На правах рукописи

Вахтинский Владимир Михайлович

КОЛЬЦЕВОЙ МРНК-ВЕКТОР КАК ОСНОВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН И СРЕДСТВ ПАССИВНОЙ ИММУНИЗАЦИИ

3.2.7 Иммунология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Научный руководитель:

Тутыхина Ирина Леонидовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Официальные оппоненты:

Филатов Александр Васильевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства.

Гордейчук Илья Владимирович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры организации и технологии производства иммунобиологических препаратов Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Ведущая организация:

«Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»

Защита диссертации состоится **30 апреля 2027 г.** в 11 часов на заседании диссертационного совета 21.1.018.03 при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра: http://www.gamaleya.org/.

Автореферат разослан «___» _____ 2027 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

д.б.н., Ермолаева С.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

В последние годы мРНК-векторы стали одной из наиболее динамично развивающихся платформ для создания медицинских препаратов (Chaudhary et al., 2021; Locci, Pardi, 2026). Вакцины на основе линейной мРНК продемонстрировали высокую иммуногенность и протективную активность в период пандемии SARS-CoV-2 (Baden et al., 2021; Polack et al., 2020). Однако немодифицированная линейная мРНК быстро деградирует под действием РНКаз (Karikó et al., 2005; Wang et al., 2025), что требует включения в ее состав модифицированных нуклеотидов, а также использования синтетических аналогов кэпа, что усложняет и удорожает производство.

Кольцевые мРНК-векторы представляют собой сравнительно новый класс векторов. Благодаря ковалентно замкнутой структуре они обладают повышенной стабильностью и не требуют введения дополнительных модификаций для защиты от деградации. На основе кольцевых мРНК уже разрабатывается ряд кандидатных вакцин против гриппа, оспы обезьян, бешенства и лихорадки Зика (Liu et al., 2024; Wan et al., 2024; Yue et al., 2024; Zhou et al., 2024). Существует несколько технологий получения кольцевых мРНК: химическая сшивка, ферментативное и рибозимное лигирование. Последние две обладают существенными преимуществами перед химической сшивкой, такими как высокая эффективность, отсутствие токсических компонентов и больший предельный размер циклизуемой мРНК (Wang et al., 2025; Wesselhoeft et al., 2019). Метод рибозимной циклизации представляется более перспективным с точки зрения масштабируемости, так как основан на спонтанной реакции, протекающей между молекулами мРНК без участия внешних ферментов (Wang et al., 2025; Wesselhoeft et al., 2019).

Кольцевые мРНК-векторы используют кэп-независимую трансляцию, что обеспечивает ряд преимуществ, включая функционирование в стрессовых условиях даже при подавлении классической кэп-зависимой трансляции (Wang et al., 2025; Yang, Wang, 2019). Наиболее широко в кольцевых мРНК-векторах используются вирусные IRES-элементы, такие как IRES вируса Коксаки B3 (CVB3), вируса энцефаломиокардита (ECMV) и вируса паралича сверчка (CrPV) (Niu et al., 2023; Peng et al., 2023). В настоящее время ведутся работы по модификации существующих векторов и поиску новых IRES. По последним данным, IRES некоторых риновирусов превосходят вирус Коксаки по уровням продукции целевого белка (Chen et al., 2023). Однако для правильного функционирования IRES-элементу необходимо поддерживать свою вторичную структуру. Для этого используются спейсерные последовательности, отделяющие его от интронов циклизации, имеющих собственную вторичную структуру. В настоящее время нет единого подхода к выбору спейсерной последовательности (Chen et al., 2023; Wesselhoeft et al., 2019).

Таким образом, разработка нового кольцевого мРНК-вектора, обеспечивающего высокий уровень продукции трансгена, и изучение его в качестве основы для создания вакцин против респираторных вирусов и средств пассивной иммунизации является актуальной задачей. Степень разработанности темы характеризуется наличием ограниченного числа исследований, посвященных сравнению различных IRES-элементов и спейсерных последовательностей в составе кольцевых мРНК-векторов (Chen et al., 2023), а также отсутствием данных об использовании кольцевых мРНК для пассивной иммунизации; в отличие от линейных мРНК, которые уже применяются для этих целей (Almeida et al., 2026; Rybakova et al., 2019; Thran et al., 2017).

Целью данной работы являлась разработка нового кольцевого мРНК-вектора и изучение его в качестве основы для создания вакцин против респираторных вирусов и средств пассивной иммунизации.

Задачи:

1. Сконструировать панель кольцевых мРНК-векторов, содержащих различные IRES-элементы и спейсерные последовательности, и сравнить их по уровням продукции репортерного белка *in vitro*.
2. Сравнить кинетику продукции репортерного белка после введения линейного и кольцевого мРНК-векторов *in vitro* и *in vivo.*
3. Изучить иммуногенность и протективную активность S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2, кодируемого кольцевым мРНК вектором, на модели трансгенных мышей K18-hACE-2.
4. Оценить индукцию клеточного иммунного ответа против вирусных антигенов новым кольцевым мРНК вектором в сравнении с линейным.
5. Изучить протективную активность консервативных антигенов вируса гриппа А, кодируемых кольцевым мРНК-вектором на модели летальной инфекции.
6. Оценить возможность использования кольцевого мРНК вектора для специфической иммунотерапии на летальных моделях отравления бактериальными токсинами.

Научная новизна выполненной работы

Впервые был сконструирован и охарактеризован по уровням продукции люциферазы кольцевой мРНК вектор, содержащих IRES риновируса B6. Впервые изучена иммуногенность и протективная активность при введении нового кольцевого мРНК вектора, кодирующего S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2 на модели трансгенных мышей K18-hACE-2. Впервые оценена индукция клеточного иммунного ответа при введении кольцевых мРНК векторов, кодирующих консервативные антигены вируса гриппа А. Впервые оценена возможность использования кольцевого мРНК вектора для специфической антитоксической иммунотерапии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в расширении знаний в области применения различных IRES-элементов и спейсерных последовательностей при разработке кольцевых мРНК-векторов.

Практическая значимость работы заключается в создании нового вектора, показавшего себя эффективной основой для создания вакцин и средств специфической антитоксической иммунотерапии.

