используют промоторы, специфичные для определенного типа клеток, — например, когда необходимо ограничить экспрессию антигена или генетических адъювантов антигенпрезентирующими клетками [4].

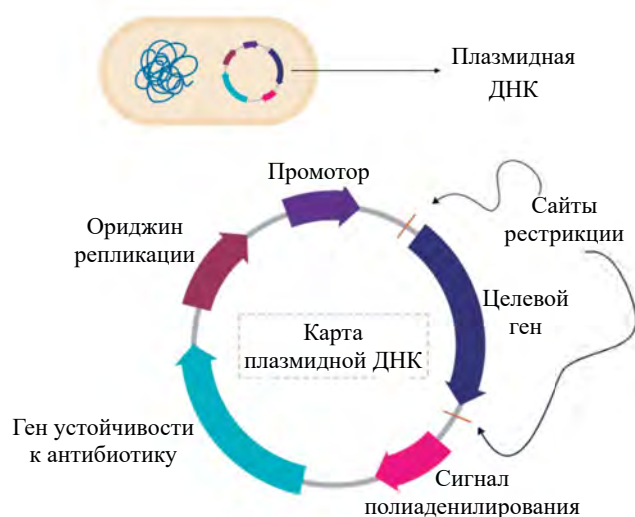
Как правило, на 5'- и 3'-концах целевого гена находятся некодирующие участки, отвечающие за регуляцию экспрессии закодированного в ДНК-вакцине антигена [20]. Для повышения экспрессии целевого гена в этих некодирующих областях можно размещать энхансер [21]. Кроме

того, вставка некоторых тканеспецифичных последовательностей, связывающих фактор транскрипции, в последовательность плазмидной ДНК может приводить к ее тканеспецифичному ядерному импорту [4, 22].

Один из факторов, влияющий на иммуногенность вакцины, — скорость трансляции мРНК, синтезированной с вакцинной ДНК. Для повышения эффективности трансляции используют такой прием, как оптимизация кодонов, то есть изменение нуклеотидной последовательности без изменения аминокислотной последовательности кодируемого белка. Дело в том, что кодоны, используемые патогенами, часто отличаются от кодонов хозяина (человека), поэтому обычно требуется их оптимизация — для достижения наиболее эффективного синтеза целевого антигена в клетках организма.

В исследованиях на мышинных моделях показано, что оптимизация состава кодонов целевого гена обычно приводит к усилению ответов Т-клеток CD8<sup>+</sup> и росту титров нейтрализующих антител [23, 24]. Однако это не всегда так. Dobaño C. с соавт. [25] обнаружили, что *in vitro* экспрессия кодонооптимизированного гена, кодирующего белок циркумспорозит (CSP) малярийного паразита *Plasmodium yoelii* грызунов, была ниже, чем неоптимизированного, и усиления гуморального ответа при ДНК-иммунизации не было. A Varaldo P. и др. [26] сообщали, что оптимизация кодонов, приводящая к увеличению синтеза антигена, не влияла на уровень иммунного ответа. Это может быть связано с тем, что возникшее при оптимизации кодонов чрезвычайно высокое или низкое содержание GC-пар приводит к изменениям вторичной структуры мРНК, что приводит к замедлению трансляции и снижению продукции белка. Однако высокая скорость трансляции не всегда полезна, так как для правильного и эффективного фолдинга некоторых белков требуется низкая скорость трансляции [27]. Именно поэтому оптимизацию кодонов в открытой рамке считывания необходимо контролировать для обеспечения оптимальной скорости и высокой точности трансляции [28].

В состав плазмидной ДНК также можно вводить модификации, приводящие к стимуляции иммунного ответа. Например, часто используют стратегию ввода CpG-мотивов в ДНК-конструкции. Известно, что эти мотивы у бактерий и ДНК-вирусов неметилированы. В организме человека и высших приматов, наоборот, цитозин в составе большинства CpG-динуклеотидов содержит метильную группу. В связи с этим не-



**Рис. 1.** Схематическое изображение плазмидной ДНК-вакцины.

метилованные СрG-мотивы воспринимаются человеческим организмом как патогенассоциированные молекулярные паттерны. Наличие СрG-мотивов считается своего рода эволюционной адаптацией для усиления врожденного иммунитета на бактериальную инфекцию. Присутствие СрG-мотивов в составе ДНК-вакцины приводит к усилению как пролиферации В-клеток, так и экспрессии костимулирующих молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II, однако эти мотивы не являются антигенспецифичными [29].

При дизайне ДНК-вакцины важно избавиться от сайтов рестрикции в последовательности антигена и от *cis*-факторов, влияющих на процесс синтеза белка, — таких как Rho-независимые терминаторы транскрипции. В идеале плазмидная ДНК в качестве вакцинной конструкции — это молекула, устойчивая к разрывам, перегруппировкам, денатурации во время ферментации, экстракции и последующей очистки. Необычные последовательности ДНК, такие как участки гомопурин-гомопиримидиновых трактов в сверхспиральной ДНК, инвертированные или прямые повторы, могут приводить к структурной нестабильности плазмиды. Палиндромные последовательности также относятся к факторам нестабильности и могут приводить к уменьшению числа копий плазмидной ДНК в клетке. АТ-богатые участки и крестообразные структуры увеличивают частоту разрывов в плазмиде, тогда как Chi-сайты опосредуют мультимеризацию плазмидной ДНК [30].

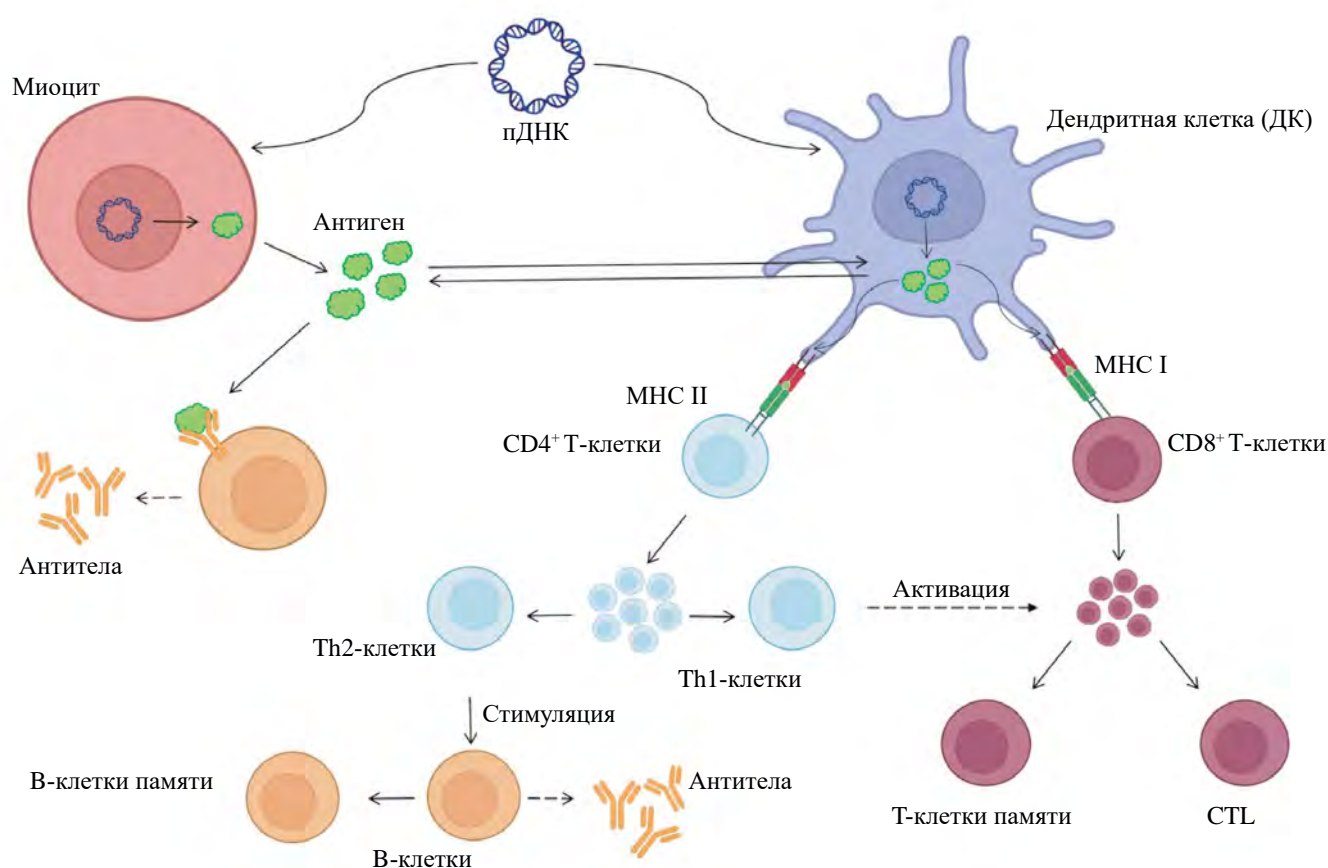
Помимо процессов, связанных с синтезом антигена, на иммунный ответ может влиять локализация и накопление белка в клетке. Для регулирования этого процесса в антигенкодирующий участок плазмидной ДНК вводят последовательность, кодирующую сигнальный пептид, обычно на N-конце белка, что определяет его локализацию в клетке или секрецию во внеклеточное пространство. Сигнальные пептиды, как правило, имеют следующую структуру: короткий положительно заряженный N-концевой участок (n-участок); центральная гидрофобная область (h-область) и более полярная C-концевая область (c-область), содержащая сайт, который расщепляется специальным ферментом — сигнальной пептидазой, после того как сигнальный пептид выполнит свою функцию [31–34]. Часто для усиления иммуногенности ДНК-вакцин, кодирующих Т-клеточные иммуногены, в качестве сигнальных пептидов используется N-концевой убиквитин или C-концевой тирозиновый

мотив LAMP-1. Последовательность, содержащая N-концевой убиквитин, обеспечивает нацеливание иммуногена в протеасому для его процессинга и презентации высвободившихся пептидов по пути МНС I класса  $CD8^+$  Т-лимфоцитам. Последовательность, содержащая C-концевой тирозиновый мотив LAMP-1, обеспечивает нацеливание иммуногена в лизосому для его процессинга и презентации высвободившихся пептидов по пути МНС II класса  $CD4^+$  Т-лимфоцитам [35].