Внедрение полученных результатов в практику

Научная работа представляет собой законченный вид исследования, имеющий выраженную прикладную направленность. В рамках диссертационной работы были оптимизированы условия получения мРНК в ходе реакции *in vitro* транскрипции. Данный метод внедрен на уровне ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, что подтверждается соответствующим актом о внедрении результатов в практику.

Методология и методы исследования

Методологической основой исследования послужили современные подходы, теоретические и экспериментальные исследования по получению кольцевых и линейных мРНК-векторов. В работе использовались передовые молекулярно-биологические, иммунологические, биоинформатические, вирусологические методы, а также методы работы с лабораторными животными и методы статистической обработки результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Линейный и кольцевой мРНК-векторы обеспечивают различную кинетику люциферазной активности *in vitro* на клетках HEK293 и *in vivo* на мышах линии Balb/c, при этом ко вторым суткам уровни продукции репортерного белка выравниваются.
2. Кольцевой мРНК-вектор индуцирует сильный гуморальный и клеточный иммунные ответы и обеспечивает защиту лабораторных животных от гриппа типа А и коронавирусной инфекции Covid-19.
3. Кольцевой мРНК вектор может быть использован в качестве вектора для пассивной иммунизации против бактериальных токсинов.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается размером выборки и результатами статистической обработки результатов. Для обработки результатов использовались статистические методы, соответствующие поставленным задачам. При проверке гипотез минимальный уровень значимости составлял 5% ($p < 0,05$). Сравнение двух исследуемых групп между собой проводилось с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия между выживаемостью животных в экспериментальных группах оценивали с использованием логрангового метода Мантель-Кокс. Анализ и обсуждение полученных результатов проводились с учетом актуальных данных по данной тематике.

Апробация результатов

Результаты работы были представлены на следующих научных конференциях: Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2025», XII Международная конференция молодых учёных: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов фундаментальной медицины в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2025, II Всероссийский форум молодых учёных Медицинская наука: вчера, сегодня, завтра – 2026, I Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ» – 2026.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации и результаты проведённого исследования соответствуют пунктам 3, 6 и 7 паспорта научной специальности 3.2.7. Иммунология.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 3 научные статьи в изданиях, рекомендованных ВАК и/или индексируемых в системах Web of Science, Scopus, 5 работ в сборниках международных конференций.

Личный вклад автора

Автором были лично получены ДНК-матрицы для синтеза кольцевой мРНК, кодирующие последовательности люциферазы, S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2, консервативных антигенов вируса гриппа M2 и NP, тяжелоцепочечных антител B11-Fc и C4.2-Fc. Также автором были получены ДНК-матрицы для синтеза линейной мРНК, кодирующей консервативные антигены вируса гриппа M2 и NP, тяжелоцепочечное антитело C4.2-Fc.

Автором проводились трансфекции клеточных линий мРНК-препаратами для изучения продукции целевых белков, а также введение изучаемых препаратов лабораторным животным. Также автор проводил отбор крови у лабораторных животных для дальнейшего исследования.

Секвенирование полученных конструкций проводилось в лаборатории анализа геномов.

Упаковка мРНК в липидные наночастицы проводилась совместно с лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов.

Заражение лабораторных животных вирусом SARS-CoV-2, оценка вирусной нагрузки и титров нейтрализующих антител проводилось сотрудниками лаборатории Государственной коллекции вирусов.

Изучение *in vivo* люциферазной активности и изучение протективной активности мРНК-векторов, несущих ген тяжелоцепочечного антитела C4.2-Fc, против токсина A *Clostridium difficile* проводилось совместно с лабораторией клеточной микробиологии.

Изучение протективной активности мРНК-векторов, несущих ген тяжелоцепочечного антитела B11-Fc, против летальной дозы ботулотоксина проводилось совместно с лабораторией иммунобиотехнологии.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 162 страницах машинописного текста, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений и список используемой литературы (338 источников, в том числе 2 отечественных и 336 иностранных публикаций). Работа содержит 7 таблиц и 20 рисунков.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
Дизайн кольцевых мРНК-векторов

В ходе работы была получена панель кольцевых мРНК-векторов на основе интронов пре-тРНК$^{\text{лейцин}}$ *Anabaena* PCC7120. Их схематическое изображение приведено на рис. 1. Было получено 4 вектора. В качестве IRES-элементов использовались IRES вируса Коксаки B3 и риновируса B6, в качестве спейсеров использовались поли(АЦ)-тракт или сайта для посадки поли(А)-связывающего белка 3.

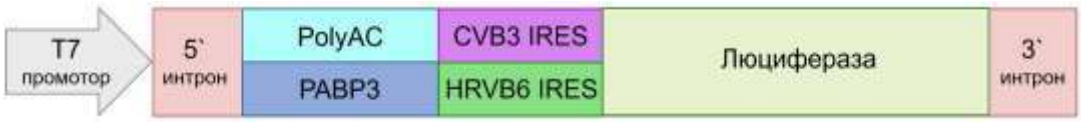


Рисунок 1 – Схематическое изображение панели кольцевых мРНК-векторов. T7 – промотор фага T7, 5`PIE – 5` интрон циклизации Anabaena, PolyAC – Поли(АЦ)-тракт, PABP3 – сайт для поли(А)-связывающего белка, 3 CVB3 IRES – внутренний сайт посадки рибосомы вируса Коксаки Б, HRVB6 IRES – внутренний сайт посадки рибосомы Риновируса B6, Fluc – репортерный белок (люцифераза светлячка), 3`PIE – 3` интрон циклизации Anabaena

Полученной мРНК проводилась трансфекция клеток HEK-293. По прошествии 18 часов проводилось измерение люциферазной активности, результаты приведены на рис. 2.

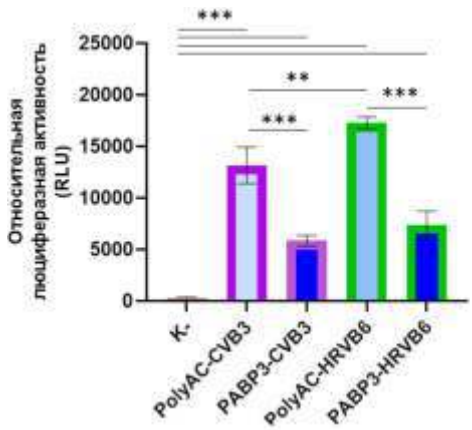


Рисунок 2 – Сравнение люциферазной активности клеток HEK293 через 18 часов после трансфекции различными кольцевыми мРНК векторами. Оценка значимости проводилась методом Манна-Уитни, n=3, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, ns – незначимо).

Результаты измерения люциферазной активности показали, что использование в качестве спейсера поли(АЦ)-тракта, более чем в два раза повышает уровни продукции целевого белка, в сравнении с линкером PABP3. Также заметно превосходство сайта посадки рибосомы риновируса B6 над таковым от вируса Коксаки B3, независимо от используемого спейсера.

Далее было проведено сравнение кинетики люциферазной активности кольцевого мРНК-вектора, содержащего IRES-элемент вируса риновируса B6 и поли(АЦ)-тракт в качестве спейсера с линейным мРНК-вектором.

Линейный мРНК вектор содержал 5` и 3` нетранслируемые области альфа-глобина, а также сегментированный поли(А)-хвост, состоящий из 30 и 70 поли(А)-сегментов, разделенных десятинуклеотидным «островом» для повышения стабильности. Кэпирование мРНК осуществлялось реагентом CleanCap. Так как стабильность линейных мРНК векторов зависит от использования N1-метил псевдоуридина, в эксперименте использовался, как модифицированный, так и немодифицированный вектор. Результаты кинетики люциферазной активности приведены на рисунке 3.

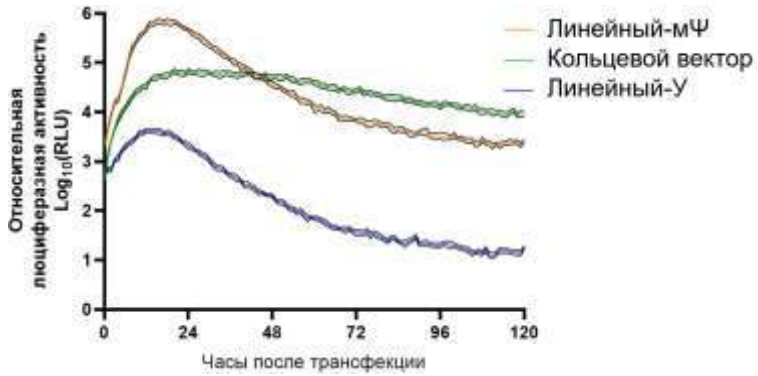


Рисунок 3 – Сравнение кинетики люциферазной активности клеток HEK293 после трансфекции мРНК векторами. Жирной линией в центре показано среднее значение, тонкие линии ограничивают доверительный интервал 95%.

Далее было проведено сравнение трансляционной активности двух кольцевых мРНК-векторов, содержащих поли(АЦ)-тракт в качестве спейсера, при этом один вектор содержал IRES-элемент риновируса B6 (HRVB6-S), а другой IRES-элемент вируса Коксаки B3 (CVB3-S). Результаты сравнени трансляционной активности приведены на рис. 4.

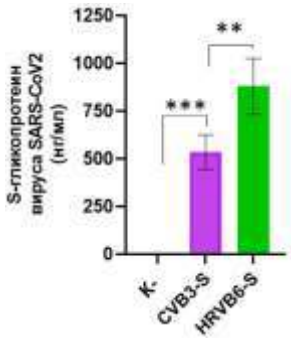


Рисунок 4 – Сравнение продукции S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 клетками HEK293 после трансфекции кольцевыми мРНК-векторами. (n=3, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). Для оценки значимости различий использовался критерий Манна-Уитни.

Продукция целевого антигена в после введения кольцевого мРНК-вектора, содержащего IRES-элемент риновируса B6 достоверно превышает продукцию после введения кольцевого вектора, содержащего IRES-элемент вируса Коксаки B3. Для дальнейшей работы был выбран кольцевой мРНК-вектор, IRES-элемент риновируса B6.

Изучение иммуногенности и протективной активности кольцевого мРНК вектора, кодирующего последовательность S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2

В качестве сравнения использовался линейный мРНК-вектор, полученный ранее в нашем центре. Линейная и кольцевая мРНК была упакована в липидные наночастицы. На рисунке 5 приведена схема эксперимента. На первом этапе проводилась двухкратная иммунизация трансгенных K18-hACE-2 мышей липидными наночастицами, содержащими мРНК в дозе 3 мкг/мышь с интервалом 21 день. По прошествии 21 дня у части мышей проводился отбор крови и измерение титров анти-RBD антител. Другие животные были интраназально заражены вирусом SARS-CoV-2 в дозе 10^5 $ТЦД_{50}$. Через 4 дня после заражения часть мышей была подвергнута эвтаназии с последующим отбором легких для определения вирусной нагрузки. Остальные животные были под наблюдением на протяжении 28 дней.