Итак, после попадания ДНК-вакцины в клетку происходит синтез целевого иммуногена, который затем может либо оставаться в клетке и расщепляться на более короткие фрагменты (например, в протеасоме), либо секретироваться из клетки (рис. 2). При локализации белка-иммуногена внутри клетки преимущественно активируется клеточный иммунный ответ. В активации клеточного иммунного ответа, то есть в распознавании антигена Т-клетками, участвуют молекулы МНС. Молекулы МНС класса I связывают пептиды размером 8–10 а.о., образующиеся при деградации внутриклеточных белков. Молекулы же МНС класса II связывают пептиды размером ~15 а.о. внутри- и внеклеточного происхождения. Компоненты МНС класса I связываются с пептидами в просвете эндоплазматического ретикулума. Далее образующийся комплекс МНС I–пептид транспортируется к клеточной мембране, презентуется на поверхности клетки и распознается  $CD8^+$  Т-клетками [36]. МНС класса II в составе везикулы сливается с лизосомой, которая несет короткие пептидные фрагменты целевого белка. Затем образующийся комплекс МНС II–пептид также транспортируется к клеточной мембране, презентуется на поверхности клетки и распознается  $CD4^+$  Т-клетками, которые важны для индукции специфических  $CD8^+$  Т-клеточных и гуморальных ответов.

В случае, когда целевой белок секретируется из клетки, он может либо связываться с рецепторами В-клеток и активировать гуморальный иммунный ответ, либо напрямую связываться с молекулами МНС класса II, расположенными на поверхности клеток, и запускать Т-клеточное звено иммунного ответа [31, 37]. Таким образом, с помощью сигнальных пептидов можно регулировать локализацию целевого иммуногена и влиять на активацию того или иного звена иммунитета.

Следующий элемент ДНК-вакцины — сигнал полиаденилирования, поли(А), который необходим для правильной термминации транскрипции,



**Рис. 2.** Схема активации гуморального и клеточного иммунитета в ответ на введение ДНК-вакцины. Обозначения: пДНК — плазмидная ДНК (здесь и далее на рисунках); CTL (cytotoxic T cells) — цитотоксические Т-лимфоциты.

стабилизации транскриптов мРНК и экспорта мРНК из ядра [19]. Сигнал полиаденилирования представляет собой гексамер, чаще всего AAUAAA, расположенный за 20–30 нуклеотидов до 3'-конца мРНК. Консенсусную последовательность гексамера можно представить как NNUANA, ее варианты: AAUAAA, A(U/G)UAAA и UAUAAA — присутствуют в 79 % мРНК [38]. Последовательность полиаденилирования, используемая в ДНК-вакцине, может оказывать существенное влияние на экспрессию антигена. Например, продемонстрировано, что поли(А) мРНК SV40 менее эффективна, чем β-глобина кролика и гормона роста крупного рогатого скота (bovine growth hormone, BGH), а при введении второго энхансера SV40, после поли(А) SV40, экспрессия целевого гена усиливалась до уровня, сравнимого с другими сигналами [39]. Таким образом, энхансерные последовательности, встроенные не только в районе промотора, но и в область сигнала полиаденилирования могут

положительно влиять на экспрессию антигена и, как следствие, на стимуляцию иммунного ответа.

Если стоит задача экспрессировать несколько генов (например, при разработке мультивалентных ДНК-вакцин или экспрессии генетического адьюванта в сочетании с трансгеном), то можно использовать следующие стратегии. Первая заключается в использовании разных кассет экспрессии с отдельными промоторами для каждого гена (независимая экспрессия нескольких трансгенов). Вторая — в использовании бицистронных/мультицистронных векторов с одним промотором для экспрессии нескольких генов, которые разделены элементами внутреннего сайта посадки рибосомы (IRES). Третья стратегия заключается в использовании сайтов гидролиза в целевом белке, последовательность которых в плазмидной ДНК располагается между генами вместо сайтов посадки рибосомы. Впоследствии сайты распознаются и расщепляются эндогенной протеазой [4].

Помимо тех элементов, о которых было сказано выше, плазмидная ДНК еще, как правило, несет ген устойчивости к антибиотику, который играет роль селективного маркера. Также он облегчает наработку плазмид в бактериальных культурах [19]. Однако чаще всего наличие генов устойчивости к антибиотикам, а также регуляторных областей, работающих в бактериальных клетках, становится проблемой при использовании плазмидных ДНК в качестве вакцинных конструкций [40, 41].

В последнее время появились системы, позволяющие не использовать устойчивость к антибиотикам [42]. Это довольно привлекательная стратегия селективного отбора бактериальных клонов, так как проблема антибиотикорезистентности с каждым годом становится все острее. Полное отсутствие генов устойчивости к антибиотикам – единственный способ гарантировать нераспространение в окружающей среде антибиотикорезистентных микроорганизмов. Различные типы таких систем классифицированы по механизму действия, а именно: системы, основанные на “постсегрегационном убийстве” (post-segregational killing, PSK), РНК-интерференции, хромосомной интеграции и других процессах. Суть всех этих механизмов похожа: в случае захвата плазмидной ДНК бактериальная клетка размножается, в противном случае – нет. Более подробно с процессами селекции без антибиотика можно ознакомиться в работах [43, 44].

На уровень иммуногенности ДНК-вакцины также можно влиять с помощью адъювантов. Это могут быть давно известные своими иммуностимулирующими свойствами соли алюминия [45], но чаще используют цитокины и сигнальные молекулы. Особенность адъювантов, применяемых для ДНК-вакцин, заключается в том, что они могут быть доставлены непосредственно в составе вакцины либо на отдельной экспрессионной плазмидной ДНК. Молекулы адъюванта экспрессируются либо с полноразмерных генов цитокинов или сигнальных молекул, либо с их фрагментов. В результате провоспалительные цитокины синтезируются в области введения иммуногена. Кроме того, в качестве адъювантов могут быть использованы компоненты системы комплемента, домены агрегации белков, хемокины или костимулирующие молекулы [46].

Таким образом, приступая к разработке препарата ДНК-вакцины, необходимо учитывать все перечисленные факторы, влияющие на ее иммунологическую эффективность. Но в любом случае эффективность каждой генно-инженер-

ной конструкции как вакцины можно оценить только экспериментально.

## ТИПЫ ДНК-ВАКЦИН

### *Плазмидные ДНК-вакцины*

В настоящее время, несмотря на появление новых методик получения вакцинных ДНК-конструкций, плазмидные ДНК-вакцины все еще занимают лидирующие позиции. Один из успешных примеров – одобренная для использования на людях вакцина ZyCoV-D, созданная компанией “Cadila Healthcare Limited” (Индия) и направленная на борьбу с COVID-19. В плазмидной ДНК-вакцине ZyCoV-D содержится ген, кодирующий полноразмерный кодон-оптимизированный гликопротеин белка шипа (S) SARS-CoV-2 с сигнальной последовательностью IgE. Эффективность конструкции была продемонстрирована на трех видах животных: мышах, морских свинках и кроликах [47], – после чего прошла все три фазы клинических испытаний [6, 48]. Используемый в вакцине вектор pVAX1 представляет собой плазмиду размером 3 т.п.н., которая сконструирована путем модификации вектора pcDNA<sup>TM</sup>3.1 и содержит следующие элементы: ранний CMV-промотор для высокого уровня экспрессии антигена в широком спектре клеток млекопитающих, сигнал полиаденилирования BGH для эффективной терминации транскрипции и полиаденилирования mРНК, ген устойчивости к канамицину для селекции в *Escherichia coli* и уникальные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции для клонирования генов в составе вектора (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V26020?SID=srch-srp-V26020>).

Помимо рассмотренного примера, в настоящее время активно исследуют более 80 вариантов ДНК-вакцин на основе плазмидной ДНК. Основные преимущества плазмидных ДНК-вакцин заключаются в способности активировать как гуморальное, так и клеточное звено иммунитета, быстрота и масштабируемость производства; однако, как отмечено выше, плазмидные ДНК-вакцины несут ген устойчивости к антибиотику, что может быть ограничением для массового применения из-за возможной передачи гена антибиотикорезистентности микрофлоре человека.

Разработаны и новые перспективные платформы для быстрого получения ДНК-вакцин: миникольцевая ДНК, MIDGE ДНК и Doggybone<sup>TM</sup> ДНК. Эти технологии обладают



рядом преимуществ по сравнению с плазмидными ДНК, основные из которых следующие: целевой продукт содержит только интересные последовательности и не несет бактериальных элементов, гена устойчивости к антибиотикам и остатков бактериальной культуры [49, 50].

### Миникольцевая ДНК-вакцина

Миникольцевая ДНК-вакцина (мкДНК) представляет собой кольцевую молекулу ДНК, которая разработана с учетом несовершенств плазмидной ДНК. В мкДНК отсутствуют бактериальные последовательности, а именно ген устойчивости к антибиотику и бактериальный ориджин репликации; содержатся только эукариотический промотор и целевой ген. Синтез мкДНК начинается с плазмидной ДНК, называемой родительской плазмидой (РП), которая содержит специфические последовательности — сайты рекомбинации, такие как att, loxP, MRS или attP/attB. РП может быть трансформирована в мкДНК и миниплазмиду с помощью сайт-специфических рекомбиназ, таких как Phage  $\lambda$  integrase, Phage P1 Cre recombinase, ParA resolvase, PhiC31 integrase/I-SceI [51]. Заметим, что миниплазида, полученная в результате процесса рекомбинации, содержит последовательность, узнаваемую эндонуклеазой рестрикции, что впоследствии приводит к деградации миниплазмиды (рис. 3).

Наиболее популярна система с использованием интегразы бактериофага phiC31 совместно с эндонуклеазой рестрикции I-SceI. Сериновая рекомбиназа C31 опосредует однонаправленную рекомбинацию между сайтами связывания attP/attB, в то время как эндонуклеаза I-SceI расщепляет молекулы миниплазмиды и РП, не подвергшейся рекомбинации. Гены обоих ферментов должны быть закодированы в геноме бактерии, которая используется для наработки мкДНК; как правило, это *E. coli* [52, 53].

Учитывая, что мкДНК намного меньше плазмидной ДНК и поэтому может проникать в ядро гораздо эффективнее, логично предполагать, что это приведет и к более высокому уровню экспрессии. Кроме того, удаление всех бактериальных последовательностей из плазмидного вектора, включая любые гены устойчивости к антибиотикам, обеспечивает безопасность мкДНК. Сообщалось о том, что мкДНК обеспечивает пролонгированную экспрессию трансгена *in vivo* [54], а также повышенную стабильность в сыворотке [55].



Рис. 3. Технология получения миникольцевой ДНК.

Использование этого типа конструкций в качестве терапевтического агента оказалось намного эффективнее в сравнении с плазмидной ДНК [52, 56–59]. Так, например, при введении мкДНК мышам регистрировали высокий уровень экспрессии человеческого фактора свертывания крови IX (FIX) в течение 7 недель: резкий подъем на второй день после введения мкДНК с плавным снижением в последующие 3 недели [40].

В связи с тем что молекулы мкДНК синтезируются *in vivo* в *E. coli* — путем индукции внутримолекулярной рекомбинации РП, — встает вопрос их очистки от других ДНК, в частности от остаточной нерекombинированной РП с соответствующими топоизомерами. И экспериментально решить его непросто. Дело в том, что мкДНК и все варианты оставшейся РП обладают схожими физико-химическими свойствами. Кроме того, размеры мкДНК и миниплазмид обычно сходны. Эффективность процесса рекомбинации особенно важна в этом контексте, так как 100 %-ная рекомбинация РП предотвращает контаминацию мкДНК [60].

### MIDGE ДНК

MIDGE ДНК (аббревиатура от Minimalistic Immunogenically Defined Gene Expression) представляет собой линейную двухцепочечную ДНК, состоящую из промотора, целевого гена и РНК-стабилизирующих последовательностей, которые в свою очередь окружены двумя короткими олигонуклеотидными последовательностями в виде шпилек, образующих ковалентно замкнутую молекулу в форме гантели. Такой подход к конструированию ДНК-вакцин позволяет свести некодирующую часть целевого гена к минимуму [61–63] (рис. 4). Технология получения таких конструкций состоит из нескольких этапов: 1) наработка плазмидной ДНК, содержащей в своем составе экспрессионную кассету, фланкированную сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции; 2) обработка плазмидной ДНК эн-

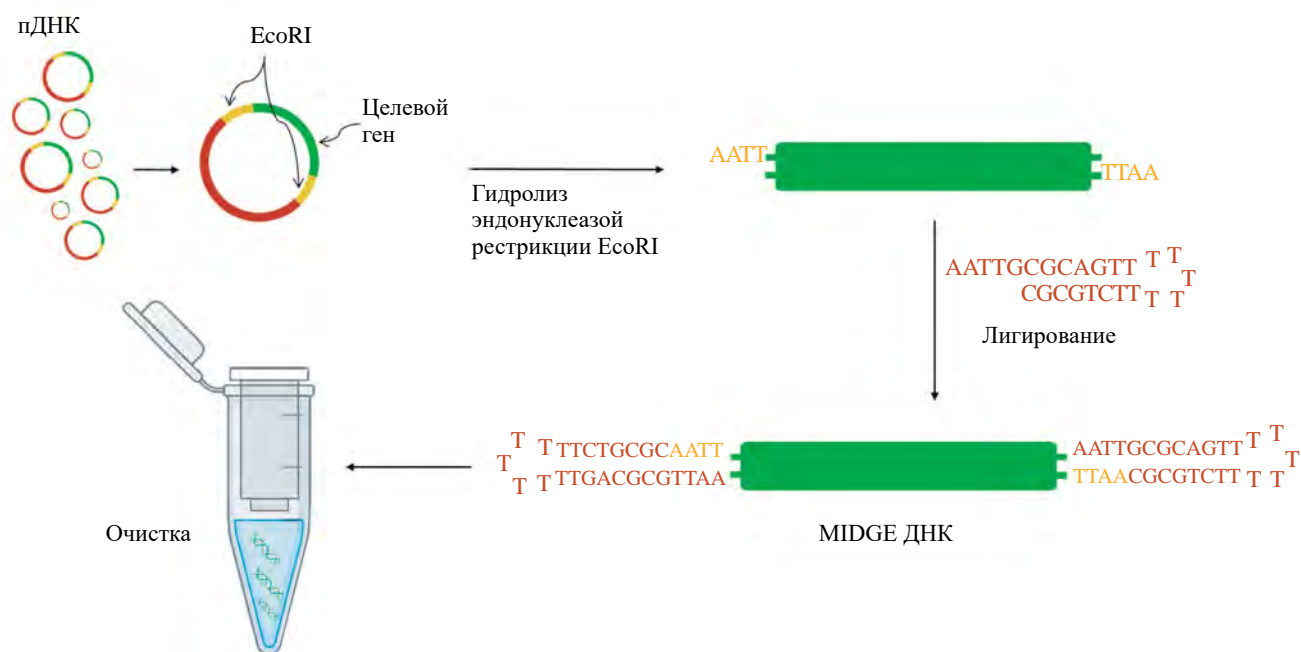


Рис. 4. Технология получения MIDGE ДНК.

донуклеазой рестрикции с образованием одноцепочечных липких концов; 3) лигирование липких концов экспрессионной кассеты с заранее синтезированными олигонуклеотидами, формирующими шпильчатую структуру; 4) очистка линейной ДНК от побочных продуктов [62].

Среди преимуществ MIDGE ДНК-конструкций можно выделить их маленький размер и линейность молекулы ДНК, что позволяет избежать свертывания и дает конформационно однородный конечный продукт. Кроме того, концы векторов MIDGE доступны для химических модификаций, что дает возможность связывать пептиды, белки, сахара или другие молекулы ДНК [63]. Эта технология позволяет получать целевой продукт полностью *in vitro*, что значительно облегчает процесс очистки [49, 50]. Векторы MIDGE успешно применяли в нескольких исследованиях в качестве экспериментальных ДНК-вакцин. Вот некоторые примеры таких исследований: а) использование ДНК-конструкции, кодирующей гликопротеин gp140 вируса иммунодефицита кошек (FIV) [64]; б) использование векторов MIDGE, кодирующих гликопротеин D герпесвируса-1 крупного рогатого скота [65]; в) исследование векторов MIDGE, содержащих ген поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) [61]. В этих работах показано, что использование таких ДНК-конструкций приводит к расширенной и стабильной экспрессии целевого гена. Однако основным ограничением

технологии может быть быстрое выведение целевой MIDGE ДНК. Так, Nele Galling с соавт. [66] показали, что через 6 ч после введения MIDGE-CMVhTNF наблюдалось быстрое снижение ее содержания в опухолевой ткани.

### *Doggybone<sup>TM</sup> ДНК*

Doggybone<sup>TM</sup> ДНК (dbDNA<sup>TM</sup>) — еще одна технология получения минималистичных ДНК-конструкций, разработанная британской биотехнологической компанией “Touchlight”. Эта технология заключается в ферментативной амплификации плазмидной ДНК, содержащей экспрессионную кассету, фланкированную повторами *telRL*, *in vitro* с использованием двух ферментов: высокопроцессивной ДНК-полимеразы (как правило, Phi29), осуществляющей амплификацию ДНК-матрицы в конкатамеры по типу катящегося кольца, и протеломеразы (TelN из бактериофага N15), которая при узнавании специфических сайтов *telRL* катализирует реакцию расщепления в месте соединения конкатамеров. В результате получают линейные молекулы с ковалентно замкнутыми концами (рис. 5). Полученная ДНК полностью функциональна, стабильна и содержит только необходимые последовательности, включая целевой антиген, промотор и сигнал полиаденилирования; бактериальные же последовательности полностью отсутствуют [4, 67]. В качестве матрицы



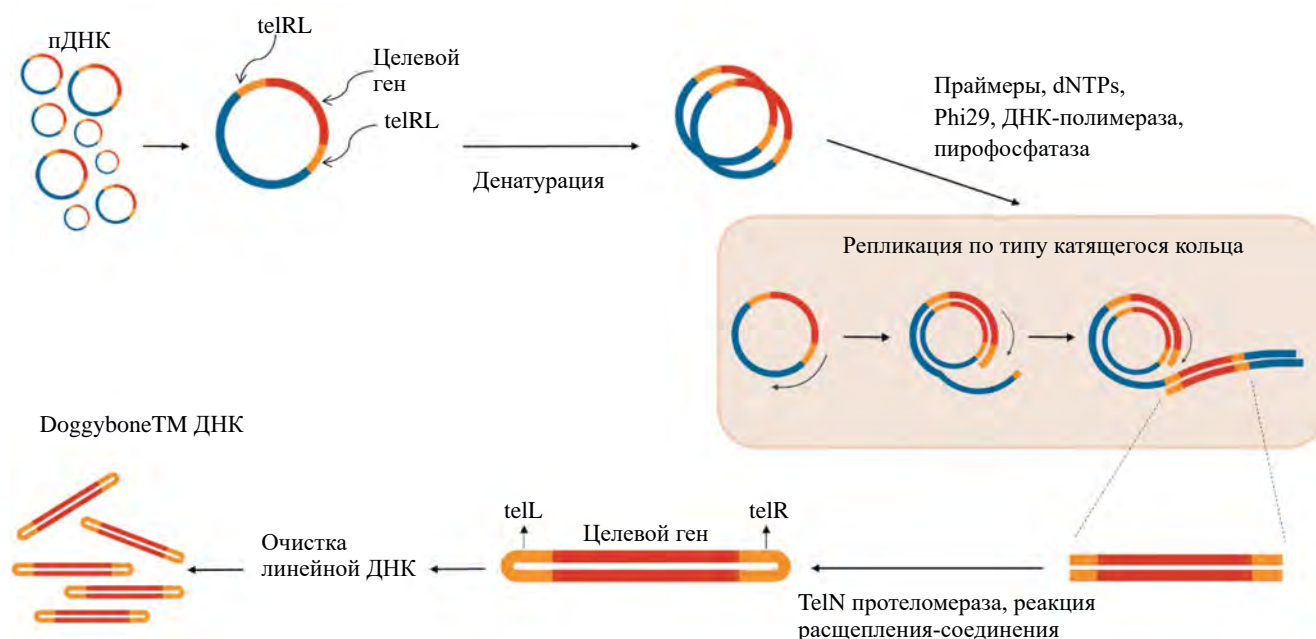


Рис. 5. Технология получения Doggybone™ ДНК.