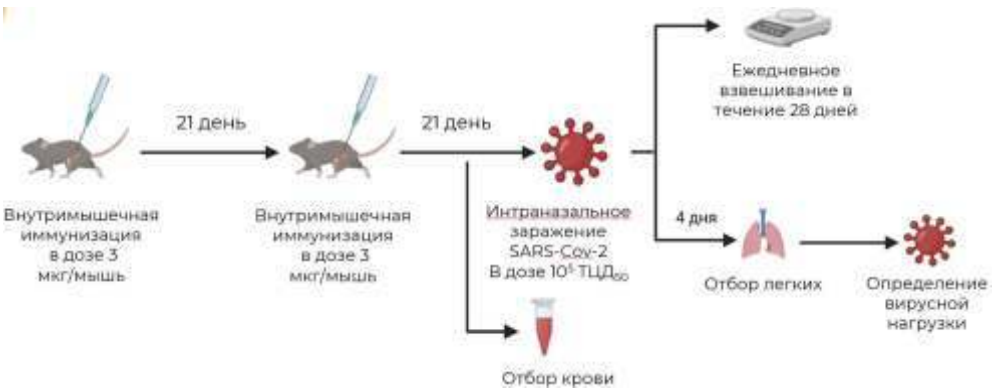
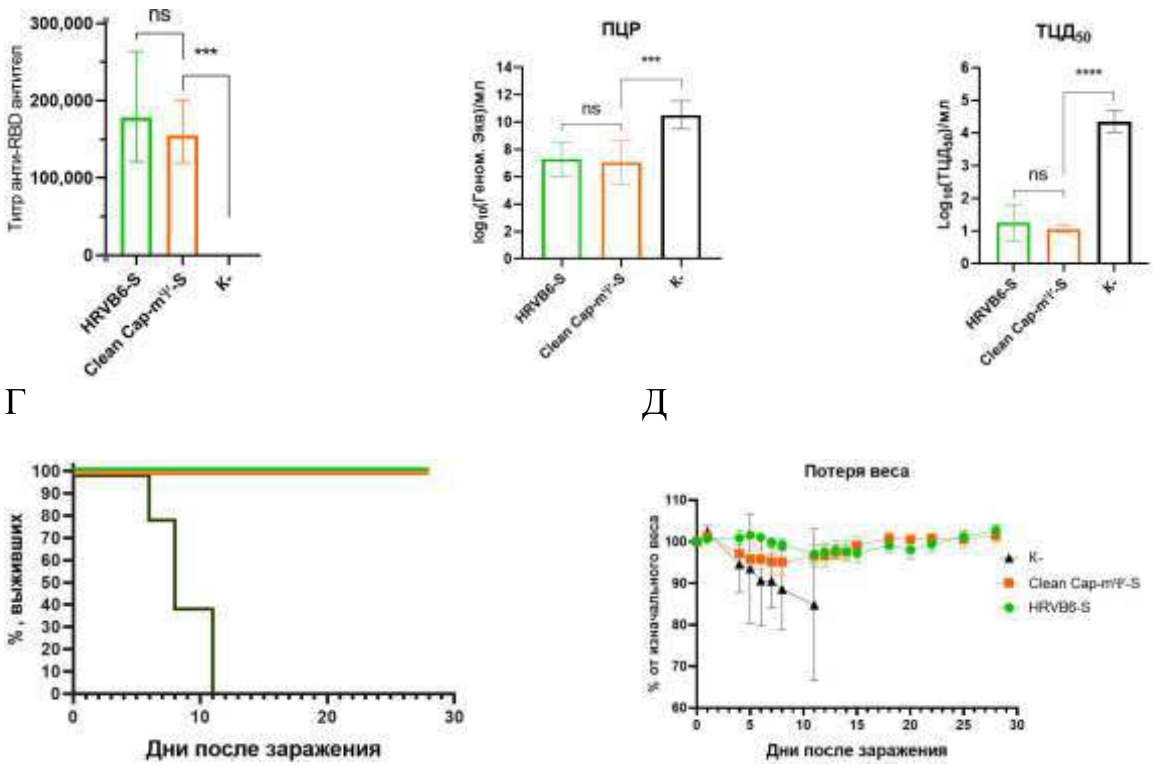


Рисунок 5 – Схема эксперимента по изучению иммуногенности и протективной активности линейных и кольцевых мРНК векторов, кодирующих S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2.

Результаты измерения титров анти-RBD антител приведены на рисунке 6А, определение вирусной нагрузки приведено на рисунках 6Б и 6В. Оценка выживаемости и убыли веса приведены на рисунка 6Г и 6Д, соответственно

А Б В



Г Д

Рисунок 6 – Изучение иммуногенности и протективной активности линейного и кольцевого мРНК-векторов. (А) – сравнение титров антител в сыворотке иммунизированных животных n=5. Для оценки значимости различий использовался критерий Манна-Уитни, (Б) – определение вирусной нагрузки в легких зараженных животных методом ПЦР-РВ с обратной транскрипцией, n=5. Для оценки значимости различий использовался критерий Манна-Уитни (В) – определение вирусной нагрузки в легких зараженных животных методом титрования по $ТЦД_{50}$ n=5. Для оценки значимости различий использовался критерий Манна-Уитни (Г) – оценка выживаемости зараженных животных Сравнение значимости проводилось попарно логранговым критерием Мантела-Кокса n=10, (Д) – измерение потери веса зараженных животных, данные приведены, как среднее значение с доверительным интервалом 95%. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

Новый кольцевой мРНК вектор, несущий ген S-гликопротеина SARS-CoV-2 индуцирует сопоставимый с линейными уровень антител в сыворотках иммунизированных животных. При этом титры достоверно отличаются от титров невакцинированных мышей. Оба вектора показывают 100% защиту мышей от летальной инфекции вирусом SARS-CoV-2, в то время как, невакцинированные животные умерли к 11 дню. И линейный и кольцевой векторы демонстрируют снижение вирусной нагрузки более чем на $3\log_{10}$, как при измерении методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией, так и при титровании по $ТЦД_{50}$. При этом достоверной разницы между двумя типами векторов не наблюдается. Снижение веса у вакцинированных животных не превышает 10%, в отличие от контрольных животных.

Таким образом была показана высокая эффективность нового кольцевого мРНК вектора, содержащего сайт посадки рибосомы риновируса B6, как основы для разработки вакцин. Далее нами было проведено изучение кольцевого мРНК вектора, для создания универсальной вакцины против гриппа А.

Изучение кольцевого мРНК-вектора как основа для создания универсальной вакцины против гриппа А

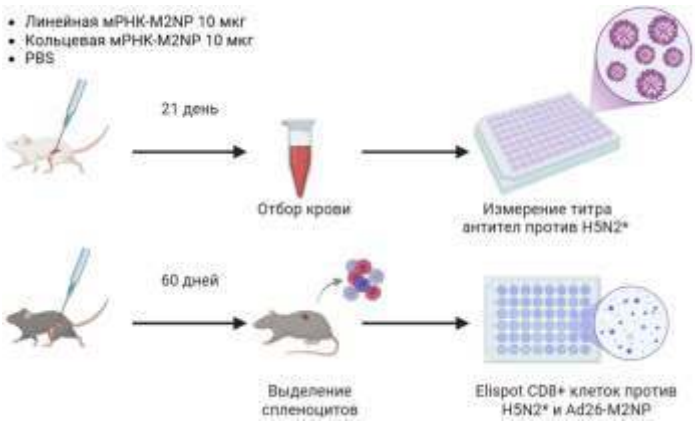
В качестве второй модели нами были выбраны вирусы гриппа А. Из-за высокой изменчивости и реассортации возможен переход межвидового барьера. Перспективными мишенями для разработки универсальной вакцины против гриппа А являются белки M2 и NP из-за их высокой гомологии между различными типами вируса гриппа. Ранее в нашем центре были получены рекомбинантные белки M2 и NP, полученные путем выравнивания различных изолятов. В ходе работы были сконструированы линейный и кольцевой мРНК-векторы, кодирующие консервативные антигены вируса гриппа.