для ферментативного синтеза dbDNA™ могут выступать плазмидные ДНК, которые содержат нуклеотидные последовательности антигена, промотора, сигнала полиаденилирования и других регуляторных областей, фланкированные последовательностями telRL. Фермент протеломераза узнает палиндромные последовательности telRL и катализирует реакции расщепления-соединения. За счет работы протеломеразы TelN конструкции dbDNA™ имеют необычный вид линейной, замкнутой молекулы ДНК, напоминающей “собачью кость” [4]. Так же, как и MIDGE ДНК, эта технология позволяет получать целевой продукт полностью *in vitro*, что значительно облегчает процесс очистки [49, 50].

В экспериментах на лабораторных животных продемонстрирована эффективность конструкции Doggybone™ ДНК против таких патогенов, как вирусы гриппа, иммунодефицита человека и папилломы человека [68–70]. Так, Scott V. с соавт. [68] показали, что использование dbDNA™ конструкций активирует как гуморальный, так и клеточный иммунитет против вируса гриппа, сравнимый с ответами на плазмидную ДНК. А Mucker E. и др. [71] сравнили у сирийских хомяков иммунный ответ, индуцированный введением конструкции dbDNA™ и плазмидной ДНК, которые кодировали S-белок SARS-CoV-2, и не обнаружили статистически значимых различий в их иммуногенности, из чего сделали вывод о сопоставимой эффективности этих подходов.

## СПОСОБЫ ДОСТАВКИ ДНК-ВАКЦИН

Один из факторов, играющих ключевую роль в эффективности ДНК-вакцин, — надежность и безопасность способа доставки, обеспечивающего высокий уровень проникновения нуклеиновых кислот в клетки-мишени. Как правило, системы доставки нуклеиновых кислот подразделяют на вирусные и невирусные (рис. 6). Невирусные способы доставки, в свою очередь, подразделяют на физические и химические.

В этом обзоре мы не акцентируем внимание на вирусных системах доставки, которые хорошо изучены и подробно описаны [72–75].

### Химические способы доставки ДНК-вакцин

Химические методы доставки основаны на способности отрицательно заряженных молекул нуклеиновой кислоты связываться с положительно заряженными молекулами, используемыми в качестве средства доставки. Это позволяет создавать компактные и прочные структуры (наночастицы), которые могут преодолевать тканевые и клеточные барьеры для успешной доставки нуклеиновой кислоты в клетку. Наночастицы обеспечивают защиту нуклеиновых кислот от деградации в условиях окружающей среды во время транспортировки к клеткам-мишеням. По сравнению с вирусными векторами наночастицы обеспечивают более высокий уро-

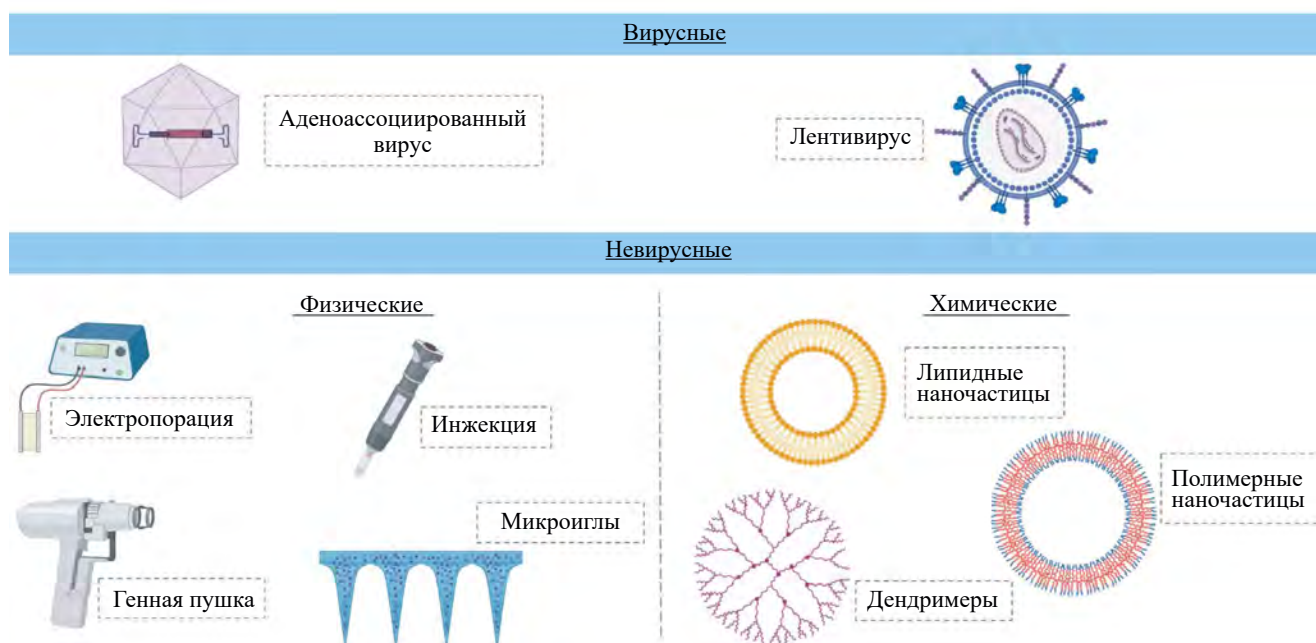
Системы доставки ДНК-вакцин

Рис. 6. Способы доставки ДНК-вакцин.

вень безопасности; их размер находится в диапазоне 10–500 нм, что позволяет им проникать в клетки. Варьируя состав наночастиц, можно изменять их биосовместимость и биоразлагаемость. Системы доставки с использованием наночастиц имеют преимущества с точки зрения дизайна и получения, поскольку, по сравнению с вирусными векторами, их легче разрабатывать и модифицировать [76].

*Липидные наночастицы*

Самый распространенный и охарактеризованный химический способ доставки мРНК- и ДНК-вакцин основан на использовании липосом [76, 77]. Технология получения липосом была использована компаниями “Pfizer” (США) и “Moderna Inc.” (США) для упаковки мРНК-вакцин против COVID-19, которые были одобрены к применению у людей [78]. Липосомы представляют собой катионные наночастицы, состоящие из холестерина, фосфолипидов и других липидов, которые в определенном соотношении способны связывать и инкапсулировать нуклеиновую кислоту, обеспечивая эффективную защиту и транспортировку мРНК или ДНК в клетки [79–81]. Высокая эффективность трансфекции липосом и систем доставки на основе липидов обычно объясняют их совместимостью с липидными бислоями, образующими

клеточную мембрану, что облегчает проникновение в клетку [82].

На протяжении долгих лет идут исследования по улучшению состава липидов. Одна из таких разработок названа “ниосомой”. Эта липосома состоит из холестерина или холестеринподобных молекул и неионогенных поверхностно-активных веществ, которые образуют высокостабильные двухслойные везикулы, защищенные от окисления [83, 84]. Было показано, что стабильность ниосом повышается при присоединении линейных полимеров маннозы к поверхности частиц, что одновременно делает возможной адресную доставку к антигенпрезентирующим клеткам [85]. Продemonстрирована возможность использования ниосом в качестве носителей ДНК-вакцины против гепатита В для местного эпидермального введения [86]. Кроме того, показано, что введение ниосом в организм с помощью полых микроигл для эпидермальной вакцинации вызывало гуморальный и клеточный иммунные ответы на антиген, закодированный в ДНК-вакцине [87].

Несмотря на высокую популярность, липосомы имеют ряд недостатков, среди которых высокая стоимость, необходимость соблюдения холодовой цепи для хранения готового продукта, быстрое выведение из организма и индукция иммуностимулирующих реакций [88].

### *Полимерные наночастицы*

Полимерные наночастицы также широко используют для доставки ДНК— и мРНК-вакцин благодаря их универсальности, безопасности, а также способности усиливать иммунный ответ [89]. Однако в сравнении с липидами они имеют ряд дополнительных ограничений и, прежде всего, это затрудненное биоразложение полимеров, связанное с их большой молекулярной массой. Скорость высвобождения нуклеиновой кислоты из полимерных наночастиц можно контролировать дизайном их химической структуры — таким образом, чтобы поведение частицы регулировалось составом окружающей среды. Например, pH-стимулируемая система контроля включает структуру, которая обеспечивает проникновение за счет диссоциации различных поверхностных лигандов при изменении pH. Благодаря возможности модификации и изменения химических и биологических свойств полимерные наночастицы находят широкое применение в различных областях [90]. Кратко рассмотрим некоторые из них.

Хитозан — широко распространенный полисахарид, который представляет собой биосовместимый, биоразлагаемый, практически нетоксичный полимер, подходящий для биомедицинских применений [91–93]. Хитозан подходит для доставки ДНК-вакцин благодаря своей катионной природе, позволяющей электростатически связываться с анионной структурой ДНК. В результате образуются комплексы полимер–ДНК, которые обеспечивают защиту ДНК от деградации ферментами. Хитозан также инертное и гипоаллергенное соединение, с благоприятными мукоадгезивными свойствами, облегчающими вакцинацию через слизистые оболочки [76, 92, 93].

Несмотря на уникальные физико-химические и биологические свойства, хитозан пока не нашел широкого применения в клинике из-за его низкой растворимости [38, 39]. Однако для решения этих проблем уже разработаны различные методы его модификации [40, 41]. Свободные amino- и гидроксильные группы были использованы для создания широкого спектра производных хитозана с улучшенной растворимостью, основанной на его высоком сродстве с функциональными белками и способности к самосборке [43, 94, 95].

Исследования наночастиц на основе хитозана шли на протяжении многих лет и привели к многочисленным разработкам, включая потенциальную терапевтическую ДНК-вакцину

против папилломовирусной инфекции человека, а также ДНК-вакцины против вирусного миокардита и других заболеваний млекопитающих [76].

Полиэтиленимин (PEI) считается универсальным материалом со свойствами, зависящими от молекулярной массы и степени разветвления [96]. PEI с высокой молекулярной массой обычно имеет разветвленную структуру, что приводит к более высокой эффективности трансфекции, но и к более высокой цитотоксичности. И наоборот, PEI с низкой молекулярной массой, особенно с линейной структурой, обладает меньшим поверхностным зарядом, что снижает его клеточную токсичность. Однако из-за неспособности образовывать стабильные структуры с ДНК и защищать ее от воздействия ферментов и агрессивных биологических сред низкомолекулярный PEI характеризуется низкой эффективностью трансфекции. Для повышения эффективности трансфекции и минимизации токсичности применяют различные модификации, такие как конъюгация разветвленных PEI с высокой молекулярной массой с полисахаридами, гидрофильными полимерами, дисульфидными мостиками и липидными остатками [97]. Так, Torrieri-Dramard L. и др. [98] продемонстрировали, что иммунизация мышей ДНК, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа А (H5N1) и инкапсулированной в PEI, генерирует высокие уровни специфических IgA-антител.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) — одобренный FDA полимер, обычно используемый для присоединения к поверхности наночастиц [99]. Основная функция ПЭГ заключается в защите поверхностного заряда наночастиц и обеспечении стерической стабилизации, что приводит к снижению цитотоксичности, связанной с зарядом, предотвращению неспецифических взаимодействий с белками сыворотки, а также делает их неуловимыми для фагоцитов. Присоединение ПЭГ приводит к увеличению времени системной циркуляции наночастиц, повышению стабильности в кровотоке и снижению иммуногенности системы доставки, хотя есть и уже доказанный недостаток — пониженная эффективность трансфекции [100]. Liu Y. с соавт. [101] показали, что покрытие ПЭГ улучшает биораспределение, экспрессию экзогенного белка и повышает иммунный ответ, вызванный ДНК-вакциной. Внутримышечное введение ДНК-вакцины приводило к повышению уровня овальбуминспецифических антител и эпителиотоксической активности Т-клеток *in vivo*.

На основании этих результатов авторы сделали заключение о высокой эффективности доставки ПЭГилированной ДНК-вакцины.

Дендримеры представляют собой сверхразветвленные макромолекулы с древообразной структурой с симметричными ответвлениями. Они характеризуются высокой степенью молекулярной однородности, регулируемым размером, функциональными поверхностными группами, контролируемыми физико-химическими свойствами и высокой растворимостью в воде. Благодаря уникальным свойствам дендримеры нашли широкое применение в медицине [102]. Наносистемы на основе дендримеров для доставки лекарств обычно основаны на полиамидоаминовых дендримерах (РАМАМ) или производных полипропиленимина, которые можно модифицировать в зависимости от химической природы лекарственного средства, которое необходимо транспортировать. Более того, дендримеры можно использовать в качестве конъюгатов, доставляющих одновременно несколько веществ [103, 104]. Karpenko L. и др. [105] продемонстрировали эффективность дендримеров в качестве систем доставки нуклеиновых кислот. Однако дендримеры имеют и недостатки, ограничивающие возможность их широкого применения на данный момент. Например, это высокая токсичность, связанная с их низкой биоразлагаемостью из-за разветвленной структуры [106].

Декстран относится к одной из самых интересных нетоксичных, биосовместимых макромолекул для доставки фармацевтических и медицинских препаратов. Это разветвленный полимер глюкозы, который можно модифицировать различными функциональными группами для улучшения его свойств. Соединения на основе декстрана естественным образом биоразлагаемы и могут служить биологически активными носителями для многих биомолекул [107, 108]. В последние годы разработаны многочисленные варианты систем доставки на основе декстрана с индивидуальными свойствами и геометрией, такие как самособирающиеся мицеллы и наночастицы, наноэмульсии, магнитные наночастицы, микрочастицы и гидрогели [109]. В частности, в ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” разработан конъюгат декстрана (полиглюкина) и полиамина (спермидина), названный полиглюкин-спермидин (PGS), для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*. В результате проведенных исследований показано, что этот конъюгат можно рассматривать в качестве перспективного и безопасного средства доставки вакцин на основе нуклеиновых кислот. Кроме того, нуклеиновую

кислоту в оболочке конъюгата PGS можно лиофилизировать, что дает возможность хранить ДНК-вакцины, инкапсулированные в PGS, при температуре 4°C без потери специфической активности [110–112].

#### *Проникающие в клетки пептиды*

Проникающие в клетки пептиды (cell-penetrating peptides, CPP) представляют собой класс разнообразных пептидов, обычно положительно заряженных, длиной менее 30 а.о. Они обладают уникальной способностью проникать через клеточные мембраны без взаимодействия со специфическими рецепторами. В последние десятилетия CPP стали достаточно часто используемым инструментом для доставки нуклеиновых кислот во внутриклеточное пространство благодаря их высокой эффективности, а также низкой токсичности [113].

Хотя точные механизмы интернализации CPP не до конца изучены, были предложены два основных механизма: эндоцитоз и прямая транслокация (или неэндоцитарная транслокация). К эндоцитозу, который считается основным механизмом проникновения CPP, относят макропиноцитоз, клатринопосредованный и опосредованный кавеолами/липидными рафтами эндоцитоз [113]. Также предполагается, что CPP могут способствовать кластеризации отрицательно заряженных гликозаминогликанов на поверхности клетки, которые, в свою очередь, запускают макропиноцитоз и латеральную диффузию или напрямую разрушают липидный бислой. Сообщалось, что CPP с богатыми аргинином повторами можно использовать как систему доставки мРНК в дендритные клетки [114].

В настоящее время ведутся исследования и других химических систем доставки, помимо вышеуказанных. Например, таких как неорганические наночастицы, с которыми можно ознакомиться в обзорах [76, 101].

#### *Физические способы доставки ДНК-вакцин*

Наряду с химическими методами доставки активно разрабатываются и физические, которые могут облегчить доставку ДНК в клетки и обеспечить повышение ее иммуногенности. Одна из таких технологий — *электропорация* (ЭП). ЭП заключается в применении электрического импульса, который индуцирует образование временных пор в клеточных мембранах и тем самым облегчает поглощение ДНК клетками *in situ*. В основных исследованиях по этой

теме [115, 116] показано, что эффективность поглощения и экспрессии ДНК зависит от таких параметров, как напряжение, длительность, число и частота импульсов.

Помимо использования электрических импульсов, можно вводить лекарственные препараты, в том числе ДНК-вакцины, с помощью безыгольного струйного инжектора. *Струйная инъекция* позволяет вводить терапевтические препараты и вакцины с помощью высокоскоростной струи под высоким давлением и доставлять препарат во внутрикожную, внутримышечную или подкожную ткань без использования иглы [117–120]. Введенный таким способом препарат ДНК-вакцины индуцирует у человека более высокий уровень клеточного иммунного ответа и продукции антител по сравнению с введением вакцины иглой [4, 106]. Повышение эффективности ДНК-вакцинации в этом случае, скорее всего, связано с тем, что доставка с использованием инжектора может увеличить поглощение ДНК тканями кожи и мышц по сравнению с обычной доставкой *in vivo* [121]. В последние годы струйная инъекция в качестве средства доставки вакцин на основе нуклеиновых кислот набирает все большую популярность. Так, Dey A. и др. [47] для введения вакцины ZyCoV-D против COVID-19 использовали струйный инжектор PharmaJet® Tropis® (“PharmaJet”, США). Houser K. с соавт. [122] использовали струйный инжектор Stratis (“PharmaJet”) для доставки ДНК-вакцины против гриппа. Такой же способ для доставки экспериментальной ДНК-вакцины на основе технологии Doggybone™ применили Mucker E. с соавт. [71]. Для внутриопухолевой доставки MIDGE ДНК Gallinger N. др. [66] тоже использовали метод струйной инъекции.

Еще один метод доставки ДНК-вакцин основан на использовании *генной пушки*. В данном случае, как правило, применяют наночастицы золота, покрытые ДНК, которые доставляют в ткани с помощью газа под высоким давлением. Благодаря высокой силе подачи частицы золота проникают через клеточную мембрану, что приводит к более эффективному поглощению клетками по сравнению с голой плазмидной ДНК. Этот способ доставки позволяет индуцировать такой же иммунный ответ, как при внутримышечной или интрадермальной инъекции, со значительно меньшими количествами ДНК (несколько нанограммов вместо нескольких микрограммов) [106].

Для доставки ДНК-вакцин также используют массив *микроигл*. Микроскопические иглы (от 25 до 2 000 мкм) проникают в кожу на определенную и воспроизводимую глубину с минимальными болевыми ощущениями [123]. Доставка ДНК с помощью микроигл приводит к стабильной экспрессии кодируемого антигена в коже. Этот метод основан на прорыве рогового слоя и жизнеспособного эпидермиса микроиглами, после чего ДНК может быть доставлена в дерму [106]. Было продемонстрировано, что доставка ДНК в кожу с помощью микроигл вызывала сильный клеточный иммунный ответ у мышей, который защищал их от заражения вирусом гриппа [124].

Большинство методов доставки ДНК-вакцин, как физических, так и химических, достаточно эффективны. Несмотря на это, каждый из них требует доработки, направленной на повышение результативной эффективности ДНК-вакцин и уменьшение стоимости их производства. Например, использование физических методов для доставки вакцин выгоднее по сравнению с химическими, так как реактогенность вводимого таким способом препарата гораздо ниже. Это связано с тем, что при физических способах введения используют только “голую” нуклеиновую кислоту без вспомогательных компонентов. Однако в отдельных случаях химические методы тоже имеют определенные преимущества. Так, использование хитозана в качестве “поставщика” ДНК-вакцины при интраназальном введении может приводить к формированию эффективного мукозального иммунного ответа. Каждый из приведенных в этом обзоре методов доставки требует особого внимания исследователей, так как успехи в данной области позволят сделать очередной шаг в создании и внедрении новых вакцин.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пандемия COVID-19, вызванная новым для человечества вирусом SARS-CoV-2, стремительно распространившаяся по всему миру, унося миллионы жизней, стала потрясением для глобальной системы здравоохранения. Необходимо была быстрая разработка профилактических вакцин. В результате разработано множество ДНК-вакцин против SARS-CoV-2, в том числе на основе технологии мкДНК и MIDGE, и по меньшей мере 10 из них вышли на клинические испытания [7]. ДНК-вакцина для профилактики COVID-19 ZyCoV-D, разработанная индийской компанией “Zydus Lifesciences Limited”, стала первой в мире ДНК-вакциной, одобренной для вакцинации человека [5].



Множество кандидатных профилактических вакцин против вирусных и бактериальных заболеваний человека находится на стадии клинических испытаний. Достаточно давно лицензированы и используют ДНК-вакцины для иммунизации животных, рыб и птиц. Недавно Министерством сельского хозяйства США лицензирована ДНК-вакцина против высокопатогенного вируса гриппа А (H5N1) для кур, разработанная компанией “Agrilabs” (Индонезия) [4]. Лицензия позволяет компании хранить большие объемы вакцин на случай вспышки птичьего гриппа.