На первом этапе проводилась оценка гуморального и клеточного иммунных ответов индуцируемых кольцевым и линейным мРНК-векторами против целевых антигенов вируса гриппа. Схема эксперимента приведена на рис. 7А. Для изучения гуморального иммунного ответа использовались мыши линии BALB/c, для изучения клеточного иммунного ответа использовались мыши линии C57BL/6

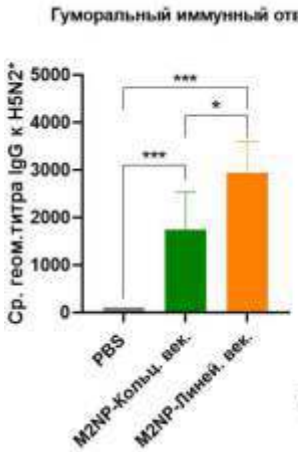
Мыши однократно иммунизировались липидными наночастицами, содержащими линейный или кольцевой мРНК вектор в дозе 10 мкг/мышь. По прошествии 21 дня после иммунизации у мышей BALB/c проводился отбор крови и измерение титров антител против вируса гриппа H5N2 A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/. Результаты измерения титров антител в сыворотках иммунизированных животных приведены на рисунке 7Б

По прошествии 60 дней после иммунизации мыши линии C57BL/6 были подвергнуты эвтаназии с последующим отбором селезенки. Затем из селезенки были выделены $CD8^+$ клетки, которые использовались в Elispot-анализе, его результаты приведены на рисунке 7В.

А



Б



В

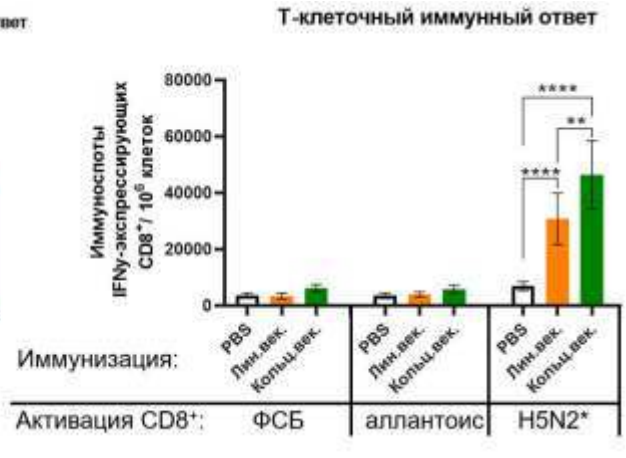


Рисунок 7 – Изучение гуморального и клеточного иммунных ответов после введения линейного и кольцевого мРНК векторов. (А) – схема эксперимента, (Б) – сравнение титров антител против вируса гриппа H5N2 A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/ в сыворотках иммунизированных животных через 21 день после иммунизации, (В) – сравнение количества интерферон-гамма-секретирующих иммуноспотов клеток, активированных вирусом гриппа H5N2 A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/. (n=12, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). Для оценки значимости различий использовался критерий Манна-Уитни.

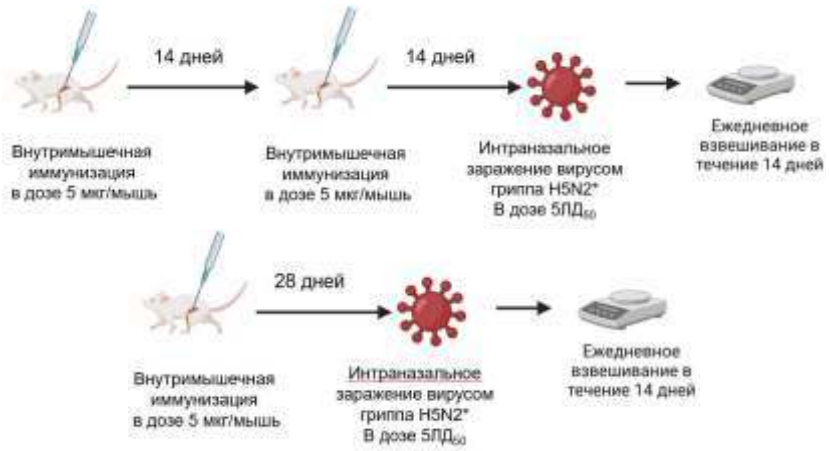
В ходе проведенного эксперимента было показано, что количество $CD8^+$клеток памяти, индуцированных кольцевым мРНК-вектором, достоверно выше, чем индуцированных линейным, в то время как, линейный вектор индуцировал достоверно более сильный гуморальный иммунный ответ, что делает кольцевой мРНК-вектор более перспективной основой для создания универсальной вакцины против гриппа А.

После изучения индукции гуморального и клеточного иммунного ответа против целевых антигенов, был проведен эксперимент по изучению протективной активности консервативных антигенов, кодируемых кольцевого мРНК-вектором.

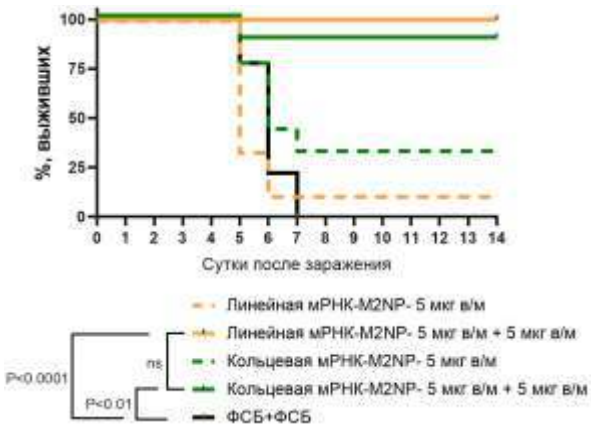
Изучение протективной активности кольцевого мРНК вектора, кодирующего консервативные антигены вируса гриппа А

Схема эксперимента приведена на рис. 8А. Мыши двухкратно или однократно иммунизировались внутримышечно в дозе 5 мкг/мышь. Интервал между первой и второй иммунизаций был 14 дней. Через 28 дней после первой или единственной иммунизации проводилось интраназальное заражение мышей вирусом гриппа А H5N2 A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/ в дозе 5 $ЛД_{50}$. Результаты оценки выживаемости и потери веса приведены на рис. 8Б и 8В, соответственно .

А



Б



В

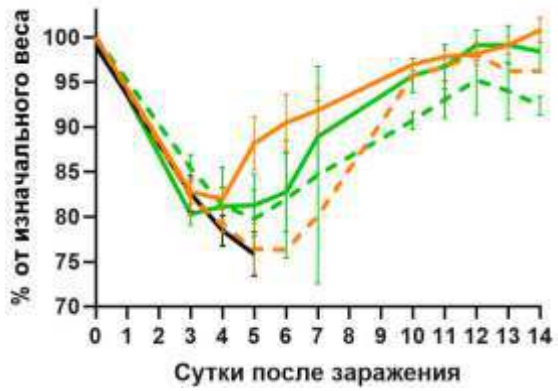


Рисунок 8 – Изучение протективной активности линейного и кольцевого мРНК-векторов, кодирующих консервативные антигены вируса гриппа А. (А) – схема эксперимента, (Б) – Оценка выживаемости вакцинированных животных при заражении вирусом гриппа A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/H5N2 в дозе 5$ЛД_{50}$., (В) – Оценка убыли веса вакцинированных животных при заражении вирусом гриппа A/Duck(Mallard)/Pennsylvania/10218/84/H5N2 в дозе 5$ЛД_{50}$ (Сравнение выживаемости проводилось попарно логранговым критерием Мантела-Кокса, n=9, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, ns – незначимо)

Кольцевой мРНК-вектор, обеспечил 30% защиту мышей от летальной инфекции при однократном введении, в то время как линейный – 10%, В то же время при двухкратной иммунизации кольцевой мРНК-вектор обеспечил 90% защиту мышей от летальной инфекции, а линейный – 100%. Статистический достоверной разницы между группами, получившими две дозы не установлено, при этом обе группы достоверно отличаются от неиммунизированных мышей ($p<0,01$ для кольцевого вектора и $p<0,0001$ для линейного). Также во всех группах наблюдается значительное снижение веса животных после заражения (>15%), В то же время после 6-7 дня наблюдается восстановление веса.

Таким образом, несмотря на разницу в индукции гуморального и клеточного иммунных ответов между кольцевым и линейным мРНК-векторами наблюдается сопоставимый уровень защиты.

Далее мы перешли к оценке пригодности полученного кольцевого мРНК-вектора для пассивной иммунизации. Для этого было выбрано две модели острой интоксикации: ботулотоксином и токсином А *Clostridium difficile.*

Одной из причин выбора модели интоксикации, а не вирусной инфекции является то, что в процессе репликации вирусы изменяют трансляционные механизмы в зараженных клетках. Помимо этого, иммунные реакции в ответ на инфекцию также затрагивают механизмы трансляции. При этом линейные и кольцевые мРНК-векторы используют различные механизмы трансляции, которые по-разному регулируются в стрессовых условиях.

В то же время, использование токсинов позволяет нивелировать влияние вирусных и иммунных факторов на трансляцию, обеспечив при этом воспроизводимую летальную модель. Более того введение, антител или сывороточных концентратов является «золотым стандартом» при терапии интоксикаций, в отличие от терапий вирусных инфекций.

Пассивная иммунизация кольцевым мРНК-вектором, кодирующим тяжелоцепочечное антитело, нейтрализующее ботулотоксин

На первом этапе нами была получена конструкция для синтеза кольцевой мРНК, кодирующая одноцепочечное антитело B11, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека. Линейный мРНК-вектор, кодирующий антитело B11, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека, был получен ранее в нашем центре.

Затем нами была изучена кинетика *in vivo* продукции антитела B11 слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека, при введении линейного и кольцевого мРНК-векторов мышам линии BALB/c. Результаты измерения кинетики приведены на рисунке 9.

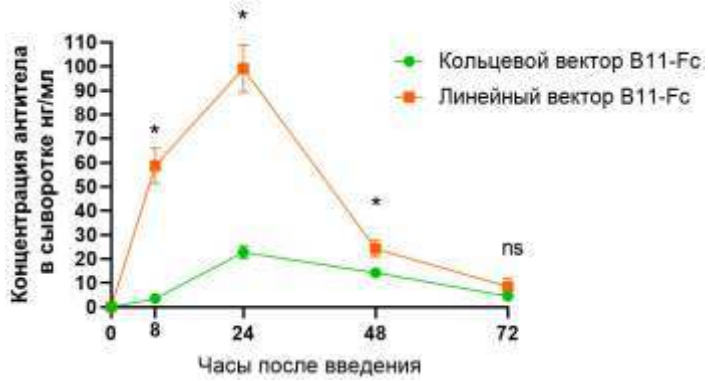
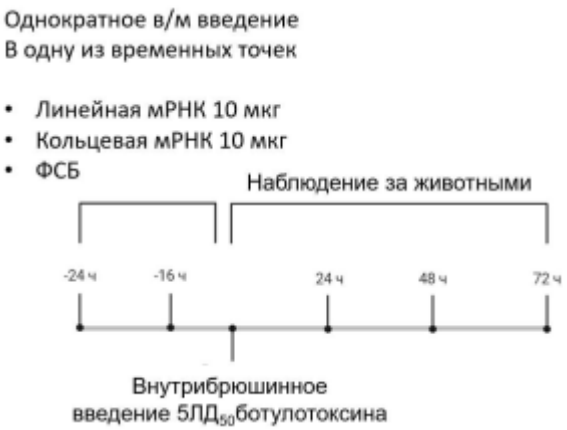


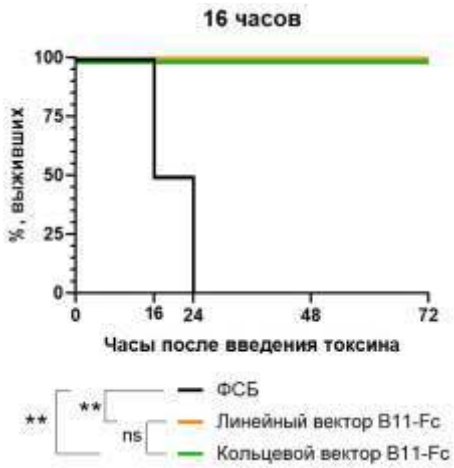
Рисунок 9– Изучение *in vivo* кинетики продукции однодоменного антитела B11-Fc после введения линейного и кольцевого мРНК-векторов. Оценка значимости проводилась методом Манна-Уитни, n=4, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, ns – незначимо).