Одно из важных преимуществ ДНК-вакцин — низкая стоимость и быстрота производства, минимальные требования к транспортировке и хранению, а также стабильность при повышенных температурах. Опыт применения ДНК-конструкций для вакцинации людей пока еще несравним с опытом использования вирусных вакцин, хотя благоприятный профиль безопасности на примере COVID-вакцины ZyCoV-D продемонстрирован [5]. Таким образом, ДНК-вакцины имеют ряд свойств, которые позволяют считать их перспективной вакциной платформой для профилактики и терапии инфекционных заболеваний.

Обзор выполнен в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani, A., Felgner P.L. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*. **247**, 1465–1468.
- Tang D.C., DeVit M., Johnston S.A. (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*. **356**, 152–154.
- Ulmer J.B., Donnelly J.J., Parker S.E., Rhodes G.H., Felgner P.L., Dworki V.J., Gromkowski S.H., Deck R.R., DeWitt C.M., Friedman A., Hawe L.A., Leander K.R., Martinez D., Perry H.C., Shiver J.W., Montgomery D.L., Liu M.A. (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. **259**, 1745–1749.
- Shafaati M., Saidijam M., Soleimani M., Hazrati F., Mirzaei R., Amirheidari B., Tanzadehpanah H., Karampoor S., Kazemi S., Yavari B., Mahaki H., Safaei M., Rahbarizadeh F., Samadi P., Ahmadyousefi Y. (2022) A brief review on DNA vaccines in the era of COVID-19. *Future Virol.* **17**, 49–66.
- Mallapaty S. (2021) India’s DNA COVID vaccine is a first — more are coming. *Nature*. **597**, 161–162.
- Momin T., Kansagra K., Patel H., Sharma S., Sharma B., Patel J., Mittal R., Sanmukhani J., Maithal K., Dey A., Chandra H., Rajanathan C.T., Pericherla H.P., Kumar P., Narkhede A., Parmar D. (2021) Safety and immunogenicity of a DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): results of an open-label, non-randomized phase I part of phase I/II clinical study by intradermal route in healthy subjects in India. *EClinicalMedicine*. **38**, 101020.
- Maslow J. N., Kwon I., Kudchodkar S. B., Kane D., Tadesse A., Lee H., Tadesse A., Lee H., Park Y.K., Muthumani K., Roberts C.C. (2023) DNA vaccines for epidemic preparedness: SARS-CoV-2 and beyond. *Vaccines (Basel)*. **11**, 1016.
- Baghban R., Ghasemian A., Mahmoodi S. (2023) Nucleic acid-based vaccine platforms against the coronavirus disease 19 (COVID-19). *Arch. Microbiol.* **205**, 150.
- Jahanafrooz Z., Baradaran B., Mosafer J., Hashemzaei M., Rezaei T., Mokhtarzadeh A., Hamblin M.R. (2020) Comparison of DNA and mRNA vaccines against cancer. *Drug Discov. Today*. **25**, 552–560.
- Tang J., Li M., Zhao C., Shen D., Liu L., Zhang X., Wei L. (2022) Therapeutic DNA vaccines against HPV-related malignancies: promising leads from clinical trials. *Viruses*. **14**, 239.
- Robertson J., Ackland J., Holm A. (2007) Guidelines for assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines. *WHO Tech. Rep. Ser.* **941**, 57–81. <https://www.who.int/publications/m/item/annex-1-trs941-dna-vax>
- Sheets R., Kang H.N., Meyer H., Knezevic I. (2020) WHO informal consultation on the guidelines for evaluation of the quality, safety, and efficacy of DNA vaccines, Geneva, Switzerland, December 2019. *NPJ Vaccines*. **5**, 52.
- Beasley D.W. (2020) New international guidance on quality, safety and efficacy of DNA vaccines. *NPJ Vaccines*. **5**, 53.
- Ghaffarifar F. (2018) Plasmid DNA vaccines: where are we now? *Drugs Today (Barc.)*. **54**(5), 315–333.
- Pagliari S., Dema B., Sanchez-Martinez A., Flores G.M.Z., Rollier C.S. (2023) DNA vaccines: history, molecular mechanisms and future perspectives. *J. Mol. Biol.* **453**, 168297.
- Xia W., Bringmann P., McClary J., Jones P.P., Manzana W., Zhu Y., Wang S., Liu Y., Harvey S., Madlansacay M.R., McLean K., Rosser M.P., MacRobbie J., Olsen C.L., Cobb R.R. (2006) High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein Expr. Purif.* **45**, 115–124.
- Johari Y.B., Scarrott J.M., Pohle T.H., Liu P., Mayer A., Brown A.J., James D.C. (2022) Engineering of the CMV promoter for controlled expression of recombinant genes in HEK293 cells. *Biotechnol. J.* **17**, 2200062.

18. Duan B., Cheng L., Gao Y., Yin F.X., Su G.H., Shen Q.Y., Liu K., Hu X., Liu X., Li G.P. (2012) Silencing of fat-1 transgene expression in sheep may result from hypermethylation of its driven cytomegalovirus (CMV) promoter. *Theriogenology*. **78**, 793–802.
19. Franck C.O., Fanslau L., Bistrovic Popov A., Tyagi P., Fruk L. (2021) Biopolymer-based carriers for DNA vaccine design. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **60**, 13225–13243.
20. Krinner S., Heitzer A., Asbach B., Wagner R. (2015) Interplay of promoter usage and intragenic CpG content: impact on GFP reporter gene expression. *Hum. Gene Ther.* **26**, 826–840.
21. Dean D.A., Dean B.S., Muller S., Smith L.C. (1999) Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp. Cell Res.* **253**, 713–722.
22. Li H.S., Yong L.I.U., Li D.F., Zhang R.R., Tang H.L., Zhang Y.W., Huang W., Liu Y., Peng H., Xu J., Hong K., Shao Y.M. (2007) Enhancement of DNA vaccine-induced immune responses by a 72-bp element from SV40 enhancer. *Chin. Med. J. (Engl.)*. **120**, 496–502.
23. Li L., Petrovsky N. (2016) Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Exp. Rev. Vaccines*. **15**, 313–329.
24. Sunita S.A., Singh Y., Shukla P. (2020) Computational tools for modern vaccine development. *Hum. Vaccin. Immunother.* **16**, 723–735.
25. Dobaño C., Sedegah M., Rogers W.O., Kumar S., Zheng H., Hoffman S.L., Doolan D.L. (2009) Plasmodium: mammalian codon optimization of malaria plasmid DNA vaccines enhances antibody responses but not T cell responses nor protective immunity. *Exp. Parasitol.* **122**, 112–123.
26. Varaldo P.B., Miyaji E.N., Vilar M.M., Campos A.S., Dias W.O., Armôa G.R., Tendler M., Leite L.C.C., McIntosh D. (2006) Mycobacterial codon optimization of the gene encoding the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* in recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin enhances protein expression but not protection against cercarial challenge in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **48**, 132–139.
27. Staudacher J., Rebnegger C., Dohnal T., Landes N., Mattanovich D., Gasser B. (2022) Going beyond the limit: increasing global translation activity leads to increased productivity of recombinant secreted proteins in *Pichia pastoris*. *Metab. Eng.* **70**, 181–195.
28. Seymour B.J., Singh S., Certo H.M., Sommer K., Sather B.D., Khim S., Rawlings D.J. (2021) Effective, safe, and sustained correction of murine XLA using a UCOE-BTK promoter-based lentiviral vector. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **20**, 635–651.
29. McCluskie M.J., Weeratna R.D., Davis H.L. (2000) The role of CpG in DNA vaccines. *Springer Semin. Immunopathol.* **22**, 125–132.
30. Williams J.A. (2013) Vector design for improved DNA vaccine efficacy, safety and production. *Vaccines (Basel)*. **1**, 225–249.
31. von Heijne G. (1998) Life and death of a signal peptide. *Nature*. **396**, 111–113.
32. Kovjazin R., Carmon L. (2014) The use of signal peptide domains as vaccine candidates. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 2733–2740.
33. Liaci A.M., Förster F. (2021) Take me home, protein roads: structural insights into signal peptide interactions during ER translocation. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11871.
34. Стародубова Е.С., Исагулянц М.Г., Карпов В.Л. (2010) Регуляция процессинга иммуногена: сигнальные последовательности и их использование для создания нового поколения ДНК-вакцин. *Acta Naturae*. **2**, 59–65.
35. Reguzova A., Antonets D., Karpenko L., Ilyichev A., Maksyutov R., Bazhan S. (2015) Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens. *PloS One*. **10**, e0116412.
36. Cheng M.A., Farmer E., Huang C., Lin J., Hung C.F., Wu T.C. (2018) Therapeutic DNA vaccines for human papillomavirus and associated diseases. *Hum. Gene Ther.* **29**, 971–996.
37. Ильичев А.А., Орлова Л.А., Шарабрин С.В., Карпенко Л.И. (2020) Технология мРНК как одна из перспективных платформ для разработки вакцины против SARS-CoV-2. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. **24**, 802–807.
38. Устьянцев И.Г., Голубчикова Ю.С., Бородулина О.Р., Крамеров Д.А. (2017) Каноническое и неканоническое полиаденилирование РНК. *Молекуляр. биология*. **51**, 262–273.
39. Xu Z.L., Mizuguchi H., Ishii-Watabe A., Uchida E., Mayumi T., Hayakawa T. (2001) Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*. **272**, 149–156.
40. Chen Z.Y., He C.Y., Ehrhardt A., Kay M.A. (2003) Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression *in vivo*. *Mol. Ther.* **8**, 495–500.
41. Maniar L.E.G., Maniar J.M., Chen Z.Y., Lu J., Fire A.Z., Kay M.A. (2013) Minicircle DNA vectors achieve sustained expression reflected by active chromatin and transcriptional level. *Mol. Ther.* **21**, 131–138.
42. Одонне К.-Ж., Жолivé Э. (2015) Плазмида без устойчивости к антибиотику. Патент RU548809C2, бюлл. № 11 от 20.04.2015.
43. Mignon C., Sodoier R., Werle B. (2015) Antibiotic-free selection in biotherapeutics: now and forever. *Pathogens*. **4**, 157–181.
44. Chen Z., Yao J., Zhang P., Wang P., Ni S., Liu T., Zhao Y., Tang K., Sun Y., Qian Q., Wang X. (2023) Minimized antibiotic-free plasmid vector for gene therapy utilizing a new toxin-antitoxin system. *Metab. Eng.* **79**, 86–96.
45. Khalid K., Poh C.L. (2023) The development of DNA vaccines against SARS-CoV-2. *Adv. Med. Sci.* **68**, 213–226.
46. Grunwald T., Ulbert S. (2015) Improvement of DNA vaccination by adjuvants and sophisticated delivery