Затем было проведено изучение протективной активности линейного и кольцевых мРНК-векторов, кодирующих рекомбинантное антитело B11, схема эксперимента приведена на рисунке 10А. На первом этапе мышам линии BALB/c за 24 или 16 часов до введения токсина вводили липидные наночастицы, содержащие мРНК-векторы или ФСБ. Доза на мышь составила 10 мкг мРНК. Затем животным вводили $5ЛД_{50}$ ботулотоксина внутрибрюшинно, после чего животные оставались под наблюдением в течение 72 часов. Результаты изучения выживаемости представлены на рисунках 10Б и 10В. Из-за быстрой гибели животных после введения токсина измерение потери веса в экспериментах не проводилось.

А



Б



В

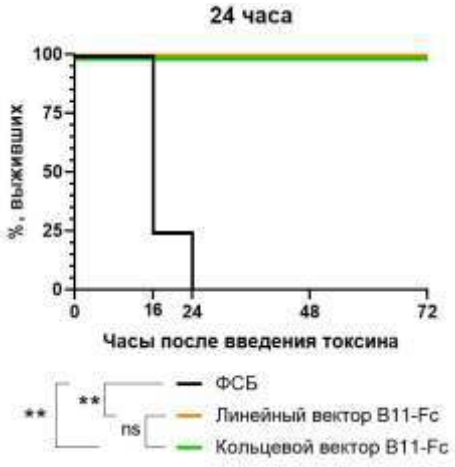


Рисунок 10 – Изучение протективной активности мРНК-векторов, кодирующих однодоменное антитело B11 слитое с Fc-фрагментом IgG1 против летальной дозы ботулотоксина. (А) – Схема введения мРНК векторов и токсина. (Б) – Выживаемость мышей при введении мРНК-вектора за 16 часов до введения токсина. (В) – Выживаемость мышей при введении мРНК-вектора за 24 часа до введения токсина. (Сравнение выживаемости проводилось попарно логранговым критерием Мантела-Кокса, n=4, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, ns – незначимо)

Было показано, что линейный и кольцевой мРНК-векторы, кодирующие однодоменное антитело B11, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека, обеспечивают 100% защиту мышей от летальной интоксикации ботулотоксином.

Далее исследование пассивной иммунизации было расширено. В качестве дополнительной модели использовалась модель летальной интоксикации токсином А *Clostridium difficile.*

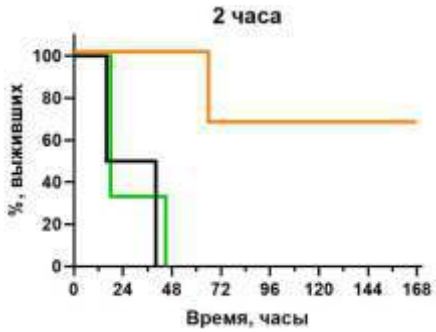
Пассивная иммунизация кольцевым мРНК-вектором, кодирующим тяжелоцепочечное антитело, нейтрализующее токсин А *Clostridium difficile*

На первом этапе нами были получены линейный и кольцевой мРНК-векторы кодирующие наноантитело C4.2, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека. Затем проводилось изучение протективной активности полученных векторов на модели летальной интоксикации токсином А *Clostridium difficile.* Схема эксперимента приведена на рисунке 11А. В данном эксперименте было принято решение изучить выживаемость в более широких интервалах: введение мРНК за 48 часов до введения токсина и введение мРНК за 2 часа до введения токсина. После введения токсина животные были под наблюдением в течение 7 суток. Результаты изучения выживаемости приведены на рисунках 11Б и 11В.

А



Б



В

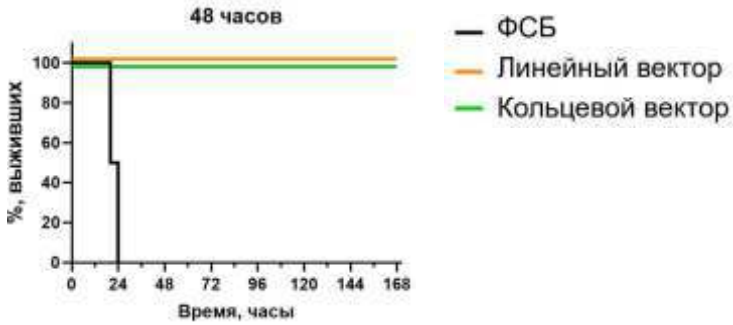


Рисунок 11 – Изучение протективной активности мРНК-векторов, кодирующих тяжелоцепочечное антитело С4.2 слитое с Fc-фрагментом IgG1 против летальной дозы токсина А *Clostridium difficile.* (А) – Схема введения мРНК векторов и токсина. (Б) – Выживаемость мышей при введении мРНК-вектора за 2 часа до введения токсина. (В) – Выживаемость мышей при введении мРНК-вектора за 48 часов до введения токсина. N=3.

Из полученных данных следует, что оба вектора обеспечивают 100% защиту мышей от летальной интоксикации при введении за 48 часов до введения токсина. При введении за 2 часа до введения токсина линейный вектор демонстрирует неполную защиту, а кольцевой вовсе не показывает никакой защиты. Это обусловлено, по-видимому, разницей в кинетике продукции белка линейными и кольцевыми мРНК-векторами. За счет более быстрого начала трансляции целевого белка после введения линейного мРНК-вектора часть животных оказывается защищена, однако защита не полная. Кольцевой же мРНК-вектор показывает медленный рост трансляции в первые часы, как следствие этого оказывается недостаточно для защиты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы на основе интронов циклизации 1 типа была сконструирована панель кольцевых мРНК-векторов, содержащих IRES-элементы вируса Коксаки B3 и риновируса B6, а также различные спейсерные последовательности. Установлено, что комбинация IRES-элемента риновируса B6 с поли(АЦ)-спейсером обеспечивает максимальную трансляционную активность в клетках HEK293.

Сравнительное изучение кинетики люциферазной активности *in vitro* и *in vivo* показало различие в кинетическом паттерне после введения линейного и кольцевого мРНК-векторов. Линейный мРНК-вектор характеризуется более быстрым ростом трансляции в первые часы после введения, а его пиковое значение превышает таковое для кольцевого. При этом к 48 часам их трансляционная активность выравнивается, а далее наблюдается превосходство кольцевого мРНК-вектора.

Далее был получен кольцевой мРНК-вектор, кодирующий S-гликопротеин SARS-CoV-2, который при двухкратной иммунизации обеспечивал 100% защиту трансгенных K18-hACE-2 мышей от летальной инфекции SARS-CoV-2. При этом вирусная нагрузка в легких иммунизированных животных была более чем на 3 $\log_{10}$ ниже, чем у контрольной группы как по данным ПЦР-РВ, так и по титрованию $ТЦД_{50}$, что не отличается от показателей линейного вектора.

Сравнение гуморального и клеточного иммунного ответа против целевых антигенов, кодируемых кольцевым и линейным мРНК-векторами, проводилось на модели консервативных антигенов вируса гриппа А. Было показано, что линейный вектор обеспечивает достоверно более высокий гуморальной ответ, в то время как кольцевой вектор обеспечивает более сильный Т-клеточный иммунный ответ. При этом оба вектора при двухкратной иммунизации обеспечивают сопоставимый уровень протективной активности.

Кольцевые мРНК-векторы, кодирующие рекомбинантные антитела, показали свою эффективность при пассивной иммунизации. Кольцевой мРНК-вектор, кодирующий тяжелоцепочечное антитело B11-Fc, обеспечил 100% защиту мышей от 5 $ЛД_{50}$ ботулотоксина при введении за 16 или 24 часа до интоксикации. Кольцевой мРНК-вектор, кодирующий тяжелоцепочечное антитело C4.2-Fc, обеспечил 100% защиту мышей от 5 $ЛД_{50}$ токсина А *C. difficile* при введении за 48 часов до интоксикации.

В совокупности полученные данные говорят о применимости полученного нового кольцевого мРНК-вектора для широкого применения в различных сферах иммунологии от создания вакцин до средств пассивной иммунизации.

ВЫВОДЫ

1. Был получен новый кольцевой мРНК-вектор, содержащий IRES риновируса B6 и поли(АЦ)-спейсер, который обеспечивает прирост люциферазной активности in vitro на 30-300% относительно других комбинаций.

2. Изучение люциферазной активности *in vitro* на клетках HEK293 и *in vivo* на мышах линии Balb/c показало, отличие в кинетике люциферазной активности между линейным и кольцевым мРНК-векторами. В первые 48 часов линейный мРНК-вектор обеспечивает достоверно большую люциферазную активность, а после 48 часов наблюдается превосходство люциферазной активности, обеспеченной кольцевым мРНК-вектором.

3. Двухкратное введение кольцевого мРНК-вектора, несущего ген S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2, обеспечивает 100% защиту трансгенных мышей K18-hACE-2 от заражения летальной дозой вируса 105 $ТЦД_{50}$.

4. CD8+ Т-клеточный иммунный ответ против консервативных антигенов вируса гриппа, индуцированный кольцевым мРНК вектором, достоверно превосходит ответ, индуцированный линейным, более чем в два раза.

5. Двухкратное введение кольцевого мРНК-вектора, несущего консервативные антигены вируса гриппа А, обеспечивает 90% защиту мышей от заражения 5 $ЛД_{50}$ вируса гриппа А

6. Кольцевые мРНК-векторы, кодирующие тяжелоцепочечные антитела B11-Fc и C4.2-Fc, обеспечили 100% защиту мышей при внутрибрюшинном введении 5 ЛД50 ботулотоксина и токсина А Clostridium difficile соответственно.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ

Полученный кольцевой мРНК-вектор, кодирующий консервативные антигены вируса гриппа А, будет изучен в качестве праймирующего компонента универсальной вакцины против гриппа А.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Vakhtinskii VM, Tutykhina IL, Dzharullaeva AS, Grousova DM, Zorkov ID, Ilyukhina AA, Reshetnikov DA, Azizyan VV, Derkaev AA, Bykonia EN, Usachev EV, Kleymenov DA, Gushchin VA, Shuliakova IV, Shcheblyakov DV, Shmarov MM, Logunov DY and Gintsburg AL (2026) Circular mRNA against CleanCap linear mRNA vectors: comprehensive comparison, expression, active and passive immunization. Front. Immunol. 17:1734751. doi: 10.3389/fimmu.2026.1734751

2. Vakhtinskii V.M., Tutykhina I.L., Bandelyuk A.S., Avdonina E.D., Verkhovskaya L.V., Bykonia E.N., Shmarov M.M., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. mRNA as a perspective prime-component for universal Influenza A vaccine. Immynologiya. 2025; 46 (5): 0–0. DOI: https://doi.org/10.33029/1816-2134-2025-46-5-0-0

3. Вахтинский, В. М. Применение мРНК векторов для пассивной иммунизации против токсина А *Clostridium difficile* / В. М. Вахтинский, И. Л. Тутыхина, А. С. Унгур [и др.] // Иммунология. — 2026. — Т. 47, № 4. — С. 551–560. — DOI: 10.33029/0206-4952-2026-47-4-551-560.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дцРНК – двухцепочечная рибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

$ЛД_{50}$ – средняя доза вируса, которая вызывает гибель 50 % подопытных животных

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

мΨ – N1-метил-псевдоуридин

ОП450нм – оптическая плотность, измеренная при длине волны 450 нм

оцРНК – одноцепочечная рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

$ТЦД_{50}$ – 50%-ная тканевая цитопатическая доза

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ACE2 – рецепторы ангиотензинпревращающего фермента II типа

CleanCap – запатентованная технология ко-транскрипционного кэпирования мРНК в ходе *in vitro* транскрипции

IgG – иммуноглобулины класса G

IRES – Internal Ribosome Entry Site – внутренний сайт посадки рибосомы

M2 – матриксный белок 2 вируса гриппа (matrix protein 2 of influenza virus)

NP – нуклеокапсидный белок вируса гриппа (nucleocapsid protein of influenza virus)

PBS – фосфатно-солевой буфер

S – S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2