- devices: vaccine-platforms for the battle against infectious diseases. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **4**, 1–10.
47. Dey A., Rajanathan T.C., Chandra H., Pericherla H.P., Kumar S., Choonia H.S., Bajpai M., Singh A., Sinha A., Saini G., Dalal P., Vandriwala S., Raheem M., Divate D., Navlani N., Sharma V., Parikh A., Prasath S., Rao M., Maithal K. (2021) Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models. *Vaccine*. **39**, 4108–4116.
  48. Khobragade A., Bhate S., Ramaiah V., Deshpande S., Giri K., Phophle H., Supe P., Godara I., Revanna R., Nagarkar R., Sanmukhani J., Dey A., Rajanathan C., Kansagra M., Koradia P. (2022) Efficacy, safety, and immunogenicity of the DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): the interim efficacy results of a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study in India. *Lancet*. **399**, 1313–1321.
  49. Ohlson J. (2020) Plasmid manufacture is the bottleneck of the genetic medicine revolution. *Drug Discov. Today*. **25**, 1891–1893.
  50. Monet L., Grandchamp N. (2020) The emergence of the next-generation vaccines. *Arch. Clin. Biomed. Res.* **4**, 325–348.
  51. Jiang Y., Gao X., Xu K., Wang J., Huang H., Shi C., Yang W., Kang Y., Curtiss R., Yang G., Wang C. (2019) A novel Cre recombinase-mediated *in vivo* minicircle DNA (CRIM) vaccine provides partial protection against Newcastle disease virus. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, e00407–19.
  52. Almeida A.M., Queiroz J.A., Sousa F., Sousa Â. (2020) Minicircle DNA: the future for DNA-based vectors? *Trends Biotechnol.* **38**, 1047–1051.
  53. Gaspar V., Melo-Diogo D.D., Costa E., Moreira A., Queiroz J., Pichon C., Correia I., Sousa F. (2015) Minicircle DNA vectors for gene therapy: advances and applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* **15**, 353–379.
  54. Munye M.M., Tagalakis A.D., Barnes J.L., Brown R.E., McAnulty R.J., Howe S.J., Hart S.L. (2016) Minicircle DNA provides enhanced and prolonged transgene expression following airway gene transfer. *Sci. Rep.* **6**, 23125.
  55. Stenler S., Blomberg P., Smith C.E. (2014) Safety and efficacy of DNA vaccines: plasmids vs. minicircles. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 1306–1308.
  56. Darquet A.M., Rangara R., Kreiss P., Schwartz B., Naimi S., Delaere P., Crouzet J., Scherman D. (1999) Minicircle: an improved DNA molecule for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *Gene Ther.* **6**, 209–218.
  57. Osborn M.J., McElmurry R.T., Lees C.J., DeFeo A.P., Chen Z.Y., Kay M.A., Naldini L., Freeman G., Tolar J., Blazar B.R. (2011) Minicircle DNA-based gene therapy coupled with immune modulation permits long-term expression of  $\alpha$ -L-iduronidase in mice with mucopolysaccharidosis type I. *Mol. Ther.* **19**, 450–460.
  58. Wang Q., Jiang W., Chen Y., Liu P., Sheng C., Chen S., Zhang H., Pan C., Gao S., Huang W. (2014) *In vivo* electroporation of minicircle DNA as a novel method of vaccine delivery to enhance HIV-1-specific immune responses. *J. Virol.* **88**, 1924–1934.
  59. Dietz W.M., Skinner N.E., Hamilton S.E., Jund M.D., Heitfeld S.M., Litterman A.J., Hwu P., Chen Z., Salazar A., Ohlfest J., Blazar B., Pennell C., Osborn M.J. (2013) Minicircle DNA is superior to plasmid DNA in eliciting antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses. *Mol. Ther.* **21**, 1526–1535.
  60. Alves C.P., Prazeres D.M.F., Monteiro G.A. (2021) Minicircle biopharmaceuticals — an overview of purification strategies. *Front. Chem. Eng.* **2**, 612594.
  61. Schakowski F., Gorschluter M., Buttgerit P., Maerten A., Lilienfeld-Toal M.V., Junghans C., Schroff M., König-Merediz S., Ziske C., Strehl J., Sauerbruch T., Wittig B., Schmidt-Wolf I.G. (2007) Minimal size MIDGE vectors improve transgene expression *in vivo*. *In Vivo*. **21**, 17–23.
  62. Junghans C., Schroff M., Koenig-Merediz S.A., Alfken J., Smith C., Sack F., Schirmbeck R., Wittig B. (2001) Form follows function: the design of minimalistic immunogenically defined gene expression (MIDGE®) constructs. In: *Plasmids for Therapy and Vaccination*. Ed. Schleef M. Wiley, 139–146. <https://doi.org/10.1002/9783527612833.ch08>
  63. Moreno S., Lopez-Fuertes L., Vila-Coro A.J., Sack F., Smith C.A., König S.A., Timón M. (2004) DNA immunisation with minimalistic expression constructs. *Vaccine*. **22**, 1709–1716.
  64. Leutenegger C.M., Boretti F.S., Mislin C.N., Flynn J.N., Schroff M., Habel A., Lutz H. (2000) Immunization of cats against feline immunodeficiency virus (FIV) infection by using minimalistic immunogenic defined gene expression vector vaccines expressing FIV gp140 alone or with feline interleukin-12 (IL-12), IL-16, or a CpG motif. *J. Virol.* **74**, 10447–10457.
  65. Zheng C., Juhls C., Oswald D., Sack F., Westfeling I., Wittig B., Babiuk L.A. (2006) Effect of different nuclear localization sequences on the immune responses induced by a MIDGE vector encoding bovine herpesvirus-1 glycoprotein D. *Vaccine*. **24**, 4625–4629.
  66. Gallig N., Kobelt D., Aumann J., Schmidt M., Wittig B., Schlag P.M., Walther W. (2012) Intratumoral dispersion, retention, systemic biodistribution, and clearance of a small-size tumor necrosis factor- $\alpha$ -expressing MIDGE vector after nonviral *in vivo* jet-injection gene transfer. *Hum. Gene Ther. Methods*. **23**, 264–270.
  67. Adie T., Orefo I., Kysh D., Kondas K., Thapa S., Extance J., Rothwell P.J. (2022) dbDNA™: an advanced platform for genetic medicines. *Drug Discov. Today*. **27**, 374–377.
  68. Scott V.L., Patel A., Villarreal D.O., Hensley S.E., Ragwan E., Yan J., Weiner D.B. (2015) Novel synthetic plasmid and Doggybone™ DNA vaccines induce neutralizing antibodies and provide protection from lethal influenza challenge in mice. *Hum. Vaccin. Immunother.* **11**, 1972–1982.
  69. Walters A.A., Kinnear E., Shattock R.J., McDonald J.U., Caproni L.J., Porter N., Tregoning J.S. (2014)

- Comparative analysis of enzymatically produced novel linear DNA constructs with plasmids for use as DNA vaccines. *Gene Ther.* **21**, 645–652.
70. Allen A., Wang C., Caproni L.J., Sugiyarto G., Harden E., Douglas L.R., Savelyeva N. (2018) Linear doggybone DNA vaccine induces similar immunological responses to conventional plasmid DNA independently of immune recognition by TLR9 in a pre-clinical model. *Cancer Immunol. Immunother.* **67**, 627–638.
  71. Mucker E.M., Brocato R.L., Principe L.M., Kim R.K., Zeng X., Smith J.M., Hooper J.W. (2022) SARS-CoV-2 Doggybone DNA vaccine produces cross-variant neutralizing antibodies and is protective in a COVID-19 animal model. *Vaccines (Basel)*. **10**, 1104.
  72. Bulcha J.T., Wang Y., Ma H., Tai P.W., Gao G. (2021) Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 53.
  73. Ghosh S., Brown A.M., Jenkins C., Campbell K. (2020) Viral vector systems for gene therapy: a comprehensive literature review of progress and biosafety challenges. *Appl. Biosafety*. **25**, 7–18.
  74. Lundstrom K. (2021) Viral vectors for COVID-19 vaccine development. *Viruses*. **13**, 317.
  75. Lu B., Lim J.M., Yu B., Song S., Neeli P., Sobhani N., Chai D. (2024) The next-generation DNA vaccine platforms and delivery systems: advances, challenges and prospects. *Front. Immunol.* **15**, 1332939.
  76. Lim M., Badruddoza A.Z.M., Firdous J., Azad M., Mannan A., Al-Hilal T.A., Islam M.A. (2020) Engineered nanodelivery systems to improve DNA vaccine technologies. *Pharmaceutics*. **12**, 30.
  77. Shah M.A.A., Ali Z., Ahmad R., Qadri I., Fatima K., He N. (2015) DNA mediated vaccines delivery through nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **15**, 41–53.
  78. Patel R., Kaki M., Potluri V.S., Kahar P., Khanna D. (2022) A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Hum. Vaccin. Immunother.* **18**, 2002083.
  79. Tenchov R., Bird R., Curtze A.E., Zhou Q. (2021) Lipid nanoparticles—from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement. *ACS Nano*. **15**, 16982–17015.
  80. Khan M.S., Baskoy S.A., Yang C., Hong J., Chae J., Ha H., Choi J. (2023) Lipid-based colloidal nanoparticles for applications in targeted vaccine delivery. *Nanoscale Adv.* **5**, 1853–1869.
  81. Karunakaran B., Gupta R., Patel P., Salave S., Sharma A., Desai D., Kommineni N. (2023) Emerging trends in lipid-based vaccine delivery: a special focus on developmental strategies, fabrication methods, and applications. *Vaccines (Basel)*. **11**(3), 661.
  82. Saade F., Petrovsky N. (2012) Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev. Vaccines*. **11**, 189–209.
  83. Mahale N.B., Thakkar P.D., Mali R.G., Walunj D.R., Chaudhari S.R. (2012) Niosomes: novel sustained release nonionic stable vesicular systems—an overview. *Adv. Colloid Interface Sci.* **183**, 46–54.
  84. Ge X., Wei M., He S., Yuan W.E. (2019) Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery. *Pharmaceutics*. **11**, 55.
  85. Jain S., Singh P., Mishra V., Vyas S.P. (2005) Mannosylated niosomes as adjuvant—carrier system for oral genetic immunization against hepatitis B. *Immunol. Lett.* **101**, 41–49.
  86. Vyas S.P., Singh R. P., Jain S., Mishra V., Mahor S., Singh P., Dubey P. (2005) Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B. *Int. J. Pharm.* **296**, 80–86.
  87. Pamornpathomkul B., Niyomtham N., Yingyongnarongkul B.E., Prasitpuriprecha C., Rojanarata T., Ngawhirunpat T., Opanasopit P. (2018) Cationic niosomes for enhanced skin immunization of plasmid DNA-encoding ovalbumin via hollow microneedles. *AAPS PharmSciTech.* **19**, 481–488.
  88. Hou X., Zaks T., Langer R., Dong Y. (2021) Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat. Rev. Mat.* **6**, 1078–1094.
  89. Garcia-Fuentes M., Alonso M.J. (2012) Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? *J. Control. Release*. **161**, 496–504.
  90. Shae D., Postma A., Wilson J.T. (2016) Vaccine delivery: where polymer chemistry meets immunology. *Ther. Deliv.* **7**, 193–196.
  91. Buschmann M.D., Merzouki A., Lavertu M., Thibault M., Jean M., Darras V. (2013) Chitosans for delivery of nucleic acids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1234–1270.
  92. Kumar M.N.V.R. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* **46**, 1–27.
  93. Ali A., Ahmed S. (2018) A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **109**, 273–286.
  94. Nanishi E., Dowling D.J., Levy O. (2020) Toward precision adjuvants: optimizing science and safety. *Curr. Opin. Pediatr.* **32**, 125–138.
  95. Li J., Cai C., Li J., Li J., Li J., Sun T., Yu G. (2018) Chitosan-based nanomaterials for drug delivery. *Molecules*. **23**, 2661.
  96. Babaei M., Eshghi H., Abnous K., Rahimizadeh M., Ramezani M. (2017) Promising gene delivery system based on polyethylenimine-modified silica nanoparticles. *Cancer Gene Ther.* **24**, 156–164.
  97. Shen C., Li J., Zhang Y., Li Y., Shen G., Zhu J., Tao J. (2017) Polyethylenimine-based micro/nanoparticles as vaccine adjuvants. *Int. J. Nanomedicine*. **12**, 5443–5460.
  98. Torrieri-Dramard L., Lambrecht B., Ferreira H.L., Van den Berg T., Klatzmann D., Bellier B. (2011) Intranasal DNA vaccination induces potent mucosal and systemic immune responses and cross-protective immunity against influenza viruses. *Mol. Ther.* **19**, 602–611.
  99. Suk J.S., Xu Q., Kim N., Hanes J., Ensign L.M. (2016) PEGylation as a strategy for improving

- nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **99**, 28–51.
100. Ho J.K., White P.J., Pouton C.W. (2018) Self-crosslinking lipopeptide/DNA/PEGylated particles: a new platform for DNA vaccination designed for assembly in aqueous solution. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. **12**, 504–517.
  101. Liu Y., Xu Y., Tian Y., Chen C., Wang C., Jiang X. (2014) Functional nanomaterials can optimize the efficacy of vaccines. *Small*. **10**, 4505–4520.
  102. Li X., Naeem A., Xiao S., Hu L., Zhang J., Zheng Q. (2022) Safety challenges and application strategies for the use of dendrimers in medicine. *Pharmaceutics*. **14**, 1292.
  103. Bober Z., Bartusik-Aebischer D., Aebischer D. (2022) Application of dendrimers in anticancer diagnostics and therapy. *Molecules*. **27**, 3237.
  104. Chis A.A., Dobrea C., Morgovan C., Arseniu A.M., Rus L.L., Butuca A., Frum A. (2020) Applications and limitations of dendrimers in biomedicine. *Molecules*. **25**, 3982.
  105. Karpenko L.I., Apartsin E.K., Dudko S.G., Starostina E.V., Kaplina O.N., Antonets D.V., Bazhan S.I. (2020) Cationic polymers for the delivery of the Ebola DNA vaccine encoding artificial T-cell immunogen. *Vaccines (Basel)*. **8**, 718.
  106. Santos A., Veiga F., Figueiras A. (2019) Dendrimers as pharmaceutical excipients: synthesis, properties, toxicity and biomedical applications. *Materials*. **13**, 65.
  107. Petrovici A.R., Pinteala M., Simionescu N. (2023) Dextran formulations as effective delivery systems of therapeutic agents. *Molecules*. **28**, 1086.
  108. Sun G., Mao J.J. (2012) Engineering dextran-based scaffolds for drug delivery and tissue repair. *Nanomedicine*. **7**, 1771–1784.
  109. Hu Q., Lu Y., Luo Y. (2021) Recent advances in dextran-based drug delivery systems: from fabrication strategies to applications. *Carbohydr. Polym.* **264**, 117999.
  110. Лебедев Л.Р., Карпенко Л.И., Порываева В.А., Азаев М.Ш., Рябчикова Е.И., Гилева И.П., Ильичев А.А. (2000) Конструирование вирусоподобных частиц, экспонирующих эпитопы ВИЧ-1. *Молекуляр. биология*. **34**, 480–485.
  111. Karpenko L.I., Rudometov A.P., Sharabrin S.V., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., Bazhan S.I., Ilyichev A.A. (2021) Delivery of mRNA vaccine against SARS-CoV-2 using a polyglucin: spermidine conjugate. *Vaccines (Basel)*. **9**, 76.
  112. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Богрянцева М.П., Рындюк Н.Н., Гинько З.И., Кузубов В.И., Ильичев А.А. (2016) Комбинированная вакцина против ВИЧ-1 на основе искусственных полиэпитопных иммуногенов: результаты I фазы клинических испытаний. *Биоорган. химия*. **42**, 191–191.
  113. Sadeghian I., Heidari R., Sadeghian S., Raei M.J., Negahdaripour M. (2022) Potential of cell-penetrating peptides (CPPs) in delivery of antiviral therapeutics and vaccines. *Eur. J. Pharm. Sci.* **169**, 106094.
  114. Kowalski P.S., Rudra A., Miao L., Anderson D.G. (2019) Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery. *Mol. Ther.* **27**, 710–728.
  115. Jorritsma S.H.T., Gowans E.J., Grubor-Bauk B., Wijesundara D.K. (2016) Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines. *Vaccine*. **34**, 5488–5494.
  116. Kisakov D.N., Belyakov I.M., Kisakova L.A., Yakovlev V.A., Tigeeva E.V., Karpenko L.I. (2024) The use of electroporation to deliver DNA-based vaccines. *Expert Rev. Vaccines*. **23**, 102–123.
  117. Weniger B.G., Papania M.J. (2013) Alternative vaccine delivery methods. In: *Vaccines* (6<sup>th</sup> edition). Eds Plotkin S.A., Orenstein W.A., Offit P.A. 1200–1231. doi: 10.1016/B978-1-4557-0090-5.00063-X
  118. Mitragotri S. (2006) Current status and future prospects of needle-free liquid jet injectors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 543–548.
  119. Wang R., Bian Q., Xu Y., Xu D., Gao J. (2021) Recent advances in mechanical force-assisted transdermal delivery of macromolecular drugs. *Int. J. Pharm.* **602**, 120598.
  120. Кисаков Д.Н., Кисакова Л.А., Шарабрин С.В., Яковлев В.А., Тигеева Е.В., Боргоякова М.Б., Старостина Е.В., Зайковская А.В., Рудометов А.П., Рудометова Н.Б., Карпенко Л.И., Ильичев А.А. (2023) Доставка экспериментальной мРНК-вакцины, кодирующей RBD SARS-CoV-2, с помощью струйной инъекции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. **176**, 751–756.
  121. Manam S., Ledwith B.J., Barnum A. B., Troilo P.J., Pauley C.J., Harper L.B., Nichols W.W. (2001) Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology*. **43**, 273–281.
  122. Houser K.V., Chen G.L., Carter C., Crank M.C., Nguyen T.A., Burgos Florez M.C., Ledgerwood J.E. (2022) Safety and immunogenicity of a ferritin nanoparticle H2 influenza vaccine in healthy adults: a phase I trial. *Nat. Med.* **28**, 383–391.
  123. Pearton M., Saller V., Coulman S. A., Gateley C., Anstey A.V., Zarnitsyn V., Birchall J.C. (2012) Microneedle delivery of plasmid DNA to living human skin: formulation coating, skin insertion and gene expression. *J. Control. Release*. **160**, 561–569.
  124. Song J.M., Kim Y.C., Eunju O., Compans R.W., Prausnitz M.R., Kang S.M. (2012) DNA vaccination in the skin using microneedles improves protection against influenza. *Mol. Ther.* **20**, 1472–1480.



## DNA Vaccine Technologies: Design and Delivery

© 2025 A. A. Fando\*, A. A. Ilyichev, V. R. Litvinova, N. B. Rudometova, L. I. Karpenko,  
A. P. Rudometov

*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector",  
Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia*

*\*e-mail: nastyafando@gmail.com*

The COVID-19 pandemic has triggered the development of new directions in vaccine development, among which DNA- and mRNA-based technologies are particularly noteworthy. The platform based on DNA vaccines is developing particularly intensively due to their high stability at ambient temperature and the ability to activate both humoral and cellular immunity. The full cycle of DNA vaccine creation, which includes the construction of plasmid DNA, obtaining a producer strain, fermentation and purification, takes 2–4 weeks. In addition, the production technology of such vaccines does not require working with dangerous pathogens, which significantly simplifies the process of their production and reduces the overall cost. Over more than 30 years of rapid development, DNA vaccine technology continues to undergo changes. Currently, there is a licensed DNA vaccine for the prevention of COVID-19, and many candidate prophylactic vaccines against viral and bacterial diseases are in clinical trials. The review covers not only the principles of constructing plasmid DNA vaccines, but also new technologies for obtaining DNA constructs, such as minicircular DNA, MIDGE DNA and Doggybone™ DNA. New types of DNA vaccines are interesting because they consist only of the most essential elements for activating the immune response. Such constructs completely lack the sequences necessary for the production of plasmid DNA in bacterial cells — for example, the antibiotic resistance gene. One of the key problems in the development of a DNA vaccine is the method of its delivery to target cells. Currently, various delivery methods are used, both chemical and physical, which are rapidly developing and have already proven themselves to be reliable and effective. The characteristics of some of the most promising methods are also presented in the review.

**Keywords:** DNA vaccine, minicircular DNA, MIDGE DNA and Doggybone™ DNA, delivery methods